

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2020

Bc. Barbora Čudová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Význam molekulárně cytogenetického
vyšetření u B-nehodgkinských lymfomů**

Diplomová práce

Bc. Barbora Čudová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: Mgr. Helena Urbánková, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Barbora ČUDOVÁ
Osobní číslo: R18937
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Význam molekulárně cytogenetického vyšetření u B-nehodgkinských lymfomů
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Cílem práce je určení přestavěb kandidátních genů pomocí metody FISH (fluorescenční in-situ hybridizace) u pacientů s B-nehodgkinskými lymfomy (B-NHL). 1. Sestavení souboru pacientů s B-NHL s imunohistochemicky stanovenou expresí genů MYC, BCL2, BCL6 a dalších. 2. Provedení metody FISH na parafinových řezech tkání s použitím sond specifických pro B-NHL: MYC, BCL2, BCL6 a dalších, vyhodnocení výsledků pod fluorescenčním mikroskopem. 3. Analýza získaných dat a jejich klinického významu. 4. Studium literatury.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Indrák K. Hematologie a transfúzní lékařství. Triton 2013. Michalová K. Úvod do lidské cytogenetiky. IDVPZ Brno 1999. Adam Z., Vorlíček J a kol. Hematologie II. Přehled maligních hematologických nemocí. Grada 2001. Lexová S. a kol. Hematologie pro zdravotní laboranty, 1.díl. IDVPZ Brno 2000. Swerdlow SH a kol. WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues, Lyon 2017. Hudeček J a kol. Double-hit difúzní velkobuněčný B-lymfom. Onkolog, 2015. Merron B a kol. Double hit lymphoma: How do we define it and how do we treat it? Best Pract Res Clin Haematol. 2018. Rosenthal A a kol. High grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6: Double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma. Blood Rev. 2017.


Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Helena Urbánková, Ph.D.**
Hemato-onkologická klinika



Datum zadání diplomové práce: 12. října 2018
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2020

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

L.S.



prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

Bibliografické údaje + SOUHRN

Jméno a příjmení autora: Bc. Barbora Čudová

Název práce: Význam molekulárně cytogenetického vyšetření u B-nehodgkinských lymfomů

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Helena Urbánková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2020

Abstrakt:

Tato diplomová práce se zabývá B-nehodgkinským lymfomem (B-NHL) a molekulárně cytogenetickými změnami, které jej doprovázejí a mají diagnostický a prognostický význam. Patří mezi ně zejména přestavby kandidátních genů *MYC*, *BCL2* a *BCL6*, ale i další aberace. Nejvhodnějším způsobem jejich detekce je cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření nativního nádorového materiálu, ten je však u většiny pacientů obtížné získat. Proto se vyšetření nejčastěji provádí metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) na parafinových (FFPE) řezech nádorových tkání odebraných pro histologické vyšetření.

V období od října 2018 do března 2020 bylo celkem vyšetřeno 43 pacientů s B-NHL, u kterých bylo třeba upřesnit diagnózu a stanovit subtyp onemocnění. Dalších 23 pacientů bylo vyšetřeno retrospektivně ve spolupráci s Ústavem klinické a molekulární patologie. Tento soubor pacientů byl sestaven na základě morfologického a histologického nálezu high-grade B-buněčného lymfomu, u kterého bylo podezření na diagnózu double/triple hit lymfomu (DHL/THL). U všech pacientů byla provedena FISH na FFPE řezech s komerčně dostupnými genovými sondami. Pokud byl k dispozici nativní nádorový materiál, bylo provedeno klasické cytogenetické vyšetření metodou FISH, případně mFISH, (mnohobarevná FISH) na kultivovaných buňkách. Z prvního souboru 43 pacientů bylo úspěšně vyšetřeno 34 pacientů, z toho u 30 byly nalezeny různé chromozomové aberace, které byly zahrnuty do klinického hodnocení a napomohly k přesnějšímu stanovení diagnózy a léčebného postupu. Z 23 retrospektivně vyšetřených pacientů s podezřením na high-grade B-lymfom, bylo úspěšně vyšetřeno 14 pacientů. Jedna pacientka byla na základě prokázané přestavby genů *MYC* a *BCL6* zařazena do nově vzniklé kategorie DHL.

Klíčová slova: B-nehodgkinský lymfom (B-NHL), difuzní velkobuněčný lymfom (DLBCL), formalin fixed paraffin embedded (FFPE) řez, fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Počet stran: 57

Počet příloh: -

Jazyk: Český

Bibliographical identification + SUMMARY

Author's first name and surname: Bc. Barbora Čudová

Title: The importance of molecular cytogenetic analysis in B-nonHodgkin lymphomas

Type of thesis: Master thesis

Department: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Supervisor: Mgr. Helena Urbánková, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Abstract:

This master thesis is focused on B-nonhodgkin lymphoma (B-NHL) and accompanying molecular cytogenetic changes, which have diagnostic and prognostic significance. These include, in particular, rearrangements of the candidate genes *MYC*, *BCL2* and *BCL6*, but also other aberrations. The best way to detect these aberrations is to perform cytogenetic and molecular cytogenetic examination of native tumor material. Unfortunately, it is difficult to obtain suitable material in most patients. Therefore the examination is most often performed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue taken for histological examination.

A total of 43 patients with B-NHL were examined from October 2018 to March 2020, in whom the diagnosis had to be clarified and the disease subtype specified. Another cohort of 23 patients was examined retrospectively in collaboration with the Institute of Clinical and Molecular Pathology. These patients were selected based on morphological and histological findings of high-grade B-cell lymphoma, in which a diagnosis of double/triple hit lymphoma (DHL/THL) was suspected. All of them were investigated by FISH on FFPE tissues with the commercially available probes. If native tumor material was available, classical cytogenetic examination supplemented with FISH or mFISH (multicolor FISH) was performed on cultured cells. Thirty-four patients out of 43 patients of the first group, were successfully examined. Various chromosomal aberrations were found in 30 of them. Results were included in the clinical decision making and contributed to specify the diagnosis and to determine appropriate treatment strategy. Fourteen patients out of 23 retrospectively examined patients with suspected high-grade B-lymphoma, were successfully tested. One patient was included in the newly formed DHL category based on a rearrangement of the *MYC* and *BCL6* genes.

Keywords: B-nonhodgkin lymphoma (B-NHL), diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue, fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Number of pages: 57

Number of appendices: -

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu magisterského studia pod vedením Mgr. Heleny Urbánkové, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Ráda bych poděkovala Mgr. Heleně Urbánkové, Ph.D. za čas, metodické vedení a cenné rady, které mi poskytovala při sepisování diplomové práce, a také celému kolektivu Laboratoře cytogenetiky a molekulární cytogenetiky. Dále bych ráda za spolupráci poděkovala MUDr. Patriku Flodrovi a kolektivu lékařů z Ústavu klinické a molekulární patologie Fakultní nemocnice Olomouc.

Práce vznikla za finanční podpory Vnitřní grantové agentury Univerzity Palackého v Olomouci (IGA UPOL) v rámci projektů LF_2019_001 a LF_2020_002 s názvem Studium molekulární a genetické podstaty nádorů krevetvorné tkáně a vnitřního start-up grantu Fakultní nemocnice Olomouc MZ ČR_RVO (FNOL, 00098892) s názvem Nové prediktivní biomarkery u vybraných lymfoproliferativních onemocnění.

Obsah

1	Úvod.....	1
2.	Cíle práce	3
3.	Literární přehled.....	4
3.1	Normální vývoj a zrání B-lymfocytů	4
3.2	B-nehodgkinské lymfomy (B-NHL)	5
3.2.1	Folikulární lymfom	7
3.2.2	Burkittův lymfom.....	8
3.2.2.1	Burkitt-like lymfom s aberací 11q	8
3.2.3	Lymfom z plášťových buněk	9
3.2.4	Lymfom marginální zóny.....	10
3.3	Difuzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL).....	10
3.3.1	Klasifikace DLBCL	12
3.3.2	Léčba.....	13
3.3.3	Difuzní velkobuněčný B-lymfom, blíže nespecifikovaný (DLBCL, NOS = not otherwise specified)	13
3.3.4	Rekurentní chromozomové a genové aberace DLBCL, NOS.....	13
3.3.4.1	Rekurentní genetické aberace GCB-DLBCL	14
3.3.4.2	Rekurentní genetické aberace ABC-DLBCL	14
3.3.4.3	Chromozomové translokace.....	15
	<i>MYC</i>	15
	<i>BCL2</i>	16
	<i>BCL6</i>	16
3.3.5	High-grade B-buněčné lymfomy s přestavbami <i>MYC</i> a <i>BCL2</i> nebo <i>BCL6</i>	16
4.	Materiál a metody	19
4.1	Biologický materiál.....	19
4.2	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	19
4.3	Seznam použitých přístrojů a zařízení	27
4.4	Pomůcky.....	28
4.5	Použité chemikálie a roztoky	29
5	Výsledky	32
6	Diskuze.....	50
7	Závěr	52
8	Literatura.....	53

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Molekulární proces přeskupování genů pro imunoglobuliny	5
Obrázek č. 2: Zrání B-lymfocytů v germinálním centru	5
Obrázek č. 3: Schéma vzniku B-lymfoproliferací v průběhu zrání B-lymfocytu	6
Obrázek č. 4: Mapa sondy <i>ZytoLight</i> SPEC <i>MYC</i> Dual Color Break Apart Probe	22
Obrázek č. 5: Mapa sondy <i>ZytoLight</i> SPEC <i>IGH</i> Dual Color Break Apart Probe	22
Obrázek č. 6: Obrázek č. 6: Mapa sondy <i>ZytoLight</i> SPEC <i>BCL2</i> Dual Color Break Apart Probe	23
Obrázek č. 7: Mapa sondy <i>ZytoLight</i> SPEC <i>BCL6</i> Dual Color Break Apart Probe	23
Obrázek č. 8: Mapa sondy SPEC <i>BCL2/IGH</i> Dual Color Dual Fusion Probe	24
Obrázek č. 9: Mapa sondy <i>MYC/IGH</i> Dual Color Dual Fusion Probe.....	25
Obrázek č. 10: Procentuální zastoupení pacientů na základě počtu chromozomových změn	34
Obrázek č. 11: Počet pacientů s translokací genu <i>IGH</i> s různými partnerskými chromozomy ..	36
Obrázek č. 12: Výsledek mFISH pacienta č. 12	37
Obrázek č. 13: Výsledek FISH na interfázních jádrech se sondou XL t(8;14) <i>MYC/IGH</i> DF u pacienta č. 12.....	36
Obrázek č. 14: Výsledek FISH na FFPE řezu pacienta č. 15 se sondou <i>ZytoLight</i> SPEC <i>BCL2</i> Dual Color Break Apart Probe.....	37
Obrázek č. 15: Výsledek FISH na FFPE řezu pacienta č. 15 se sondou <i>ZytoLight</i> SPEC <i>IGH/BCL2</i> Dual Color Dual Fusion Probe	38
Obrázek č. 16: Výsledek FISH na FFPE řezu u pacienta č. 40 se sondou <i>ZytoLight</i> SPEC <i>MYC/IGH</i> Dual Color Dual Fusion Probe	39
Obrázek č. 17: Výsledek FISH na FFPE řezu se sondou <i>ZytoLight</i> SPEC <i>BCL6</i> Dual Color Break Apart Probe.....	40
Obrázek č. 18: Výsledek mFISH jednoho z klonů u pacienta č. 40.....	41
Obrázek č. 19: Výsledek FISH na FFPE řezu se sondou <i>ZytoLight</i> SPEC 11q gain/loss Triple Color Break Apart Probe u pacienta č. 21.....	42
Obrázek č. 20: Výsledek vyšetření FISH na FFPE řezu se sondou <i>ZytoLight</i> SPEC <i>BCL2</i> Dual Color Break Apart Probe u pacienta č. 38.....	43
Obrázek č. 21: Výsledek FISH na FFPE řezu pacienta č. 8 se sondou <i>ZytoLight</i> SPEC <i>CCND1/IGH</i> Dual Color Dual Fusion Probe.....	44
Obrázek č. 22: Výsledek FISH na FFPE řezu u pacienta č. 22 se sondou <i>ZytoLight</i> SPEC <i>BCL2/IGH</i> Dual Color Dual Fusion Probe	45

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Rozdělení pacientů na základě IPI a R-IPI skóre do jednotlivých prognostických skupin a jejich celkové 4-leté přežití.....	11
Tabulka č. 2: Klasifikace velkobuněčného B-lymfomu podle WHO (2017).....	12
Tabulka č. 3: Genetické změny asociované s GCB a ABC DLBCL	15
Tabulka č. 4: Seznam použitých sond.....	21
Tabulka č. 5: Základní charakteristika souboru pacientů.....	32
Tabulka č. 6: Výsledky vyšetření metodou FISH na parafinových řezech u pacientů s DLBCL34	
Tabulka č. 7: Počty kopií kandidátních genů u pacientů s DLBCL	35
Tabulka č. 8: Výsledky vyšetření FISH u pacientů s FL	44
Tabulka č. 9: Výsledky FISH u pacientů s neznámou nebo jinou diagnózou.....	46
Tabulka č. 10: Výsledky FISH u pacientů s diagnózou high grade B-NHL	48

1 Úvod

Krvetvorba (hematopoéza) je proces tvorby krevních buněk v krvetvorných orgánech. Vychází z hematopoetické totipotentní kmenové buňky, ze které se klonálním vývojem vytváří pluripotentní hematopoetické buňky, které se pak diferencují do krvetvorných řad. Myeloidní progenitorové buňky dávají vzniknout efektorovým buňkám myeloidní řady, mezi které patří erytrocyty, granulocyty, megakaryocyty a makrofágy. Z lymfoidních progenitorových buněk vznikají procesem hematopoézy B-lymfocyty, T-lymfocyty a NK-buňky (natural-killer). Zralé efektorové buňky jsou konečnými stádii krvetvorby a vykonávají funkce, pro které byly vytvořeny. Hematologické malignity vznikají nádorovou transformací různých hematopoetických buněk, která je spojena se specifickými chromozomovými a genovými přestavbami a mutacemi. Primární genetické změny se podílejí na vzniku nádoru, zatímco sekundární se objevují až v průběhu onemocnění a souvisí s jeho progresí.

Neoplastickou proliferací buněk lymfoidního původu vznikají lymfomy, nádorová onemocnění, která se nejčastěji manifestují v lymfatických uzlinách a lymfoidních tkáních. B-nehodgkinské lymfomy (B-NHL) patří mezi maligní lymfoproliferativní onemocnění, která vychází z různě zralých B-lymfocytů. Podle klinického projevu onemocnění, imunofenotypických a genetických charakteristik a podle histologického nálezu je dále můžeme rozdělit do několika podskupin. Mezi nejčastější B-NHL řadíme: difuzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL), Burkittův lymfom (BL), folikulární lymfom (FL), lymfom z pláštěvých buněk (mantle cell lymfom, MCL) a lymfom z buněk marginální zóny (MZL). Dělení do jednotlivých kategorií je velmi důležité, z důvodu různého buněčného původu onemocnění, rozlišné patogeneze, průběhu onemocnění, přežití pacientů a jejich léčby. Každá kategorie B-NHL má své charakteristické chromozomové aberace a genové mutace, z nichž některé mají prognostický a prediktivní význam. Některé z těchto genetických změn je možné detekovat v nádorových buňkách metodami klasické a molekulární cytogenetiky.

Dostupnost nádorového materiálu pro *in vitro* kultivaci je však u B-NHL často velmi problematická z důvodu nízké infiltrace kostní dřeně nebo periferní krve nádorovými buňkami. Komplikovaná organizace získání nativního nádorového vzorku pro cytogenetickou laboratoř je hlavní překážkou jak pro realizaci klasického cytogenetického vyšetření a stanovení karyotypu, tak i pro detekci změn na kultivovaných interfázních buňkách metodami molekulární cytogenetiky. Z tohoto důvodu se přistupuje k metodě fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) prováděné na zafixovaných parafinových řezech nádorových tkání (formalin fixed paraffin embedded, FFPE) odebraných pro histopatologické vyšetření. Úspěšnost FISH je však velmi závislá na délce a způsobu fixace tkáně a na kvalitě řezu. Navíc na takto zpracovaném materiálu lze technicky spolehlivě hodnotit pouze přestavby genů, numerické aberace jsou obtížně

[Type here]

stanovitelné. Mezi hlavní kandidátní geny, které jsou u B-NHL nejčastěji vyšetřované, patří geny *MYC*, *BCL2*, *BCL6* a geny pro imunoglobuliny.

Určení specifických chromozomových aberací a genových přestaveb v kombinaci s dalšími klinickými, imunofenotypickými a histopatologickými parametry je velmi důležité pro charakterizaci B-NHL. Je nezbytnou součástí diagnostiky těchto onemocnění, přispívá ke stanovení prognózy a volbě léčebné strategie a zároveň je důležitým nástrojem pro sledování případné progresse onemocnění.

[Type here]

2. Cíle práce

Cílem práce je určení přestaveb kandidátních genů pomocí metody FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) u pacientů s B-nehodgkinskými lymfomy (B-NHL).

1. Sestavení souboru pacientů s B-NHL s imunohistochemicky stanovenou expresí genů *MYC*, *BCL2*, *BCL6* a dalších.
2. Provádění metody FISH na parařinových řezech tkáni s použitím sond specifických pro B-NHL: *MYC*, *BCL2*, *BCL6* a dalších, vyhodnocení výsledků pod fluorescenčním mikroskopem.
3. Analýza získaných dat a jejich klinického významu.
4. Studium literatury.

3. Literární přehled

3.1 Normální vývoj a zrání B-lymfocytů

B-lymfocyty jsou buňky, které vznikají z lymfoidní linie kmenových buněk. Vznikají v kostní dřeni a následně putují krví do sekundárních lymfoidních orgánů (slezina, uzliny), kde dochází k dokončení jejich zrání (Hořejší *et al.*, 2017).

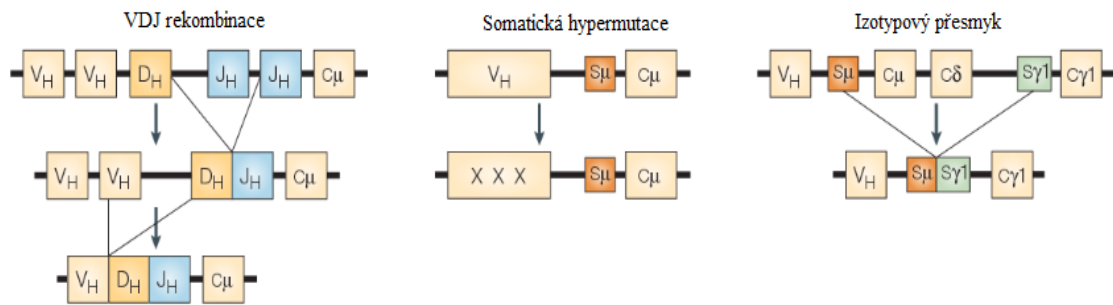
Zrání a diferenciaci B-lymfocytů podmiňují genetické změny v buňkách. Během rané fáze diferenciaci dochází k přeskupování genů pro imunoglobuliny (Kubisz *et al.*, 2006). Geny kódující imunoglobulinové řetězce se skládají z genových segmentů a tyto segmenty během vývoje B-lymfocytu podstupují proces rekombinace. Díky tomuto postupu vznikají klonálně specifické povrchové imunoglobuliny. Geny pro imunoglobuliny kódující lehký řetězec se nachází na chromozomech 2 (kódují řetězec κ) a 22 (kódují řetězec λ), geny kódující těžký řetězec pak na chromozomu 14 (kódují řetězec H).

Nejdříve dochází v progenitorech B-lymfocytů k tzv. D-J přeskupování, které je založeno na vyštěpení genového komplexu IgH mezi D a J segmentem. Tento děj probíhá na obou chromozomech zároveň. Poté nastává V-D přeskupení, při kterém je vyštěpen úsek mezi V a DJ segmentem (viz Obrázek č. 1). Tímto procesem se z progenitoru B-lymfocytu stává pre-B-lymfocyt. Pokud vznikne funkční mRNA, proces přeskupování je na druhém chromozomu zastaven (alelická exkluze), což znamená, že u každého B-lymfocytu dochází k produkci pouze jednoho H řetězce. Následně dochází k přeskupení genů pro L řetězec κ , které spočívá ve vyštěpení úseku mezi V a J segmentem. Tento proces probíhá opět na obou chromozomech zároveň, dokud nedojde ke vzniku funkční mRNA. Spojením L a H řetězce vzniká povrchový IgM, který nahrazuje pre-B-receptor. Pokud je přeskupování neúspěšné, dojde k zahájení nového přeskupování. Pokud je i toto přeskupování neúspěšné, pre-B-lymfocyt zaniká. Tím, že buňka exprimuje povrchový IgM se stává nezralým B-lymfocytem. Současnou expresí IgM a IgD se z nezralého B-lymfocytu stane zralý B-lymfocyt (Hořejší *et al.*, 2017).

Následně zrání pokračuje až po setkání B-lymfocytu s antigenem v sekundárním lymfoidním orgánu. Po tom, co dojde ke střetu lymfocytu s antigenem, dojde ke změně B-lymfocytu v zárodečném centru lymfatických folikulů na imunoblasty a centroblasty. Ve variabilních oblastech dochází k bodovým mutacím, které zlepšují antigenní specifitu – k somatické hypermutaci imunoglobulinů (Kubisz *et al.*, 2006). Za tento proces je zodpovědný enzym aktivací indukovaná cytidin deamináza (AID), která během transkripce úseků genů pro variabilní části řetězců odstraňuje aminoskupinu z cytosinu. Stává se z něj uracil, což vede ke vzniku bodové mutace. K mutacím může také docházet z důvodu nepřesných reparačních mechanismů. Po aktivaci antigenem dochází dále k izotypovému přesmyku (viz Obrázek č. 1).

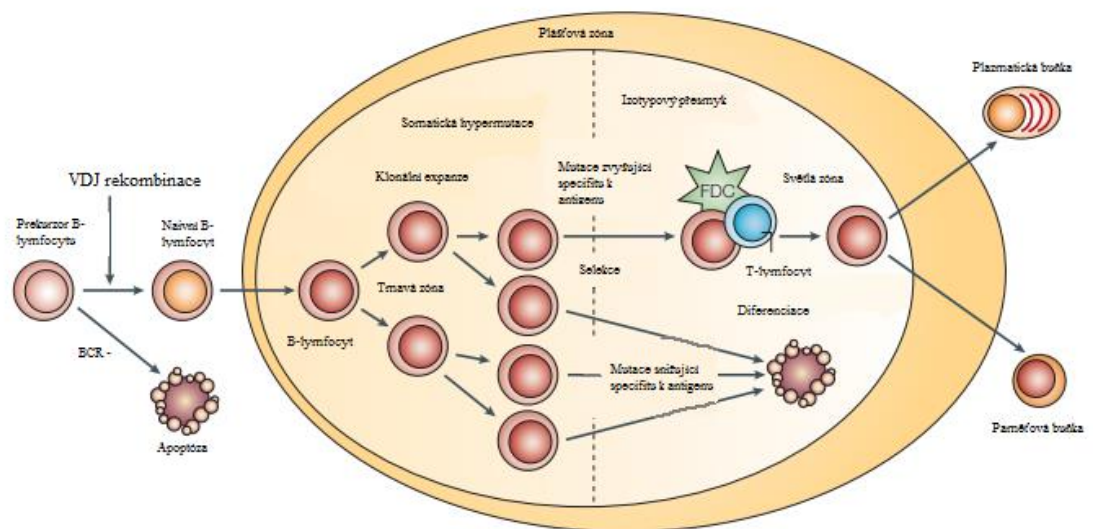
[Type here]

Během něj jsou vyštěpovány úseky, které kódují konstantní části H řetězce, čímž dochází ke ztrátě některých z C segmentů (Hořejší *et al.*, 2017).



Obrázek č. 1: Molekulární proces přeskupování genů pro imunoglobuliny (převzato z Küppers, 2005)

Z centroblastů se stávají centrocyty, z imunoblastů pak plazmatické buňky. Některé centrocyty putují ze zárodečného centra a vytváří marginální zónu okolo aktivovaného folikulu (marginální B-lymfocyty) (viz Obrázek č. 2). Plazmatické buňky, které jsou konečným stádiem B-lymfocytů, se kumulují v lymfatických uzlinách a produkují protilátky (Kubisz *et al.*, 2006).



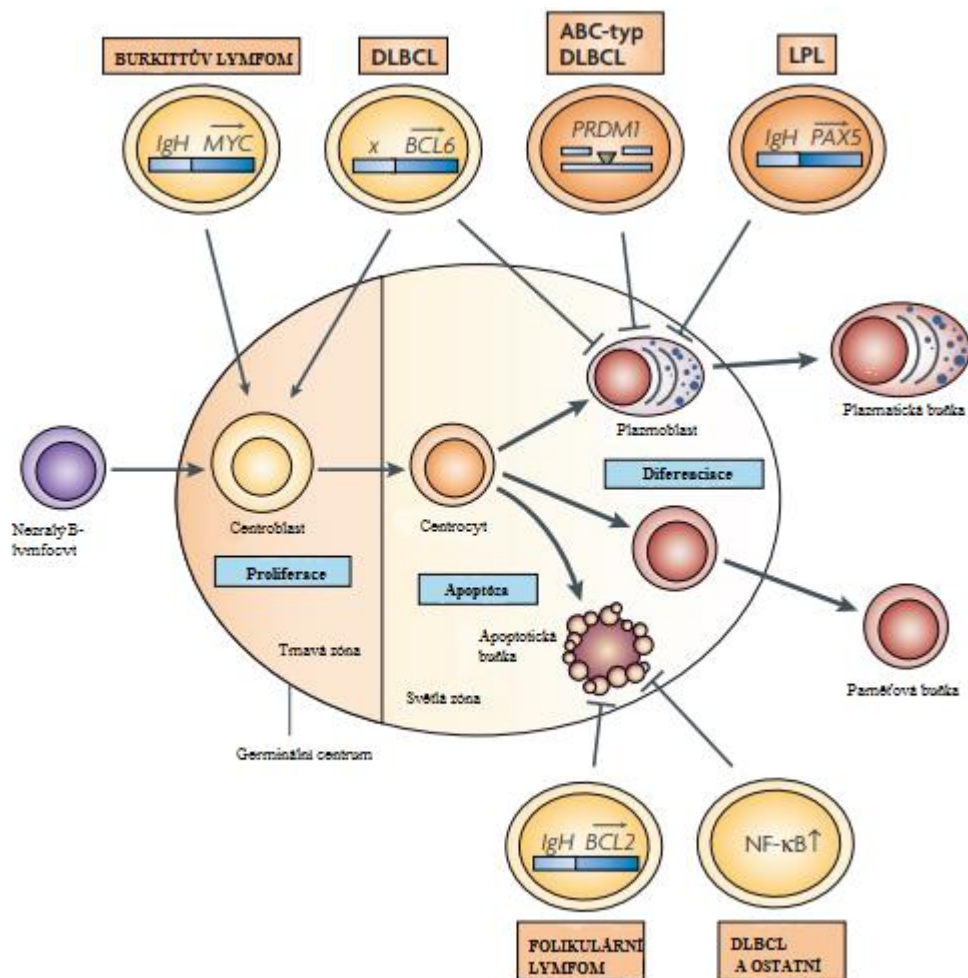
Obrázek č. 2: Zrání B-lymfocytů v germinálním centru (převzato z Küppers, 2005)

3.2 B-nehodgkinské lymfomy (B-NHL)

B-nehodgkinské lymfomy (B-NHL) patří mezi maligní lymfoproliferativní onemocnění, která vychází z různě zralých neoplasticky transformovaných B-lymfocytů. V ČR je každý rok nově diagnostikováno 15 případů B-NHL na 100 000 obyvatel a incidence každým rokem

[Type here]

stoupá o 3 – 4 %. B-NHL je onemocnění především lidí staršího věku, medián věku se kromě Burkittova lymfomu pohybuje mezi 55 – 65 lety (Pytlík *et al.*, 2013). Podle původu je dělíme na lymfomy z B a T buněk, podle klinického průběhu na lymfomy agresivní a indolentní. Dále je můžeme rozdělit dle fenotypických a genetických charakteristik a podle histologického nálezu. Mezi nejčastější B-nehodgkinské lymfomy (B-NHL) řadíme: difuzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL), Burkittův lymfom (BL), folikulární lymfom (FL), lymfom z pláštěových buněk (MCL) a lymfom z buněk marginální zóny (MZL) (Rokyta *et al.*, 2015). Správné rozlišení jednotlivých kategorií je důležité vzhledem k rozdílné povaze subtypů, odlišení patogeneze a léčbě.



Obrázek č. 3: Schéma vzniku B-lymfoproliferací v průběhu zrání B-lymfocyty (převzato z Klein *et Dalla-Favera*, 2008)

[Type here]

3.2.1 Folikulární lymfom

Folikulární lymfom je běžné, obvykle nodální lymfoproliferativní onemocnění. Patří do skupiny indolentních lymfomů, ale často se transformuje do jiného high-grade onemocnění (například DLBCL). Je to jeden z nejčastějších low-grade B-NHL a tvoří až 25 % případů všech lymfomů. FL postihuje stejně často jak muže, tak i ženy a obecně jím trpí převážně starší lidé (Swerdlow *et al.*, 2017). Medián přežití se v posledních letech změnil z přibližně 10 let na 12 - 18 let, a to hlavně díky novým terapeutickým přístupům (Ghielmini *et Montoto*, 2015).

Maligními buňkami jsou u FL malé lymfocyty s pozměněnou expresí genu *BCL2*. Hlavní funkcí genu *BCL2* je především zabránění vstupu buňky do apoptózy. U FL se typicky vyskytuje translokace t(14;18)(q32,q21) s fúzí genů *IGH* a *BCL2*. Gen *BCL2* se translokuje na chromozom 14 ve stejné transkripční orientaci, jako gen *IGH*, díky čemuž nedochází k zastavení transkripce a vzniká chimérická RNA. Obě alely (wild type i aberantní) produkují protein o velikosti cca 25 kDa (Korsmeyer, 1999). Díky této translokaci dochází u maligních buněk ke zvýšení exprese genu *BCL2* vlivem enhanceru genu *IGH*. Tím dochází ke zvýšení hladiny antiapoptotického proteinu BCL2, což nádorovým buňkám poskytuje výhodu pro přežití oproti normálním buňkám. FL může infiltrovat kostní dřeň a příležitostně i periferní krev (Swerdlow *et al.*, 2017).

Folikulární lymfom je tvořen malými až středně velkými buňkami s členěným jádrem (centrocyty) a velkými buňkami s kulatým jádrem a několika jadérky vázanými k buněčné membráně (centroblasty). Po spočítání centroblastů může být FL rozdělen do několika stupňů (I-III). Buňky FL exprimují znaky CD19, CD20, CD10 a jsou pozitivní na barvení BCL2 (Swerdlow *et al.*, 2017).

Pro určení prognózy pacientů s FL se používá klinické prognostické skóre FLIPI (Follicular Lymphoma International Prognostic Index), které se stanovuje při diagnóze. Existuje ale také FLIPI-2, které bere v potaz dobu do progresu onemocnění. FLIPI-2 pomáhá určit tzv. high-risk pacienty pro které je vhodná agresivnější terapie. Mezi rizikové faktory patří věk nad 60 let, zvýšená hladina beta 2-mikroglobulinu, hemoglobin méně než 120 g/l, infiltrace kostní dřeně a velikost uzliny více než 6 cm. FLIPI-2 dělí pacienty do tří skupin a to podle počtu rizikových faktorů – nízké riziko (0), střední riziko (2), vysoké riziko (3 a více) (Federico *et al.*, 2009).

Léčba se odvíjí od toho, zda jsou přítomny symptomy onemocnění. Pokud symptomy přítomny nejsou, pacienti jsou pouze sledováni (strategie watch and wait) anebo je jim indikován rituximab s radoterapií. Pokud jsou přítomny symptomy nebo dochází k rozvoji

[Type here]

onemocnění, je zahájena léčba, která zahrnuje podání 6 - 8 cyklů chemoterapie + 8x rituximab (Belada *et al.*, 2018).

3.2.2 Burkittův lymfom

Burkittův lymfom je velmi vzácné vysoce agresivní onemocnění s typickým imunofenotypem a cytogenetickým nálezem. V Evropě a v USA se vyskytuje sporadicky (0,2-0,3/100 000 obyvatel), v rovníkové části Afriky je jeho incidence vyšší (Swerdlow *et al.*, 2017). Pro BL je charakteristická translokace genu *MYC* do blízkosti genů pro imunoglobuliny, které se nachází na chromozomech 2, 14 a 22. Nejčastější je translokace t(8;14)(q24;q32), při které dochází ke vzniku fúzního genu *MYC/IGH*. Díky této translokaci se onkogen *MYC* dostává do blízkosti zesilovače transkripce genu pro řetězce IG. Dochází k overexpresi genu *MYC*, což vede k nádorovému procesu. *MYC* se podílí na regulaci buněčného cyklu a apoptózy, ovlivňuje diferenciaci, růst a proliferaci. Další variantou mohou být translokace t(2;8)(p12;q24) nebo t(8;22)(q24;q11). Buňky exprimují znaky CD10, CD19, CD20, CD22 a CD79a a často i bcl-6. Asi u třetiny případů je také mutován tumorsupresorový gen *TP53* (Adam *et al.*, 2008). BL patří mezi nejagresivnější tumory, jehož hodnota KI₆₇ dosahuje až 100 %. Podle vzniku a výskytu se BL dělí do tří skupin:

- a) Endemický: je téměř vždy asociován s infekcí virem Epstein-Barrové (EBV). Vyskytuje se v Africe a projevuje se poškozením čelisti.
- b) Sporadický: vyskytuje se většinou v Evropě a v USA. Nebývá asociován s virem EBV a projevuje se mimouzlinovým postižením především v dutině břišní.
- c) Burkittův lymfom asociovaný s HIV infekcí. (Adam *et al.*, 2008, Hatton *et al.*, 2014)

Léčba tohoto onemocnění je velmi agresivní a spočívá v podání velkého množství cytostatik v krátké době. Kompletní remise dosáhne až 80 % pacientů (Adam *et al.*, 2008). Dlouhodobě přežívá na 70 - 90 % pacientů (Swerdlow *et al.*, 2017).

3.2.2.1 Burkitt-like lymfom s aberací 11q

Burkitt-like lymfom s aberací 11q (BLL-11q) je svou morfologií a genovým expresním profilem velmi podobný klasickému BL, na rozdíl od něj ale nemá přestavěný gen *MYC* a vyznačuje se komplexnějším karyotypem. Typickou chromozomovou aberací tohoto subtypu jsou změny na dlouhém raménku chromozomu 11. Konkrétně se jedná o přítomnost nadbytečného genetického materiálu proximálně (11q23.2-23.3) a o ztráty genetického

[Type here]

materiálu v oblasti telomer (11q24.1-ter). Rovněž se u BLL-11q nevyskytuje ztráta oblasti 1q, která je velmi frekventovaná u BL (Swerdlow *et al.*, 2017).

Další častou změnou u BLL-11q je přítomnost nadbytečného genetického materiálu v oblasti 12q12-q21.1 a ztráta genetického materiálu v oblasti 6q12.1-q21. BLL-11q vznikl s největší pravděpodobností z buněk z germinálního centra a je více příbuzný „high grade“ B-buněčnému lymfomu (HGBL) nebo DLBCL, než klasickému BL (Gonzalez-Farre *et al.*, 2019).

3.2.3 Lymfom z plášťových buněk

Lymfom z plášťových buněk (mantle cell lymphoma) je agresivní B-NHL, který představuje pouze 3 – 10 % všech lymfomů. Ze všech B-buněčných lymfomů má nejhorší prognózu. Vyskytuje se u pacientů středního nebo staršího věku (medián je 60 let) a častěji postihuje muže než ženy. Incidence je 2 – 3 případy na 100 000 obyvatel za rok. Medián přežití se pohybuje v rozmezí 3 – 5 let (Swerdlow *et al.*, 2017).

Obecně jsou rozlišovány dva typy MCL buněk. Klasické MCL buňky jsou středně velké s nepravidelným jádrem, oproti tomu agresivnější blastoidní buňky jsou velké s rozptýleným chromatinem. Buňky vykazují expresi CD19+, CD20+, CD79a+ a CD5+. Typickou cytogenetickou změnou u MCL je translokace t(11;14)(q13;q32) s fúzí genů *CCND1* a *IGH*. Gen pro cyklin D1 je translokován do blízkosti enhanceru genu pro těžký řetězec imunoglobulinu, čímž dochází k jeho overexpresi, a tím ke zvýšení proliferace a inhibici apoptózy. U MCL jsou také časté různé další sekundární cytogenetické změny, jakými jsou mutace nebo delece genů *ATM* nebo *TP53* a přítomnost komplexního karyotypu. Všechny tyto změny souvisí s kratším celkovým přežíváním (Obr *et al.*, 2018).

Pro zařazení pacientů do prognostických skupin slouží klinické prognostické skóre MIPI (Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index). MIPI skóre je založeno na věku, hladině laktátdehydrogenázy, absolutním počtu leukocytů a na fyzickém stavu pacienta. Důležitým prognostickým faktorem je rovněž hodnota Ki_{67} . Prognostické skupiny jsou celkem tři a k dělení do nich dochází na základě rizikivosti (Hoster *et al.*, 2008).

Léčba MCL je stále nejasná a je závislá především na věku a fyzickém stavu pacienta. Pacienti do 65 let, kteří jsou schopni vysokodávkové terapie podstupují intenzivní chemoterapii a následně transplantaci kostní dřeně. Poté je indikována udržovací léčba. Pacientům, kteří nejsou vhodní k takto intenzivní chemoterapii, jsou indikovány režimy založené na alkylačních látkách v kombinaci s rituximabem (Belada *et al.*, 2018).

[Type here]

3.2.4 Lymfom marginální zóny

Nižším stupněm malignity jsou lymfomy marginální zóny, které můžeme rozdělit do několika podskupin:

- a) Extranodální lymfom marginální zóny nebo lymfom z marginální zóny slizniční lymfoidní tkáně (MALT): typicky postihují játra, žaludek, štítnou žlázu a slinné žlázy
- b) Splenický lymfom marginální zóny
- c) Nodální lymfom marginální zóny

MALT lymfom představuje 7 – 8 % všech B-NHL a více než 50 % všech primárních gastrických lymfomů. Postihuje převážně dospělé jedince (muže stejně často jako ženy) s mediánem věku 70 let. Tyto lymfomy jsou asociovány s autoimunitními onemocněními, jakými jsou např. Hashimotova thyreoiditida, Sjögrenův syndrom nebo také s bakteriálními infekcemi. Imunofenotyp není přesně definován, nicméně buňky vykazují pozitivitu pro znaky CD19, CD20 a IgM a negativitu pro znaky CD5, CD10 a CD23 (Swerdlow *et al.*, 2017). Mezi tři nejčastější cytogenetické změny patří translokace t(11;18)(q21;q21), t(14;18)(q32;q21) a t(1;14)(p22;q32). Translokace t(11;18) s fúzí genů *API2/MALT1* je příčinou 20 – 50 % žaludečních MALT lymfomů a značí tendenci k transformaci do vyššího stupně malignity, např. DLBCL. Gen *API2* se podílí na inhibici apoptózy skrz inhibici kaspáz, např. kaspázy-3, kaspázy-7 nebo pro-kaspázy-9 a je evolučně konzervován u mnoha různých druhů (Dierlamm *et al.*, 1999).

Nejčastější formou lymfomu marginální zóny je MALT lymfom žaludku. Postihuje především pacienty starší 50 let. Hlavním příznakem je dlouhotrvající dyspepsie. Příznaky lymfomu marginální zóny ostatních orgánů, jakými jsou např. štítná žláza nebo slinné žlázy je pocení a lokální bolest postiženého místa.

MALT lymfomy mohou být v časných stádiích léčeny antibiotiky, jelikož jsou spojeny s infekcí bakterií *Helicobacter pylori* (Hatton *et al.*, 2014). Dále se k léčbě MALT lymfom využívá podání 6 – 8 dávek rituximabu, R-CHOP, splenektomie nebo radioterapie na oblast sleziny (Belada *et al.*, 2018).

3.3 Difuzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL)

DLBCL je difuzně rostoucí nádor z velkých B-lymfocytů. Představuje až 30 % všech NHL v západních zemích avšak nejčastěji se vyskytuje v zemích rozvojových. Jeho incidence za poslední tři dekády vzrostla. Patří mezi agresivní, tzv. high-grade lymfomy. Etiologie je neznáma; většina DLBCL vzniká *de novo*, avšak některé vznikají v důsledku transformace již

[Type here]

existujícího indolentního NHL (Swerdlow *et al.*, 2017). DLBCL se objevuje u pacientů jakéhokoliv věku, ovšem nejčastěji se vyskytuje ve středním nebo vyšším věku. Medián věku při diagnóze je 60 let. Mezi hlavní příznaky patří lymfadenopatie, teploty, noční pocení a ztráta hmotnosti (Adam *et al.*, 2008). Mezi rizikové faktory pro vznik DLBCL patří infekce virem hepatitidy C, infekce virem HIV, rodinný výskyt lymfomů nebo nadváha (Tilly *et al.*, 2015).

U 20 -30 % případů má DLBCL mimouzlinový původ. Může vznikat v centrální nervové soustavě (CNS), v kostech nebo v zažívacím traktu. U 22 % pacientů je infiltrovaná kostní dřev, v 16 % případů je postižen gastrointestinální trakt, v 11 % pak játra a v 9 % plíce (Adam *et al.*, 2008).

DLBCL je charakteristický difuzní proliferací velkých nepravidelných buněk. Tyto buňky exprimují znaky CD19, CD20, CD79a, IgM a variabilně pak CD10, bcl-2 a bcl-6 . Znak bcl-6 je exprimován asi v 60 % případů (Ghielmini *et Montoto*, 2015).

Pro zařazení pacientů do rizikových skupin je zásadní věk (> 60 let), stav tělesné kondice, hladina laktátdehydrogenázy, rozsah nemoci dle Ann Arbor a počet extranodálních lokalit lymfomu. Pacienti jsou pak na základě prognostického skóre IPI (International Prognostic Index), které může nabývat až 5 hodnot, rozděleni do čtyř skupin (viz. Tabulka č. 1) (Shipp *et al.*, 1993). Pro pacienty, kteří jsou mladší, než 60 let, byl vytvořen tzv. age-adjusted IPI (aaIPI), který zohledňuje pouze tři hodnocené faktory a to klinické stádium, hladinu laktátdehydrogenázy a stav tělesné kondice (Procházka, *et al.*, 2009). Rovněž existuje tzv. R-IPI skóre (Revised International Prognostic Index), které rozděluje pacienty do tří prognostických skupin (velmi dobrá, dobrá a špatná) a predikuje přežití pacientů léčených rituximabem (viz Tabulka č. 1) (Sehn *et al.*, 2007).

Tabulka č. 1: Rozdělení pacientů na základě IPI a R-IPI skóre do jednotlivých prognostických skupin a jejich celkové 4 - leté přežití (převzato a upraveno podle Sehn *et al.*, 2007)

Riziková skupina	Počet rizikových faktorů	4 - leté celkové přežití (%)
IPI		
Nízké	0, 1	82
Nízké střední	2	81
Vysoké střední	3	49
Vysoké	4, 5	59
R-IPI		
Velmi dobré	0	94
Dobré	1, 2	79
Špatné	3, 4, 5	55

[Type here]

3.3.1 Klasifikace DLBCL

„Difuzní velkobuněčný B-lymfom zahrnuje tři typy lymfomů, dle Kielské klasifikace, centroblastický, imunoblastický a velkobuněčný anaplastický lymfom B-typu.“ (Adam *et al.*, 2008). Na základě morfologických, biologických a klinických studií došlo ve 4. revidovaném vydání WHO klasifikace (World Health Organization) z roku 2017 k rozdělení DLBCL na několik jednotek (viz Tabulka č. 2). Jelikož je ale DLBCL velmi heterogenní onemocnění, některé případy není možné zařadit do jasně definovaných podskupin. Tyto případy jsou proto klasifikovány jako DLBCL, NOS.

Tabulka č. 2: Klasifikace velkobuněčného B-lymfomu podle WHO (2017)

Difuzní velkobuněčný B-lymfom, blíže nespecifikovaný (DLBCL, NOS)
Morfologické varianty: <ul style="list-style-type: none">• centroblastický• imunoblastický• anaplastický• ostatní vzácné varianty
Molekulární subtypy: <ul style="list-style-type: none">• DLBCL z germinálního centra (GCB-DLBCL)• DLBCL z aktivovaných B-buněk (ABC-DLBCL)
Ostatní velkobuněčné lymfomy
velkobuněčný B-lymfom bohatý na histiocyty a T-lymfocyty
primární difuzní velkobuněčný B-lymfom CNS
primární kožní difuzní velkobuněčný B-lymfom, „leg type“
EBV-pozitivní difuzní velkobuněčný lymfom, blíže nespecifikovaný
difuzní velkobuněčný B-lymfom asociovaný s chronickým zánětem
lymfomatoidní granulomatóza
velkobuněčný lymfom s přestavbou IRF4
primární mediastinální (tymický) velkobuněčný B-lymfom
intravaskulární velkobuněčný B-lymfom
ALK-pozitivní velkobuněčný B-lymfom
plazmablastický lymfom
HHV8-pozitivní difuzní velkobuněčný B-lymfom*
primární exsudativní lymfom
High-grade B-buněčné lymfomy
high-grade B-buněčný lymfom s přestavbou MYC a BCL2 anebo BCL6
high-grade B-buněčný lymfom, blíže nespecifikovaný
B-buněčný lymfom, nespecifikovaný
B-buněčný lymfom, nespecifikovaný, s rysy mezi DLBCL a klasickým Hodgkinovým lymfomem

*dočasná kategorie

DLBCL, NOS má tři nejčastější morfologické varianty: centroblastickou, imunoblastickou a anaplastickou, avšak je známo i několik vzácných variant. Centroblastický DLBCL, NOS je nejčastější a je charakteristický přítomností středních až velkých lymfoidních buněk s bazofilní cytoplazmou a s jádrem, které obsahuje jemný chromatin. Typická je také přítomnost 2 – 4 jadérek, která jsou vázána na jadernou membránu. Imunoblastická varianta musí obsahovat více, než 90 % imunoblastů s bazofilní cytoplazmou, velkým oválným jádrem a jedním centrálně uloženým jadérkem. Pro morfologii anaplastické varianty je typická přítomnost jednoho velkého pleiomorfního jádra v buňkách, které připomínají

[Type here]

Hodgkin/Sternbergovy buňky nebo buňky podobné anaplastickému velkobuněčnému lymfomu (Chen *et al.*, 2019).

3.3.2 Léčba

Léčebná strategie je volena s ohledem na IPI, aa-IPI a R-IPI skóre. U mladších DLBCL pacientů (věk do 65 let) s nízkým IPI se nejčastěji používá 6 cyklů R-CHOP (rituximab, cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison). V případě PET pozitivního rezidua je doporučena radioterapie. Pro mladší pacienty s vyšším rizikem a s přítomností nádorové masy > 7 cm se standardně používá 6 - 8 cyklů CHOP-21 + 8 x rituximab a následně je možno využít radioterapii. Starším pacientům (věk nad 65 let) je podáváno 6 cyklů CHOP-21 + 8 x rituximab. Pacienti s dobrým zdravotním stavem jsou indikováni k autologní transplantaci. Terapeutickým cílem je dosažení CR (kompletní remise). Pokud CR dosaženo, zejména u mladších pacientů není, je indikováno pokračování léčby (Belada *et al.*, 2018).

3.3.3 Difuzní velkobuněčný B-lymfom, blíže nespecifikovaný (DLBCL, NOS = not otherwise specified)

Do skupiny DLBCL, NOS řadíme ty případy DLBCL, které nespĺňují kritéria pro zařazení do jiných skupin DLBCL. Na základě profilů genové exprese, může být skupina DLBCL, NOS dělena podle buněčného původu (cell of origin) na dva subtypy:

1. GCB-DLBCL (germinal center B-cell) – lymfom vzniklý z B-buněk z germinálního centra, s fenotypem CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, CD10+ a BCL2+
2. ABC-DLBCL (activated B-cell) – lymfom původem pravděpodobně z aktivovaných B-lymfocytů, s fenotypem CD10-, MUM1+ a BCL2-

ABC-DLBCL má výrazně horší prognózu a hůř reaguje na léčbu, než GCB-DLBCL. Pětileté přežití u GCB-DLBCL je 59 %, kdežto u subtypu ABC-DLBCL pouze 34 % (Armitage *et al.*, 2009). Jednotlivé subtypy se neliší pouze svými genovými expresními profily, ale také chromozomovými aberacemi a rekurentními mutacemi.

3.3.4 Rekurentní chromozomové a genové aberace DLBCL, NOS

Frekvence mutací mnoha genů je závislá na buněčném původu daného subtypu, jiné se vyskytují jak u GCB, tak u ABC-DLBCL. Například mutace v genech *EZH2* a *GNAI3* se

[Type here]

vyskytují výlučně u subtypu GCB, kdežto mutace genů *CARD11*, *MYD88* nebo *CD79B* jsou charakteristické pro subtyp ABC (Swerdlow *et al.*, 2017).

3.3.4.1 Rekurentní genetické aberace GCB-DLBCL

Genová exprese GCB-DLBCL je podobná, jako exprese normálních B-buněk germinálního centra. U 35 % případů dochází k translokaci t(14;18), která vede k ektopické expresi genu *BCL2*. U 40 % případů, u kterých nenastala t(14;18), dochází ke koexpresi *BCL2* a *BCL6* následkem deregulace genu *Miz1* (koaktivátor molekuly, skrze kterou se *BCL6* váže na promotor genu *BCL2*), aberantní somatickou hypermutací promotoru *BCL2* a mutací v *BCL2* kódující sekvenci. Ve 12 % GCB-DLBCL se vyskytuje amplifikace oblasti *MIGH1*, která obsahuje mikroRNA klastr, který je potencionálním onkogenem. Díky tomuto klastru dochází ke zvýšení proliferace skrz inhibici tumor supresorového genu *PTEN* a proapoptického proteinu BIM. Delece genu *PTEN* se s vyšší frekvencí vyskytuje u GCB-DLBCL, než u subtypu ABC. U 22 % GCB-DLBCL se vyskytuje mutace onkogenu *EZH2*, který kóduje histonmetyltransferázu. Další metyltransferáza, *MLL2*, je mutována až u 30 % všech DLBCL. Častěji je u GCB-DLBCL identifikována také monoalelická delece nebo mutace genů *CREBBP* a *EP300*. *Crebbp* a *Ep300* jsou acetyltransferázy, které fungují jako transkripční koaktivátory v různých signálních drahách. Proteiny, vzniklé z mutovaných genů ztrácí schopnost acetylace a tím dochází ke snížení aktivity tumor supresorových genů nebo naopak k aktivaci onkogenů (Schneider *et al.*, 2011). U GCB-DLBCL dochází často ke zmnožení oblastí 2p16 (*REL*) nebo 8q24 (*MYC*) a k deleci oblastí 1p36 (*TNFRSF14*) nebo 10q23 (Urbánková *et Procházka*, 2020).

3.3.4.2 Rekurentní genetické aberace ABC-DLBCL

Genová exprese buněk subtypu ABC-DLBCL je podobná expresi normálních aktivovaných B-lymfocytů. Základním rysem genové exprese ABC-DLBCL je konstitutivní aktivace signální dráhy NF- κ B. U 25 % všech ABC-DLBCL se vyskytuje amplifikace telomerické oblasti na dlouhém raménku chromozomu 19, na kterém se nachází gen *SPIB*. Gen *SPIB* může rovněž vstupovat do translokace s genem *IGH* (Lenz *et al.*, 2008). Ve 30 % ABC-DLBCL je pozorována delece lokusu *INK4a/ARF*. Proteiny *INK4a* a *ARF* regulují dráhy proteinů p53 a pRB a jejich inaktivace vede k inhibici apoptózy a k agresivní lymfoproliferaci (Schneider *et al.*, 2011). Pro subtyp ABC-DLBCL je typické zmnožení oblastí 3q27 (*BCL6*), 11q23 – q24 a 18q21 (*BCL2*) a delece 6q21 (*PRDM1*) a 9q21 (*CDKN2A*) (Urbánková *et Procházka*, 2020).

[Type here]

Tabulka č. 3: Genetické změny asociované s GCB a ABC DLBCL

GCB-DLBCL		ABC-DLBCL	
Gen	Genetická aberace	Gen	Genetická aberace
<i>BCL2</i>	t(14;18), mutace	<i>BCL2</i>	amplifikace
<i>MYC</i>	t(8;14), t(2;8), t(8;22)	<i>PRDM1</i>	bialelická mutace, delece
<i>PTEN</i>	delece	<i>INK4a/ARF</i>	delece
<i>BCL6</i>	mutace, t(3;?)	<i>BCL6</i>	t(3;?)

3.3.4.3 Chromozomové translokace

Do translokací nejčastěji u DLBCL vstupují geny *MYC* (8q24), *IGH* (14q32), *BCL2* (18q21) a *BCL6* (3q27). Translokace se nejčastěji vyšetřují pomocí molekulární cytogenetiky metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Metoda FISH se může provádět jak na nativním materiálu, tak na parafinových řezech (FFPE). Jelikož často nativní materiál vhodný pro karyotypizaci není dostupný, není možno využít klasickou cytogenetiku.

MYC

Gen *MYC* se nachází na dlouhém raménku chromozomu 8 v pruhu 24 (8q24). Řadí se mezi onkogeny a kóduje transkripční faktor, který reguluje růst, proliferaci, diferenciaci a apoptózu. Narušení regulace genu *MYC* vede k onkogenezi. Proteinem MYC je řízeno přibližně 15 % všech lidských genů, mezi které se řadí geny zapojené v kontrole buněčného cyklu, geny ovlivňující metabolismus, proteosyntézu, remodelování chromatinu a sebeobnovu kmenových buněk (Chisholm et al., 2015). Rovněž downreguluje nádorovou proliferaci tím, že ovlivňuje apoptotickou dráhu, řízenou genem *TP53*. Gen *MYC* je zapojen v patogenezi DLBCL a Burkittova lymfomu. Přestavba *MYC* je pozorována u 7 – 21 % případů DLBCL. Zlom v genu *MYC* může nastat *de novo* jako jediná změna nebo se může vyskytovat v kombinaci s translokacemi genů *BCL2* anebo *BCL6*. Většina DLBCL s přestavbou genu *MYC* má fenotyp GCB. Na rozdíl od Burkittova lymfomu, u kterého je gen *MYC* klasicky translokován do blízkosti genů pro imunoglobuliny (většinou se jedná o gen *IGH*, vzácněji o *IGK* nebo *IGL*), u většiny DLBCL jsou jeho translokačními partnery non-IG geny (např. *BCL6* nebo *PAX5*). Translokace *MYC* s genem pro imunoglobuliny má u DLBCL negativní vliv na celkové přežití (Copie-Bergman et al., 2015).

[Type here]

BCL2

Gen *BCL2* je lokalizován na chromozomu 18 v pruhu q21. Kóduje integrální protein, který je součástí vnější mitochondriální membrány a který se podílí na inhibici apoptózy. Tento protein o hmotnosti 26 kDa je tvořen pěti doménami, z nichž čtyři jsou BCL2-homologní, a jedna je transmembránová (Bouchalová *et al.*, 2016).

Gen *BCL2* patří do rodiny BCL2 proteinů, která obsahuje jak proapoptotické (*BAX*, *BAK*), tak antiapoptotické (*BCL2*, *BCL-XL*) geny. Častým translokačním partnerem je gen *IGH* (14q32). Translokace t(14;18)(q32;q21) je typická především pro folikulární lymfom, ale vyskytuje se i u přibližně 20 % DLBCL fenotypu GCB. Při této translokaci se gen *BCL2* dostane do blízkosti enhanceru pro gen *IGH* a tím dochází k jeho overexpresi. U ABC DLBCL je pozorována amplifikace genu *BCL2* nebo jeho transkripční upregulace skrze konstitutivní aktivaci nukleárního faktoru κ B (Schuetz *et al.*, 2012). Overexprese proteinu BCL2 u DLBCL je asociována se špatnou prognózou (Hermine *et al.*, 1996).

BCL6

Gen *BCL6* se nachází na chromozomu 3 v pruhu q27. Je to transkripční represor, který je hlavním regulátorem vývoje B lymfocytů v germinálním centru. Ovlivňuje různé cílové geny, např. *ATM*, *BCL2* nebo *TP53* (Šmardová *et al.*, 2013). Inhibuje apoptózu, reguluje buněčný cyklus, odpověď na poškození DNA, proliferaci a diferenciaci.

Přestavba genu *BCL6* se vyskytuje u 25 – 30 % DLBCL subtypu ABC. U fenotypu GCB je detekována přibližně v 15 % případů (Swerdlow *et al.*, 2017). *BCL6* vstupuje do translokace jak s geny pro imunoglobuliny, tak non-Ig geny. Nejčastějším typem je translokace t(3;14)(q27;q32) s fúzí genů *BCL6/IGH*. Méně častěji dochází k translokacím t(3;22)(q27;q11) zahrnující gen pro lehký řetězec *IGL* a t(2;3)(p12;q27) zahrnující gen *IGK*. Mezi non-Ig translokační partnery genu *BCL6* patří například gen *Ikaros*, gen pro histon H4 nebo gen pro transferinový receptor (Ueda *et al.*, 2009).

3.3.5 High-grade B-buněčné lymfomy s přestavbami *MYC* a *BCL2* nebo *BCL6*

Jak už bylo uvedeno výše, podle WHO klasifikace byla zavedena nová specifická kategorie high-grade B-buněčných lymfomů (HGBL) s přestavbou genů *MYC* a *BCL2* nebo *BCL6*, takzvané „double-hit“ případně „triple-hit“ lymfomy. Dříve byly tyto případy řazeny do skupiny High-grade B-buněčný lymfom, blíže nespecifikovaný. O „double-hit“ lymfomu

[Type here]

(DHL) mluvíme v případě přestavby genu *MYC* zároveň s přestavbou genů *BCL2* nebo *BCL6*. V případě „triple-hit“ lymfomu (THL) dochází k současné přestavbě všech tří zmíněných genů (Swerdlow *et al.*, 2017). Zatímco „double-hit“ lymfomy jsou typicky pozorovány u subtypu GCB, současná exprese těchto genů je pozorována u obou subtypů (ABC i GCB) v 19 – 34 % případů a je asociována s horší prognózou oproti pacientům s expresí pouze genu *MYC*. Lymfomy s double expresí mají středně dobrou prognózu a jsou řazeny na rozhraní kategorií DLBCL, NOS a DHL (Rosenthal *et al.*, 2017). Mezi nově diagnostikovanými DLBCL představují DHL/THL HGBL cca 10 % všech případů. Pro pacienty s DHL nebo THL je typická špatná odpověď na standardní terapii (rituximab, cyclophosphamid, doxorubicin, vincristin, prednison, RCHOP) a v porovnání s klasickým DLBCL je také typické kratší celkové přežití (Stephens *et al.*, 2018).

Přestavba genu *BCL2* nastává pouze v germinálním centru tumoru jako časná událost. Naopak k přestavbě genu *MYC* dochází sekundárně. Agresivní průběh onemocnění a špatná odpověď na léčbu u DHL/THL jsou v kontrastu s příznivou prognózou, která je přičítána subtypu GCB. Pro stanovení prognózy a pro volbu vhodné terapie je velmi důležitá molekulární diagnostika. Lymfomy s přestavbou *MYC* a *BCL6* jsou méně časté, než ty s přestavbou *MYC* a *BCL2*. Často patří k ABC subtypu a nejsou tolik komplexní (Rosenthal *et al.*, 2017). *MYC/BCL2* lymfomy se na rozdíl od *MYC/BCL6* lymfomů mnohdy vyskytují spolu s mutací v genu *TP53*, což představuje výhodu pro klonální vývoj *MYC/BCL2* DHL. Díky přítomnosti mutace *TP53* se onemocnění stává agresivnější a klinicky může vypadat jako Burkittův lymfom (Gebauer *et al.*, 2014). Mutaci u DHL/THL podléhají nejčastěji geny podílející se na buněčném cyklu a apoptóze a geny podílející se na epigenetické regulaci (Evrard *et al.*, 2019).

Mezi prognostické faktory u DLBCL patří i přítomnost více kopií genů *MYC* a *BCL2*. Extra kopie genu *MYC* byly pozorovány u 2 – 20 % pacientů s DLBCL a jsou zodpovědné za zvýšení jeho exprese. Přítomnost více kopií genů *MYC* a *BCL2* je asociována s kratším celkovým přežitím, oproti pacientům s normálním počtem kopií. Nicméně vyšší počet kopií genu *BCL6* nemá žádný prognostický význam. Při porovnání DLBCL pacientů, kteří měli více kopií zmíněných genů, a pacientů s přestavbami těchto genů nebyl pozorován žádný rozdíl v celkovém přežití (Huang *et al.*, 2019).

DHL nebo THL se dá predikovat podle míry proliferace (hodnoty Ki-67). Ki-67 je protein, jehož exprese je stanovena pomocí imunohistochemického vyšetření a je považován za marker proliferace. Jelikož pacienti s HGBL mají prokázanou zvýšenou expresi genu *MYC*, což vede ke zvýšené buněčné proliferaci, měly by všechny DHL/THL buňky vykazovat vysokou hodnotu Ki-67 (>80 %). Ve skutečnosti tomu tak ale u některých pacientů není, tudíž je tento marker nespolehlivý (Stephens *et al.*, 2018).

[Type here]

Jak už bylo řečeno, pacienti s DHL/THL mají horší odpověď na léčbu oproti pacientům s klasickým DLBCL. Z tohoto důvodu se u nich jeví jako vhodnější léčba intenzivnějšími režimy. I přes jejich použití jsou DHL/THL pacienti ke kombinované terapii refrakterní, a proto je nutné vyvíjet nové terapeutické modely (Shaoying *et al.*, 2016, Phuoc *et al.*, 2019). Novinkou na poli léčby je zavedení tzv. CAR T-cell terapie.

[Type here]

4. Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Pro vyšetření se používají vzorky nádorové tkáně, nejčastěji lymfatické uzliny. Příprava preparátu probíhá na pracovišti Imunohistochemické laboratoře Ústavu patologie Fakultní nemocnice Olomouc. Tkáň je fixována formalinem v parafinovém bločku (FFPE), který je nařezán pomocí mikrotomu na jednotlivé řezy o tloušťce 2 μm . Ty jsou umístěny na pozitivně nabitě podložní sklo a zafixovány

4.2 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

Příjem a zpracování biopsie probíhá na pracovišti Imunohistochemické laboratoře Ústavu patologie Fakultní nemocnice Olomouc.

1. Biologický materiál je přijímán ve fixačním roztoku (10% formol).
2. Tkáň je označena identifikačním číslem biopsie. Bioptický materiál malých rozměrů je zpracován kompletně, objemnější částice jsou prokrájeny.
3. Následuje odvodnění tkáně: 1 x 90 minut v 70% etanolu, 1 x 60 minut v 80% etanolu a 5 x 60 minut v 96% etanolu.
4. Poté je vzorek přenesen do roztoku acetonu, kde je inkubován 60 minut.
5. Následuje inkubace v xylenu 2 x 60 minut.
6. Poté je tkáň prosycena teplým parafinem (60 minut) a následuje zalití tkáně do očíslované kazety a vytvoření parafinového bločku, který je po ztuhnutí (210 minut) určený ke krájení na mikrotomu.
7. Parafinový bloček je krájen na mikrotomu na tenké tkáňové řezy o tloušťce 2 μm , které jsou nachytány na podložní skla a usušeny v termostatu (1 hodinu při 58 °C, poté do druhého dne při 37 °C).

FISH NA FFPE ŘEZECH:

Pro molekulárně cytogenetické vyšetření se používá metoda fluorescenční *in situ* hybridizace. Základním principem metody FISH je navázání fluorescenčně značené sondy na specifickou sekvenci nukleotidů. Po denuraci DNA a specifické sondy dochází k hybridizaci sondy na požadovaný úsek DNA. Pro to, aby bylo možné použít metodu FISH na parafinových řezech, je nutné nejprve odstranit parafin z preparátu a následně natrávit buňky pomocí pepsinu.

[Type here]

Pro vlastní provedení byl použit Histology FISH Accessory Kit Dako

1. Sklíčko s preparátem zahříváme na plotýnce při 65 °C po dobu 10 minut.
2. Preparát inkubujeme v xylenu 2 x po 5 minutách při laboratorní teplotě.
3. Následuje inkubace v 96% etanolu 2 x po 2 minutách a v 70% etanolu 1 x 2 minuty při laboratorní teplotě.
4. Preparát inkubujeme v naředěném Wash buffer 2 minuty při laboratorní teplotě.
5. Sklíčko vložíme do 2x SSC vyhřátého na 96 °C a inkubujeme 15 minut.
6. Následně sklíčko inkubujeme v naředěném Wash buffer 3 minuty při laboratorní teplotě.
7. Sklíčko s preparátem lehce usušíme na plotýnce při 37 °C a přidáme 250 µl studeného pepsinu. Zakryjeme parafilmem a necháme inkubovat 5-10 minut podle typu tkáně (v případě lymfatické uzliny nejčastěji 7 minut) při 37 °C.
8. Poté preparát inkubujeme 2 x 3 minuty v naředěném Wash buffer při laboratorní teplotě.
9. Následuje odvodnění preparátu v 70%, 80% a 90% etanolu po 2 minutách.
10. Sklíčko usušíme na plotýnce při 45 °C a pipetujeme 5 – 10 µl sondy, v závislosti na velikosti řezu.
11. Přiklopíme krycí sklo a okraje zalepíme rubber-cementem, aby nedošlo k vyschnutí vzorku.
12. Denaturace probíhá podle pokynů výrobce (u sond ZytoVision 10 minut při 75 °C).
13. Po uplynutí doby sklo vložíme do vlhké komůrky a necháme ho zde inkubovat při 37 °C do druhého dne.
14. Další den sloupneme krycí sklo a podložní sklo s preparátem vložíme do 0,4x SSC + 0,3% NP40 vyhřátého na 73 °C. Inkubujeme 2 minuty.
15. Následně sklo vložíme do 2x SSC + 0,1% NP40 a inkubujeme 2 minuty při laboratorní teplotě.
16. Sklíčko vyjmeme a osušíme na plotýnce při 45 °C.
17. Pipetujeme 10 µl DAPI a přikryjeme novým krycím sklem.

Preparát hodnotíme pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus) a softwaru ISIS (MetaSystems) s příslušnými fluorescenčními filtry. Hodnotíme celý preparát, případně 7 – 10 různých míst, přičemž se zaměřujeme na okraje preparátu, kde se oddělují jednotlivé buňky, které se nepřekrývají.

V Laboratoři cytogenetiky a molekulární cytogenetiky Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice v Olomouci (LCG HOK FNOL) se u lymfomů standardně používají komerčně dostupné genové sondy od firmy ZytoVision, kde je každý lokus označen jiným

[Type here]

fluorochromem (FITC nebo spectrum orange). Dále byly pro doplnění vyšetření použity i sondy od jiných výrobců (viz Tabulka č. 4).

[Type here]

Tabulka č. 4: Seznam použitých sond

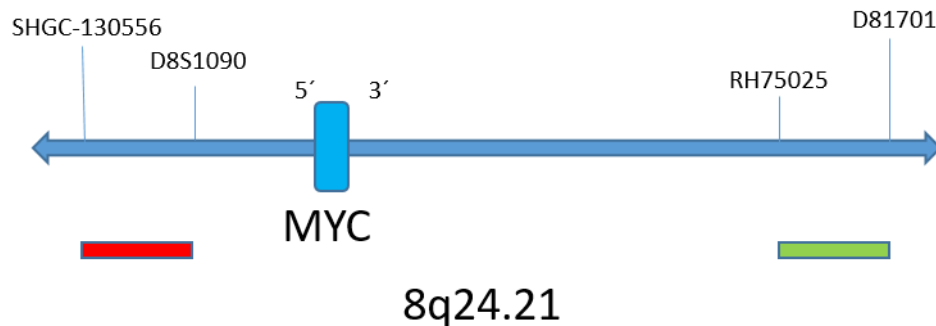
Název sondy	Lokalizace	Značení sondy	Výrobce	Katalogové číslo
ZytoLight SPEC MYC Dual Color Break Apart Probe	8q24	5' konec zeleně, 3' konec oranžově	ZytoVision	Z-2090-200
ZytoLight SPEC IGH Dual Color Break Apart Probe	14q32	5' konec zeleně, 3' konec oranžově	ZytoVision	Z-2110-200
ZytoLight SPEC BCL2 Dual Color Break Apart Probe	18q21	3' konec zeleně, 5' konec oranžově	ZytoVision	Z-2192-200
ZytoLight SPEC BCL6 Dual Color Break Apart Probe	3q27	3' konec zeleně, 5' konec oranžově	ZytoVision	Z-2177-200
ZytoLight SPEC BCL2/IGH Dual Color Dual Fusion Probe	18q21/14q32	IGH zeleně, BCL2 oranžově	ZytoVision	Z-2114-200
ZytoLight SPEC MYC/IGH Dual Color Dual Fusion Probe	8q24/14q32	IGH zeleně, MYC oranžově	ZytoVision	Z-2105-200
ZytoLight SPEC MALTI Dual Color Break Apart Probe	18q21	5' konec zeleně, 3' konec oranžově	ZytoVision	Z-2196-200
ZytoLight SPEC CCND1/IGH Dual Color Dual Fusion Probe	11q13/14q32	IGH zeleně, CCND1 oranžově	ZytoVision	Z-2125-200
ZytoLight SPEC ALK Dual Color Break Apart Probe	2p23	5' konec zeleně, 3' konec oranžově	ZytoVision	Z-2124-200
ZytoLight SPEC 11q gain/loss Triple Color Break Apart Probe	11q23.3., 11q24.1-q25	11q23.3. zeleně, 11q24.3 oranžově, cep 11 modře	ZytoVision	Z-2216-50
ZytoLight SPEC IGK Dual Color Break Apart Probe	2p11	5' konec zeleně, 3' konec oranžově	ZytoVision	Z-2288-50
ZytoLight SPEC IGL Dual Color Break Apart Probe	22q11	5' konec zeleně, 3' konec oranžově	ZytoVision	Z-2286-50
ZytoLight SPEC BIRC3/MALTI Dual Color Dual Fusion Probe	11q22/18q21	BIRC3 zeleně, MALTI oranžově	ZytoVision	Z-2146-200
XL ATM/TP53	11q22/17q13	ATM zeleně, TP53 oranžově	MetaSystems	D-5044-100-TC
XL t(8;14) MYC/IGH DF	8q24/14q32	MYC oranžově, IGH zeleně	MetaSystems	D-5110-100-OG
24 XCyte mFISH Kit	-	-	MetaSystems	D-0125-120-DI
BCL3 FISH DNA Probe, Split Signal	19q13	5' konec zeleně, 3' konec oranžově	Dako	Y5411

[Type here]

Mezi nejčastěji používané sondy patří:

- **ZytoLight SPEC MYC Dual Color Break Apart Probe**

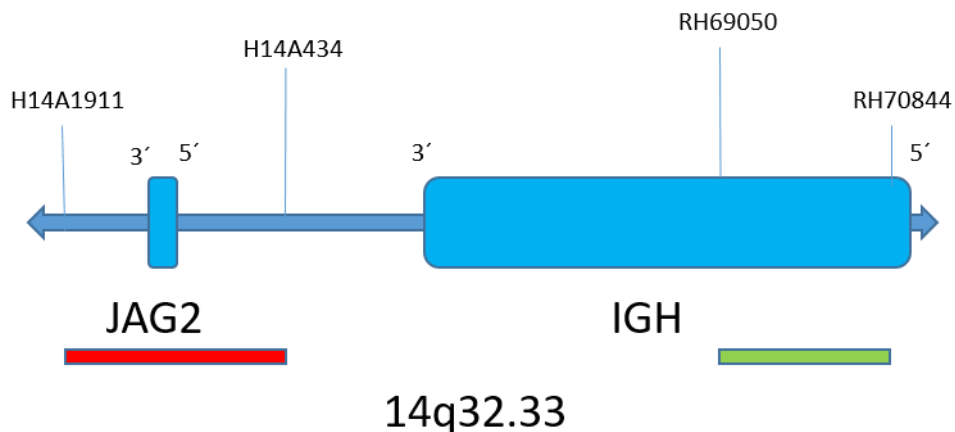
Sonda je vytvořena tak, aby mohla být detekována přestavba zahrnující oblast 8q24 (gen *MYC*). 5'konec genu je označen oranžově, 3'konec zeleně. Za normálního stavu vidíme v mikroskopu 2 fúzní signály. Pokud dojde k translokaci, v mikroskopu vidíme oranžový a zelený signál odděleně. Na stejném principu pracují i sondy *IGH*, *BCL2* a *BCL6*.



Obrázek č. 4: Mapa sondy *ZytoLight SPEC MYC Dual Color Break Apart Probe*

- **ZytoLight SPEC IGH Dual Color Break Apart Probe**

Zeleně je označen 5'konec genu *IGH*, oranžově 3'konec genu. Sonda opět slouží k detekci přestavby oblasti 14q32 (gen *IGH*).

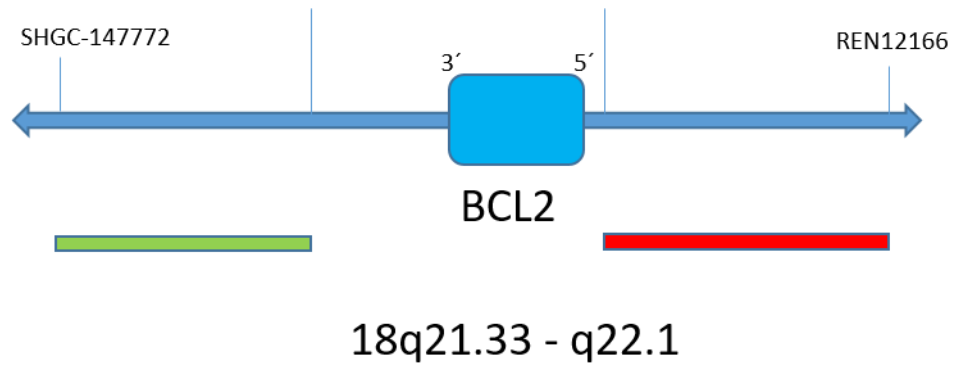


Obrázek č. 5: Mapa sondy *ZytoLight SPEC IGH Dual Color Break Apart Probe*

- **ZytoLight SPEC BCL2 Dual Color Break Apart Probe**

Gen *BCL2* se nachází v oblasti 18q21, jeho 3'konec je označen zeleně, 5' konec oranžově.

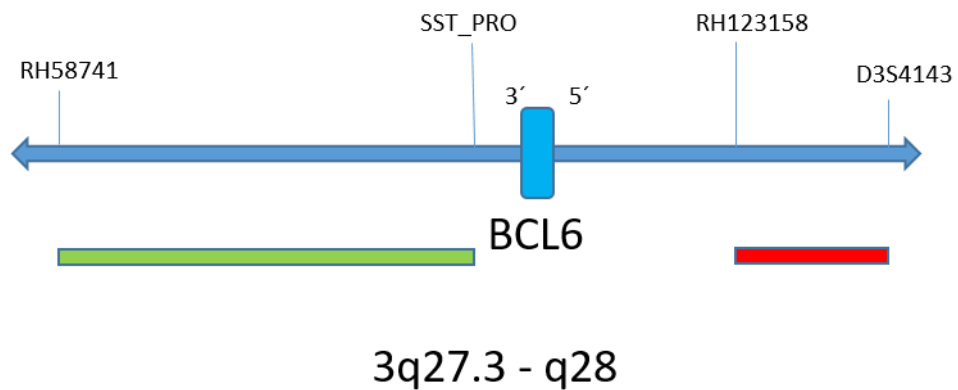
[Type here]



Obrázek č. 6: Mapa sondy *ZytoLight SPEC BCL2 Dual Color Break Apart Probe*

- ***ZytoLight SPEC BCL6 Dual Color Break Apart Probe***

Sonda navržená k detekci přestavby oblasti 3q27 (gen *BCL6*). Oblast přiléhající k 3'konci genu je označena zeleně, oblast sousedící s 5'koncem genu oranžově.

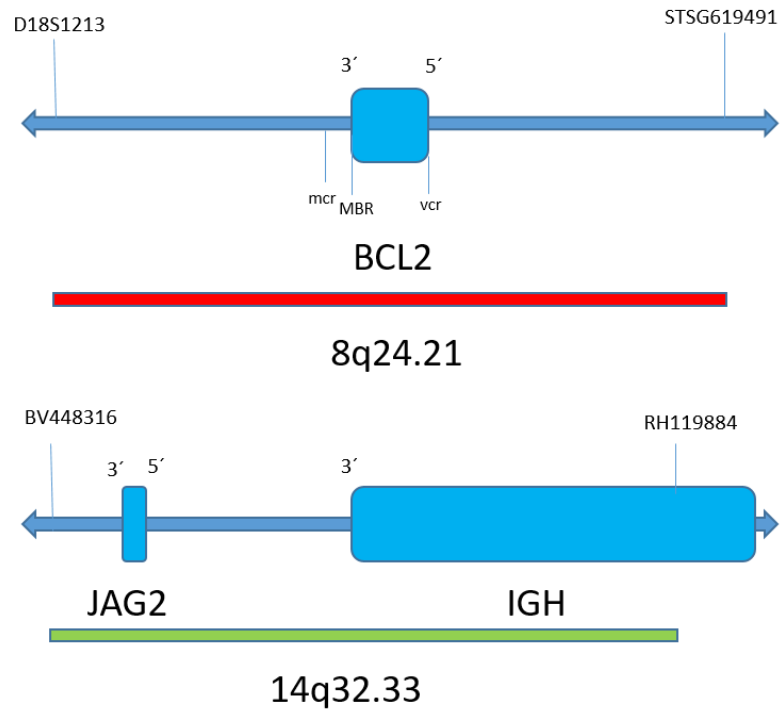


Obrázek č. 7: Mapa sondy *ZytoLight SPEC BCL6 Dual Color Break Apart Probe*

- ***ZytoLight SPEC BCL2/IGH Dual Color Dual Fusion Probe***

Sonda pro detekci přestavby genů *BCL2* a *IGH*. Gen *IGH* je označen zeleně, gen *BCL2* oranžově. Za normálního stavu vidíme v mikroskopu dva zelené a dva oranžové signály. Při reciproké translokaci t(14;18) detekujeme dva fúzní signály a jeden samostatný oranžový a zelený signál.

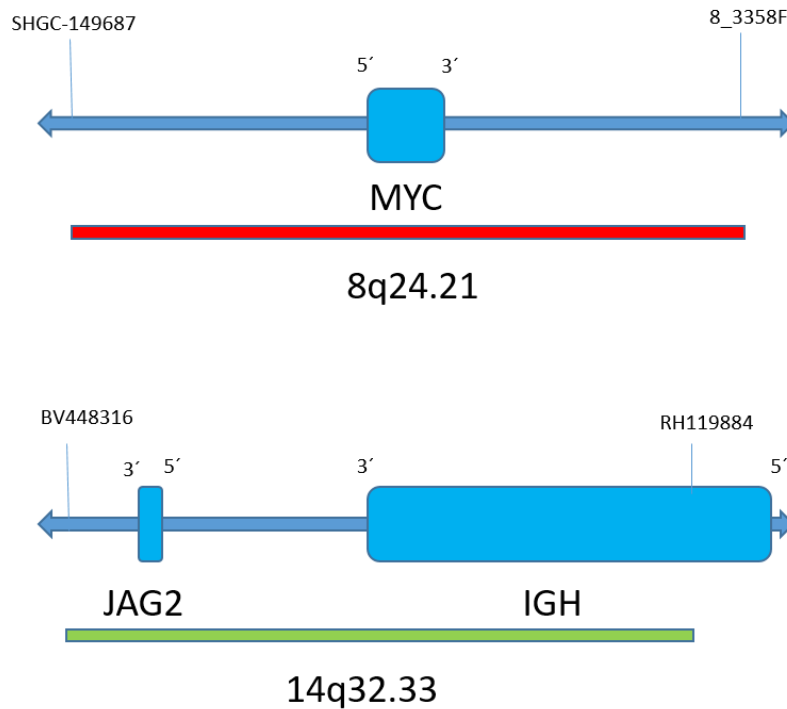
[Type here]



Obrázek č. 8: Mapa sondy SPEC *BCL2/IGH* Dual Color Dual Fusion Probe

- **ZytoLight SPEC *MYC/IGH* Dual Color Dual Fusion Probe**

Sonda detekující přestavbu genů *MYC* a *IGH*. Oranžově je označena oblast pro gen *MYC*, zeleně oblast genu *IGH*. Při recipročné translokaci t(8;14) vidíme v mikroskopu stejně jako u sondy *BCL2/IGH* dva fúzní signály a jeden oranžový a zelený odděleně.



Obrázek č. 9: Mapa sondy *MYC/IGH* Dual Color Dual Fusion Probe

[Type here]

Pokud je k dispozici nativní preparát, vyšetření je doplněno metodami FISH a mFISH na kultivovaných buňkách.

FISH NA KULTIVOVANÝCH BUŇKÁCH:

1. Sklíčko s nakapanými buňkami vložíme do roztoku 2x SSC po dobu 10 – 15 minut.
2. Následuje odvodnění ve vzestupně řadě alkoholů (70%, 80% a 96% etanol), vše po dobu 2 minut.
3. Podložní sklíčko usušíme na plotýnce při 45 °C a pipetujeme 5 µl sondy pod krycí sklíčko o velikosti 18 x 18 mm.
4. Okraje zalepíme rubber-cementem.
5. Preparát spolu se sondou denaturujeme podle pokynů výrobce (MetaSystems při 75 °C po dobu 2 minut).
6. Sklíčko vložíme do vlhké komůrky, kde se inkubuje při 37 °C do druhého dne.
7. Následují body 14 – 17 u FISH na parafinových řezech.

Hodnocení probíhá pod fluorescenčním mikroskopem (Olympus) a za použití softwaru ISIS (MetaSystems), kdy se počítá 300 buněk a minimálně 10 mitóz. Následně je procentuálně vyhodnocena přítomnost nebo nepřítomnost dané aberace a výsledek je zapsán podle mezinárodní nomenklatury ISCN (An International System for Human Cytogenomic Nomenclature) (McGowan-Jordan *et al.*, 2016).

mFISH NA KULTIVOVANÝCH BUŇKÁCH:

Metoda mFISH je založena na existenci 24 různých DNA sond, které jsou označeny 5 různými fluorochromy nebo jejich kombinacemi. Díky tomu můžeme najednou obarvit všech 46 chromozomů odlišnými barvami. Obraz je poskládán ze snímků preparátu, který byl snímán pod šesti fluorescenčními filtry, a vyhodnocen pomocí speciálního softwaru, který přiřadí jednotlivým chromozomům pseudobarvy pro snazší rozlišení.

Příprava preparátu:

1. Podložní sklíčko s nakapanou buněčnou suspenzí inkubujeme v termostatu při 37 °C po dobu 20 minut.
2. Následuje zavodnění preparátu v sestupné řadě alkoholů (96%, 90%, 80%, 70%), v každém 1 minutu.
3. Sklo vložíme do koplíny s 0,1x SSC na 1 minutu.
4. Poté jej přeneseme do koplíny s 2x SSC a inkubujeme 30 minut při 70 °C.

[Type here]

5. Koplínu se sklem vyjmeme z vodní lázně a chladíme ji 20 minut při 37 °C.
6. Sklo vložíme na 1 minutu do roztoku 0,1x SSC při laboratorní teplotě, následuje denaturace v 0,07mmol/l NaOH při laboratorní teplotě 1 minutu.
7. Sklo přeneseme do 0,1x SSC na 1 minutu při 4 °C, následuje přenos do 2x SSC na 1 minutu při 4 °C.
8. Následuje odvodnění preparátu ve vzestupné řadě alkoholů (70%, 80%, 90%, 96%) v každém 1 minutu.
9. Sklo usušíme na plotýnce při 45 °C.

Příprava sondy:

10. Do 0,2ml mikrozkušavky napipetujeme 8 µl sondy.
11. Sondu zdenaturujeme v termocykleru při 75 °C po dobu 5 minut, následuje ochlazení na 4 °C po dobu 30 sekund.
12. Sondu inkubujeme 30 minut při 37 °C.

Hybridizace:

13. Denaturovanou sondu napipetujeme na podložní sklo s buňkami a přikryjeme krycím sklíčkem (22x22 mm).
14. Okraje krycího sklíčka oblepíme rubber cementem a celý preparát hybridizujeme 24 hodin při 37 °C.
15. Další den odmyjeme nenávanou sondu v 0,4x SSC ve vodní lázni při 73 °C po dobu 2 minut a ve 2x SSC/0,05% Tween20 při laboratorní teplotě po dobu 30 sekund.
16. Podložní sklo usušíme na plotýnce, napipetujeme 10 µl DAPI a přikryjeme krycím sklíčkem (24x24 mm).

Jednotlivé mitózy jsou následně nasnímány pomocí přístroje Metafer Axioplan 2 Imaging. Hodnocení probíhá v programu ISIS (MetaSystems), kdy se karyotypuje minimálně 10 mitóz. Výsledek je opět zapsán podle mezinárodní nomenklatury ISCN (An International System for Human Cytogenomic Nomenclature) (McGowan-Jordan *et al.*, 2016).

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

CCD kamera

Centrifuga Heraeus Megafuge 16R (Heraeus Holding)

Flowbox HERAsafe® (Heraeus Holding)

[Type here]

Fluorescenční lampa U-RFL-T (Olympus)

Inkubátor Grant Boeckel IS020 (Boeckel Grant)

Inkubátor ThermoBrite (Abbott Molecular)

Lednička

Metafer Axioplan 2 Imaging (Carl Zeiss)

Mraznička

Software ISIS (MetaSystems)

Stolní minicentrifuga C1301 (Labnet)

Světelný mikroskop Olympus BX60 (Olympus)

Systém pro dělení chromozomů v metafázi Hanabi (ADSTEC Corporation)

PCR cykler ProFlex (Life Technologies)

Topná a sušící deska Medax (Nagel)

Vodní lázeň Thermomix BM (B. Braun Biotech International)

4.4 Pomůcky

Centrifugační zkumavky Falcon (50 ml), (TPP®)

Fixogum Rubber Cement (Marabu)

Imerzní olej (Olympus)

Kopliny

Krycí skla (18x18, 22x22 mm, 24x24 mm), (Menzel-Gläser)

Parafilm

Pasteurovy pipety (10 ml), (Biosigma)

[Type here]

Pinzeta

Pipety

Podložní skla SuperFrost® (Thermo Fisher Scientific)

Špičky

4.5 Použité chemikálie a roztoky

20xSSC (lékárna FNOL)

96% etanol (lékárna FNOL)

DAPI/DuraTect™-Solution (Zytovision, kat. č. MT-0007-0.8)

dH₂O (HOK)

Fluorescenčně značené sondy (Zytovision)

Fluorescenčně značené sondy (MetaSystems)

Fluorescenčně značené sondy (Dako)

Hydroxid sodný (Sigma Aldrich, kat. č. 1310-73-2)

NP40 (Abbott Molecular, kat. č. 07J05-001)

Tween 20 (Sigma Aldrich, kat. č. 9005-64-5)

Xylen (LachNer, kat. č. 20060/AT0)

Příprava roztoků

0,4x SSC/0,3% NP40:

20 ml 20x SSC

950 ml injekční H₂O

3 ml NP40

pH 7 – 7,5

doplnit H₂O do 1 l, uchovávat při laboratorní teplotě

20x SSC:

132 g 20x SSC

[Type here]

500 ml H₂O

pH 7, uchovávat při laboratorní teplotě

2x SSC/0,1% NP40:

100 ml 20x SSC

850 ml injekční H₂O

1 ml NP40

pH 7 – 8

doplnit H₂O do 1 l, uchovávat při laboratorní teplotě

2x SSC:

50 ml 20x SSC

450 ml injekční H₂O

pH 7 – 7,5, uchovávat při laboratorní teplotě

0,1x SSC:

2,5 ml 20x SSC

497,5 ml injekční H₂O

0,4x SSC:

10 ml 20x SSC

490 ml injekční H₂O

2x SSC/0,05% Tween 20:

5 ml 20x SSC

45 ml injekční H₂O

25 µl Tween20

1mol/l NaOH:

40 g NaOH rozpustit v 1 l injekční H₂O

0,07mol/l NaOH:

14 ml 1mol/l NaOH

186 ml injekční H₂O

90% etanol:

94 ml 96% etanol

[Type here]

6 ml injekční H₂O

80% etanol:

83 ml 96% etanol

17 ml injekční H₂O

70% etanol:

73 ml 96% etanol

27 ml injekční H₂O

5 Výsledky

V období od října 2018 do března 2020 jsem v LCG HOK FNOL vyšetřila celkem 43 pacientů s B-nehodgkinským lymfomem, z čehož bylo 30 mužů (70 %) a 13 žen (30 %). Věkové rozmezí se pohybovalo od 26 do 83 let, medián věku činil 65 let. Soubor pacientů byl sestaven na základě předchozího klinického a histopatologického vyšetření, kdy bylo potřeba dále upřesnit či potvrdit navrženou diagnózu. Dva pacienti měli na základě vyšetření klinikem a histopatologem navrženou diagnózu BL, 3 pacienti FL, 23 pacientů DLBCL/HGBL, 1 pacient MCL, 2 pacienti MZL a 12 pacientů mělo jinou nebo zatím blíže neurčenou diagnózu (viz Tabulka č. 5).

Vyšetření bylo provedeno metodou FISH na FFPE řezech za použití specifických, komerčně dostupných genových sond. V případě dostupnosti nativního nádorového materiálu bylo provedeno klasické cytogenetické vyšetření a FISH, případně mFISH na kultivovaných nádorových buňkách.

Tabulka č. 5: Základní charakteristika souboru pacientů

Č. pacienta	Pohlaví	Věk	Materiál	Diagnóza
1	M	34	mediastinum	PMBL
2	M	51	tenké střevo	BL
3	M	44	mozková tkáň	-
4	M	58	mediastinum	PMBL/DLBCL
5	M	58	uzlina	-
6	Ž	62	duodenum	DLBCL
7	M	46	žaludek	DLBCL
8	M	47	konečník	MCL
9	Ž	75	krk	-
10	M	41	dutina peritoneální	SLL
11	M	77	mediastinum	DLBCL
12	M	65	humerus	DLBCL
13	Ž	62	esovitý tračník	DLBCL
14	M	76	NZ	-
15	M	78	kůže a podkoží	DLBCL
16	Ž	69	ústa	DLBCL
17	M	54	uzlina třísla	-
18	M	83	retroperitoneum	-
19	Ž	71	NZ	-

[Type here]

Pokračování Tabulka č. 5: Základní charakteristika souboru pacientů

Č. pacienta	Pohlaví	Věk	Materiál	Diagnóza
20	M	26	uzlina	ALCL
21	M	75	uzlina	BL 11q
22	M	83	submandibulární žláza	FL
23	Ž	39	uzlina	DLBCL
24	M	75	prso	DLBCL
25	M	45	uzlina	-
26	M	40	uzlina	-
27	Ž	82	pochva	DLBCL
28	Ž	60	uzlina	FL
29	Ž	73	uzlina	MZL
30	M	70	prostata	DLBCL
31	M	57	uzlina	DLBCL
32	M	73	tumor u míchy	DLBCL
33	M	61	tumor mediastína	DLBCL/HGBL
34	Ž	75	uzlina	DLBCL/HGBL
35	Ž	68	tkáň patro	DLBCL/HGBL (RT)
36	M	79	NZ	DLBCL/HGBL
37	Ž	59	mandle	DLBCL
38	M	73	orbita	MZL
39	M	71	uzlina	DLBCL/HGBL
40	M	66	uzlina	DLBCL/HGBL
41	M	77	střevo	DLBCL
42	M	59	NZ	DLBCL
43	Ž	64	uzlina	FL

Legenda: M = muž, Ž = žena, NZ = neznámý, PMBL = primární mediastinální velkobuněčný B-lymfom, BL = Burkittův lymfom, FL = folikulární lymfom, DLBCL = difuzní velkobuněčný B-lymfom, MCL = lymfom z plášťových buněk, SLL = lymfom z malých lymfocytů, ALCL = anaplastický velkobuněčný lymfom, MZL = lymfom marginální zóny, HGBL = high grade B-lymfom, RT = Richterova transformace, - = diagnóza neurčena

U některých pacientů není známa konečná diagnóza, z důvodu provedení pouze konzultace pro jiné externí pracoviště.

VÝSLEDKY FISH NA FFPE ŘEZECH U PACIENTŮ S DLBCL

U 23 pacientů s podezřením na DLBCL/HGBL jsem vyšetřila tyto aberace: přestavba genů *IGH* (14q32), *MYC* (8q24), *BCL2* (18q21), *BCL6* (3q27), translokace t(8;14)(q24;q32) a translokace t(14;18)(q32;q21) (viz Tabulka č. 6). V 15 případech se jednalo o muže, v 8 případech o ženy. Medián věku byl 68 let, nejmladšímu pacientovi bylo 39 let, nejstaršímu 82 let. Vyšetření bylo neúspěšné u 2 pacientů, ve 3 případech bylo vyšetření částečně úspěšné.

[Type here]

Diagnóza DLBCL byla po zhodnocení výsledků molekulárně cytogenetického a imunohistochemického vyšetření potvrzena v 18 případech.

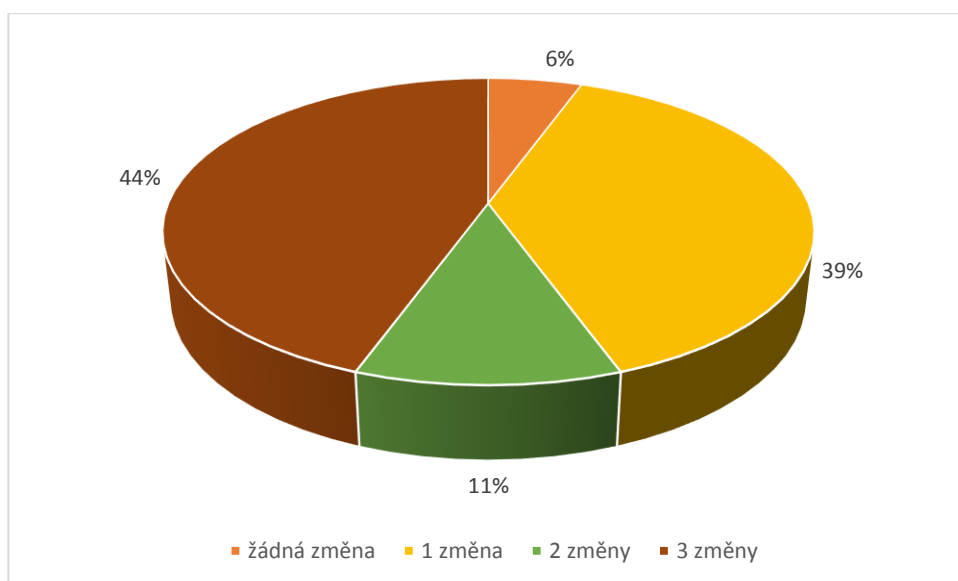
Tabulka č. 6: Výsledky vyšetření metodou FISH na parafinových řezech u pacientů s DLBCL

Č. pacienta	Pohlaví	Diagnóza	FISH					
			<i>MYC</i>	t(8;14)	<i>IGH</i>	t(14;18)	<i>BCL2</i>	<i>BCL6</i>
4	M	DLBCL/PMBL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
6	Ž	DLBCL	NL	NL	+	+	+	NL
7	M	DLBCL	+	+	+	NL	NL	NL
11	M	DLBCL	x	x	x	x	x	x
12*	M	DLBCL	x	x	+	x	x	x
13	Ž	DLBCL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
15	M	DLBCL	ND	ND	ND	+	+	ND
16	Ž	DLBCL	+	+	+	NL	NL	NL
23	Ž	DLBCL	x	NL	+	+	x	NL
24	M	DLBCL	+	+	+	NL	NL	+
27	Ž	DLBCL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
30	M	DLBCL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
31	M	DLBCL	NL	NL	NL	NL	x	NL
32	M	DLBCL	NL	NL	NL	NL	x	x
33	M	DLBCL/HGBL	NL	NL	+	NL	NL	+
34	Ž	DLBCL/HGBL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
35	Ž	DLBCL/HGBL (RT)	+	+	+	NL	NL	NL
36	M	DLBCL/HGBL	+	+	+	+	+	+
37	Ž	DLBCL	NL	x	+	x	x	x
39	M	DLBCL	NL	NL	NL	NL	NL	NL
40*	M	DLBCL	+	+	+	NL	NL	+
41	M	DLBCL/HGBL	NL	NL	+	NL	NL	NL
42	M	DLBCL/HGBL	x	x	x	x	x	x

Legenda: M = muž, Ž = žena, DLBCL = difuzní velkobuněčný B-lymfom, PMBL = primární mediastinální B-lymfom, HGBL = high grade B-lymfom, RT = Richterova transformace, NL = normální nálezy, + = pozitivní nálezy, ND = not done, x = neúspěšné vyšetření, * pacienti s vyšetřením FISH, mFISH

Z celkového počtu 18 úspěšně vyšetřených pacientů s diagnózou DLBCL/HGBL nebyla u 1 pacienta (6 %) prokázána žádná chromozomová aberace, u 7 pacientů (39 %) byla nalezena 1 chromozomová aberace, u 2 pacientů (11 %) 2 chromozomové aberace a u 8 pacientů (44 %) 3 a více chromozomových změn (viz Obrázek č. 10).

[Type here]



Obrázek č. 10: Procentuální zastoupení pacientů na základě počtu chromozomových změn

U 11 pacientů došlo ke zmnožení počtu kopií genů *IGH*, *MYC*, *BCL2* a *BCL6*. Nejčastěji bylo pozorováno zmnožení genu *BCL2* (8 pacientů). Druhým nejčastěji zmnoženým genem byl gen *MYC* (5 pacientů), následovaly geny *IGH* (3 pacienti) a *BCL6* (3 pacienti). Nejčastěji se jednalo o 3 kopie studovaných genů. U 3 pacientů došlo také k delecí jedné kopie některých ze jmenovaných genů (viz Tabulka č. 7).

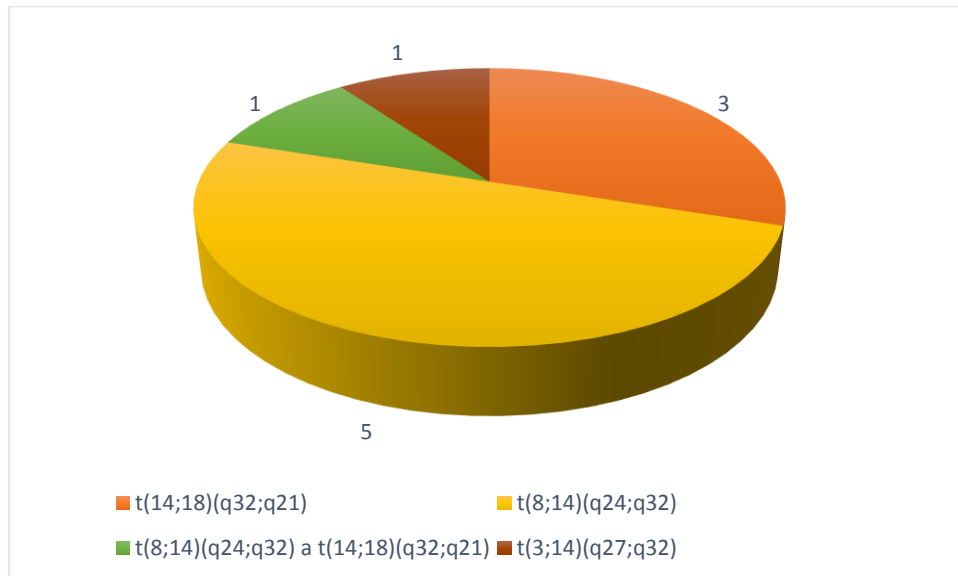
Tabulka č. 7: Počty kopií kandidátních genů u pacientů s DLBCL

Č. pacienta	Pohlaví	Diagnóza	FISH			
			<i>MYC</i>	<i>IGH</i>	<i>BCL2</i>	<i>BCL6</i>
13	Ž	DLBCL	3 kopie	NL	NL	NL
15	M	DLBCL	ND	ND	3 kopie	ND
24	M	DLBCL	7 - 8 kopií	NL	1 kopie	NL
27	Ž	DLBCL	1 kopie	1 kopie	3 kopie	1 kopie
30	M	DLBCL	NL	NL	7 - 10 kopií	NL
31	M	DLBCL	3 - 4 kopie	3 - 4 kopie	x	3 - 4 kopie
33	M	DLBCL/HGBL	NL	3 kopie	2 - 6 kopií	NL
34	Ž	DLBCL/HGBL	NL	1 kopie	3 kopie	NL
39	M	DLBCL	3 kopie	3 kopie	3 kopie	3 kopie
40	M	DLBCL	NL	NL	3 kopie	NL
41	M	DLBCL/HGBL	3 kopie	NL	3 kopie	3 kopie

Legenda: M = muž, Ž = žena, DLBCL = difuzní velkobuněčný B-lymfom, HGBL = high grade B-lymfom, NL = normální nález, ND = not done, x = neúspěšné vyšetření

[Type here]

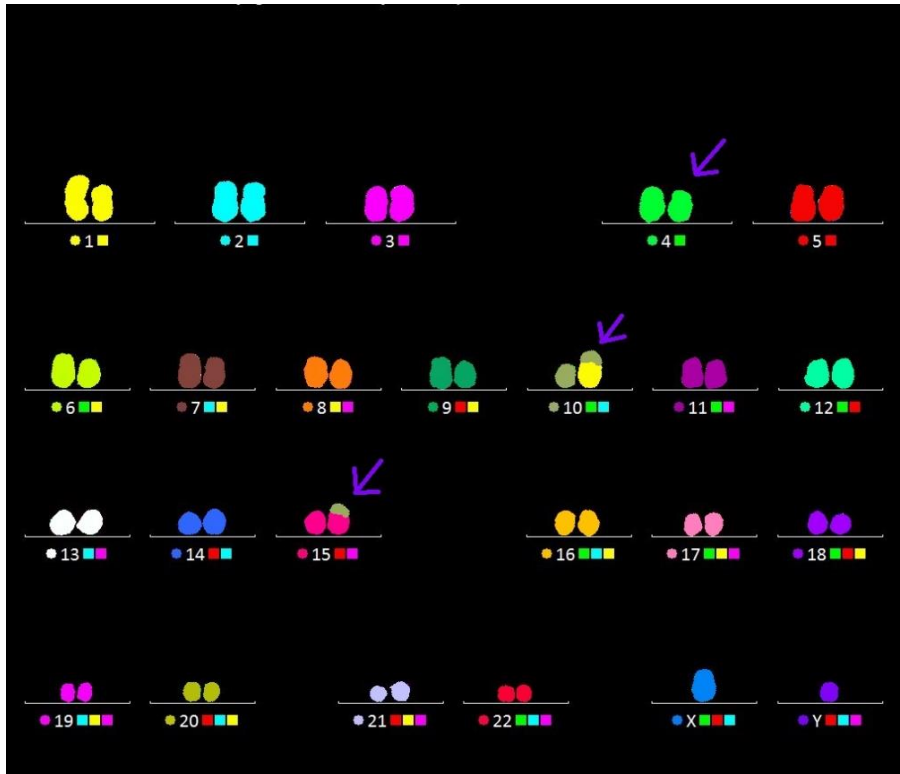
U 5 pacientů byla detekována translokace t(8;14)(q24;q32), u 3 pacientů translokace t(14;18)(q32;q21), u jednoho pacienta translokace t(3;14)(q27;q32) a u jednoho pacienta byla prokázána přítomnost dvou translokací současně (viz Obrázek č. 11).



Obrázek č. 11: Počet pacientů s translokací genu *IGH* s různými partnerskými chromozomy

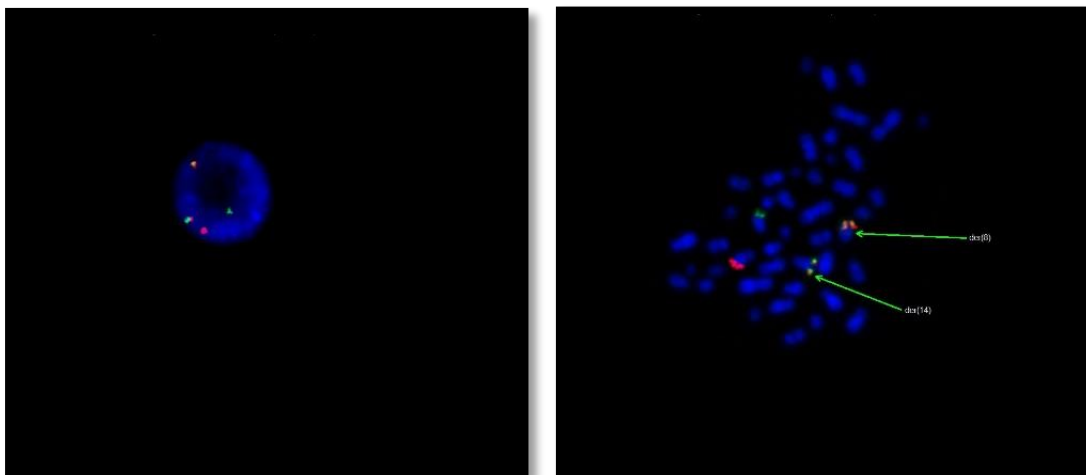
Vyšetření FISH na FFPE řezu bylo u pacienta č. 12 pouze částečně úspěšné z důvodu špatné kvality řezu. Hodnotitelná byla pouze hybridizace pro genový lokus *IGH*, který byl přestavěný, ostatní hybridizace byly nehodnotitelné. Nicméně v tomto případě měl pacient infiltrovanou kostní dřeň, ve které byl prokázán klasickým cytogenetickým vyšetřením a metodou FISH a mFISH komplexní karyotyp, který zahrnoval i translokaci t(8;14)(q24;q32): 46,XY,?del(4)(q?31q35),t(8;14)(q24;q32),der(15)t(1;10;15)(q?24;q?21;p?13)

[Type here]



Obrázek č. 12: Výsledek mFISH pacienta č. 12 s karyotypem:

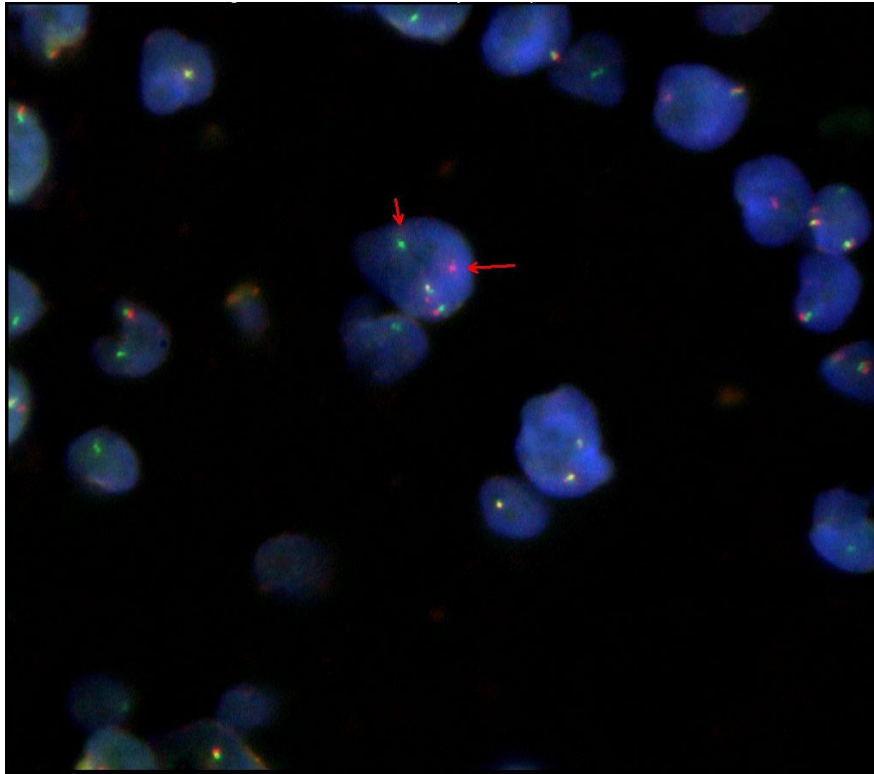
46,XY,?del(4)(q?31q35),t(8;14)(q24;32),der(15)t(1;10;15)(q?24;q?21;p?13)[6/12]



Obrázek č. 13: Výsledek FISH na interfázních jádrech a mitózách se sondou XL t(8;14) *MYC/IGH* DF u pacienta č. 12. Translokace t(8;14)(q24;q32) s fúzí genů *MYC* a *IGH* byla prokázána ve 13 % hodnocených buněk a 58 % mitóz. Zeleně je značen gen *IGH*, oranžově gen *MYC*. Přítomnost dvou fúzních signálů svědčí pro reciprokovou translokaci t(8;14).

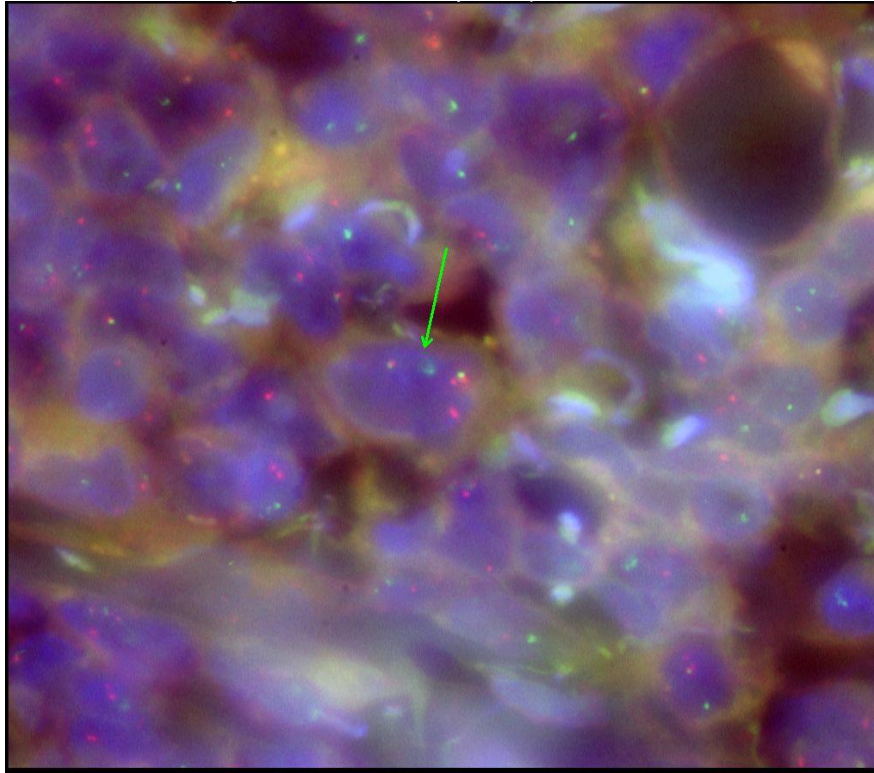
[Type here]

Dalším zajímavým pacientem byl pacient č. 15, u kterého byl diagnostikován primární kožní DLBCL „leg type“. V tomto případě byla prokázána přítomnost tří kopií genu *BCL2*, z čehož jedna kopie je přestavěná a vstupuje do reciproké translokace $t(14;18)(q32;q21)$ s fúzí genů *IGH/BCL2*.



Obrázek č. 14: Výsledek FISH na FFPE řezu pacienta č. 15 se sondou *ZytoLight SPEC BCL2* Dual Color Break Apart Probe. Šipky označují oddělený oranžový a zelený signál, který svědčí pro přestavbu genu *BCL2*, zároveň buňka obsahuje tři kopie genu *BCL2*.

[Type here]

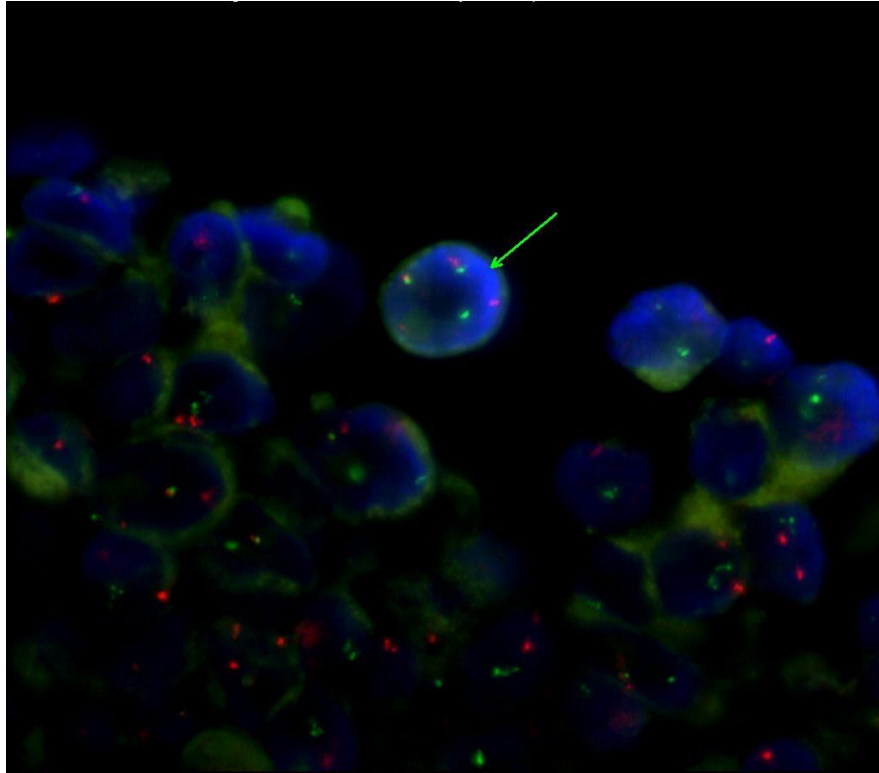


Obrázek č. 15: Výsledek FISH na FFPE řezu pacienta č. 15 se sondou *ZytoLight SPEC IGH/BCL2* Dual Color Dual Fusion Probe. Gen *BCL2* vstupuje do reciproké translokace t(14;18)(q32;q21) – na obrázku znázorněna přítomností dvou fúzních signálů a jednoho zeleného + dvou oranžových signálů odděleně.

Během své diplomové práce jsem se rovněž zaměřila na novou kategorii pacientů s DHL/THL, která byla definována na základě klasifikace WHO 2017 (Swerdlow *et al.*, 2017). Základním diagnostickým požadavkem byla současná přestavba genů *MYC*, *BCL2* anebo *BCL6*. Do této skupiny spadali tři pacienti, z nichž dva se potencionálně řadili do kategorie DHL (pacienti č. 24 a 40) a jeden do kategorie THL (pacient č. 36). Všichni tyto pacienti byli muži s mediánem věku 75 let.

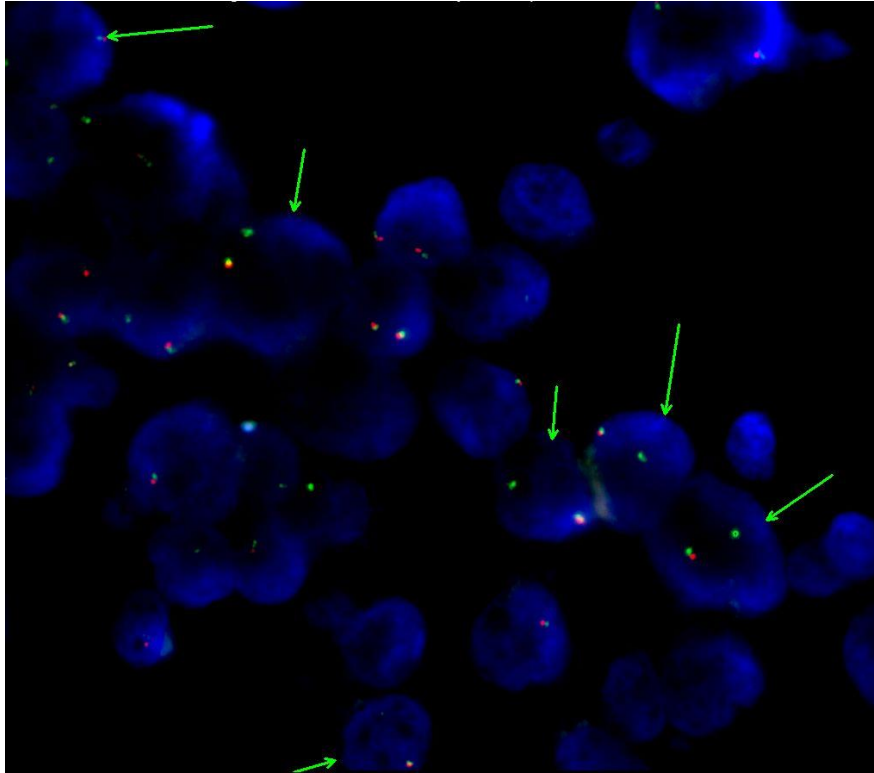
U pacientů č. 24 a 40 byla shodně prokázána translokace t(8;14)(q24;q32) s přestavbou genů *MYC* a *IGH*. Zároveň byla u obou prokázána delece oblasti přiléhající k 5' konci genu *BCL6*, díky čemuž mohlo velmi pravděpodobně dojít k přestavbě a deregulaci genu *BCL6*, jako je tomu u pacientů s DHL. Sonda pro detekci přestaveb genu *BCL6*, která by pokrývala samotný gen a byla vhodná pro použití na parafinových řezech, však není momentálně dostupná. Z tohoto důvodu nelze tyto pacienty dále přesněji vyšetřit a stanovit typ aberace, ke kterému u těchto pacientů došlo.

[Type here]



Obrázek č. 16: Výsledek FISH na FFPE řezu u pacienta č. 40 se sondou *ZytoLight SPEC MYC/IGH* Dual Color Dual Fusion Probe znázorňuje translokaci $t(8;14)(q24;q32)$ s fúzí genů *MYC* a *IGH*. Zeleně je značen gen *IGH*, oranžově gen *MYC*. Přítomnost dvou fúzních signálů a jednoho zeleného a oranžového zvláště značí reciprokovou translokaci $t(8;14)$.

[Type here]

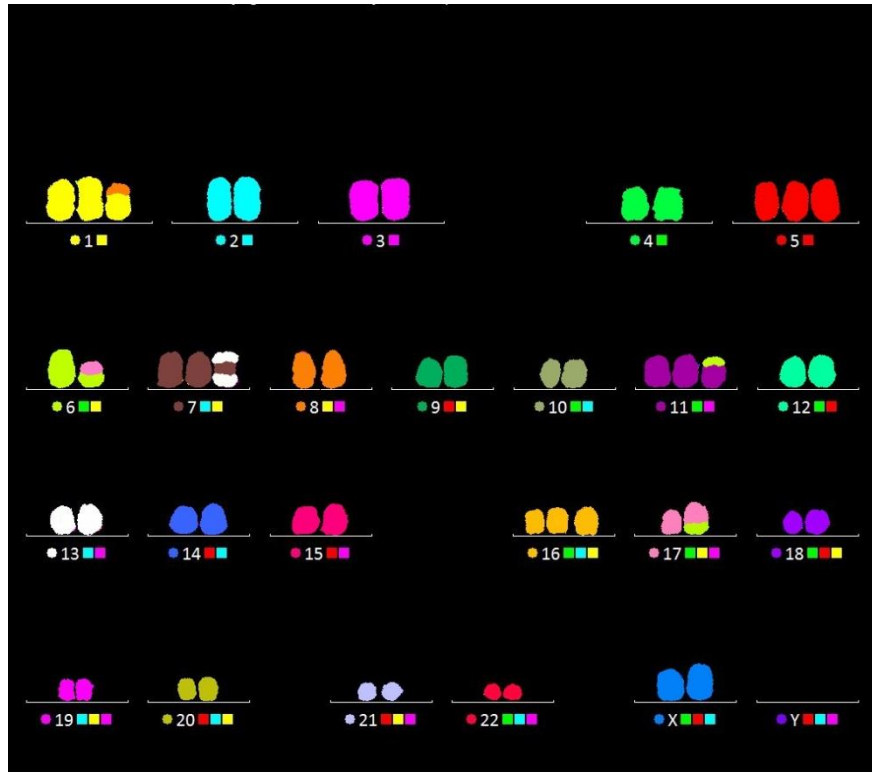


Obrázek č. 17: Výsledek FISH na FFPE řezu se sondou *ZytoLight SPEC BCL6 Dual Color Break Apart Probe* u pacienta č. 40. Přítomnost jedné fúze a jednoho zeleného signálu svědčí pro delecí oblasti přiléhající k 5'konci genu *BCL6* (3q27).

Nicméně u pacienta č. 40 byla k dispozici infiltrovaná kostní dřeň, díky které mohly být provedeny FISH a mFISH. Díky nim byla prokázána přítomnost dvou hlavních klonů včetně translokace $t(8;14)(q24;q32)$ a delece genu TP53.

1. klon: $51,X,-Y,+X,+der(1)t(1;8)(?:q?23),+5,dic(6;17)(?:?q),+dic(6;17)(?:?q),+ider(7)(q10)t(7;13)(q?32;q34),t(8;14)(q24;q32),+der(11)t(6;11)(?:p?13),+16 [7/11]$
2. klon: $51,X,-Y,+X,+der(1)t(1;8)(?:q?23),+5,dic(6;17)(?:?q),+dic(6;17)(?:?q),+der(7)t(7;13)(q?32;q34),t(8;14)(q24;q32),+der(11)t(6;11)(?:p?13),+16 [2/11]$
3. klon: $46,XY [2/11]$

[Type here]



Obrázek č. 18: Výsledek mFISH jednoho z klonů u pacienta č. 40 s komplexním karyotypem: 51,X,-Y,+X,+der(1)t(1;8)(?:q?23),+5,dic(6;17)(?:?q),+dic(6;17)(?:?q),+ider(7)(q10)t(7;13)(q?32;q34),t(8;14)(q24;q32),+der(11)t(6;11)(?:p?13),+16 [7/11]

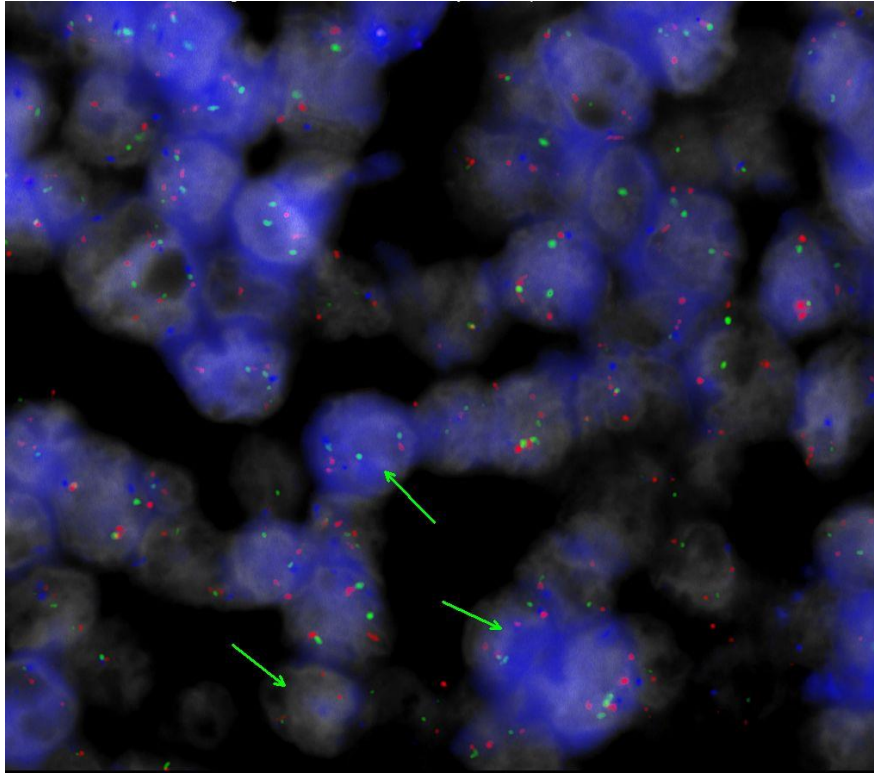
Jediným případem THL byl pacient č. 36, u kterého byla prokázána přestavba obou kopií genu *IGH*, které vstupují do translokací $t(8;14)(q24;q32)$ a $t(14;18)(q32;q21)$ s geny *MYC* a *BCL2*. Současně má pacient přestavěný i gen *BCL6* s neznámým partnerským genem.

VÝSLEDKY FISH NA FFPE ŘEZECH U PACIENTŮ S BL

Dva pacienti z našeho souboru přišli do laboratoře k potvrzení diagnózy BL. U pacienta č. 2 byla na FFPE řezu z tenkého střeva prokázána pro BL typická translokace $t(8;14)(q24;q32)$ s fúzí genů *MYC* a *IGH*.

U pacienta č. 21 byla na řezu z uzliny prokázána přestavba genu *IGH*, translokačního partnera se však nepodařilo určit. Translokace $t(8;14)(q24;q32)$ však prokázána nebyla. Rovněž bylo prokázáno zmnožení oblastí 11q23.3 a 11q24.1-q25 bez početních změn chromosomu 11. Tento pacient tedy dle WHO 2017 spadá do samostatné skupiny Burkitt-like lymfom s aberací 11q.

[Type here]

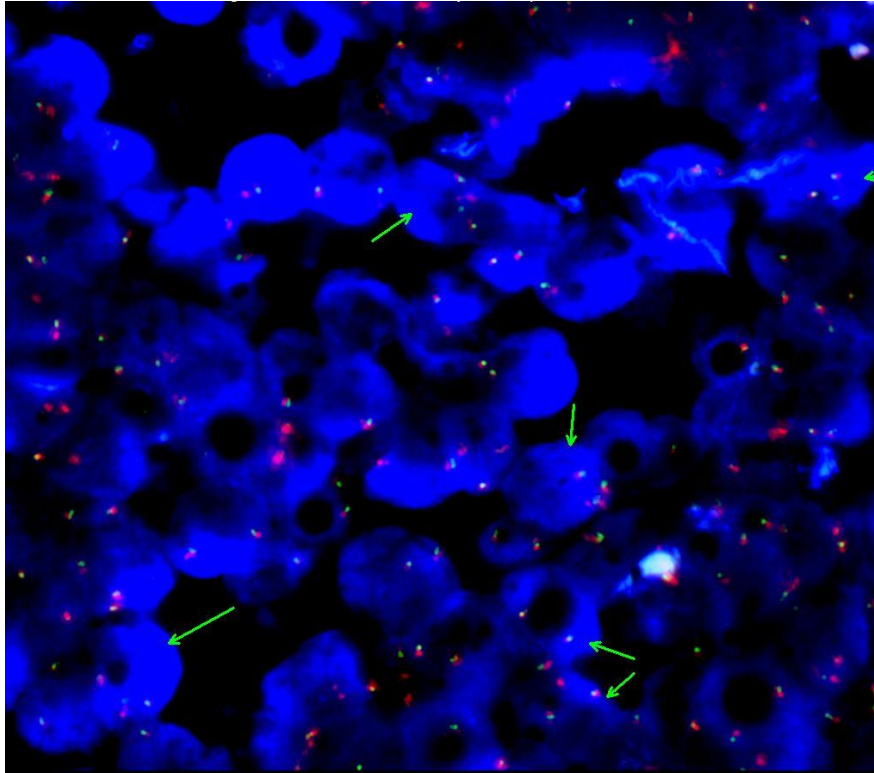


Obrázek č. 19: Výsledek FISH na FFPE řezu se sondou *ZytoLight SPEC 11q gain/loss Triple Color Break Apart Probe* u pacienta č. 21. Oblast 11q23.3. je značena zeleně, oblast 11q24.3 oranžově, a centromera chromozomu 11 modře.

VÝSLEDKY FISH NA FFPE ŘEZECH U PACIENTŮ S MZL

S podezřením na MZL jsme vyšetřili celkem dva pacienty. U pacientky č. 29 nebyly prokázány žádné změny v genech *IGH*, *MYC* ani *BCL2*, pouze byla prokázána přítomnost jedné kopie genu *BCL6*. U pacienta č. 38 bylo prokázáno zmnožení oblastí pro geny *MYC* (3 – 4 kopie), *IGH* (3 kopie), *BCL2* (3 kopie), *BCL6* (3 – 4 kopie), *MALT1* (3 kopie) a *API2* (3 kopie). Nicméně u těchto pacientů byla po zhodnocení všech výsledků potvrzena diagnóza MZL.

[Type here]

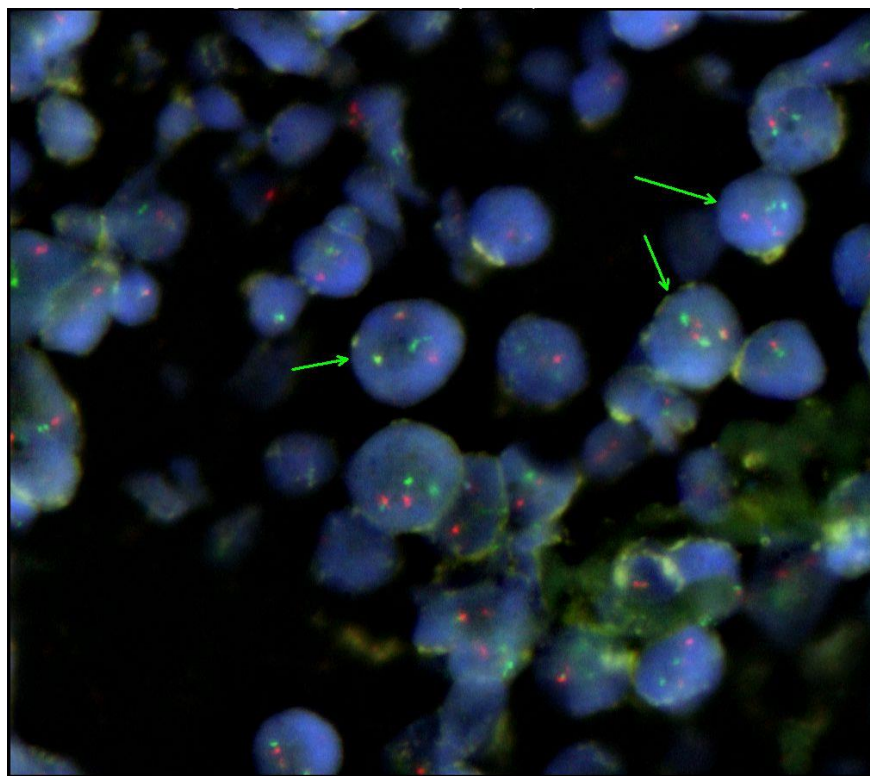


Obrázek č. 20: Výsledek vyšetření FISH na FFPE řezu se sondou *ZytoLight SPEC BCL2 Dual Color Break Apart Probe* u pacienta č. 38. Přítomnost tří fúzních signálů značí přítomnost nadpočetné kopie genu *BCL2* (18q21).

VÝSLEDKY FISH NA FFPE ŘEZECH U PACIENTŮ S MCL

Pro potvrzení diagnózy byl do naší laboratoře poslán pouze jeden pacient. U pacienta č. 8 byla prokázána na FFPE řezu translokace $t(11;14)(q13;q32)$ s fúzí genů *CCND1* a *IGH* typická pro MCL. Přestavba ani početní změny genu *MYC* nebyly prokázány. Vyšetření se sondami pro lokusy *ATM*, *TP53*, *BCL6*, *BCL2* a $t(14;18)(q32;q21)$ nebylo úspěšné.

[Type here]



Obrázek č. 21: Výsledek FISH na FFPE řezu pacienta č. 8 se sondou ZytoLight SPEC *CCND1/IGH* Dual Color Dual Fusion Probe s typickou translokací t(11;14) (q13;q32) s fúzí genů *IGH* a *CCND1*. Zeleně je označen gen *IGH* (14q32), oranžově gen *CCND1* (11q13).

VÝSLEDKY FISH NA FFPE ŘEZECH U PACIENTŮ S FL

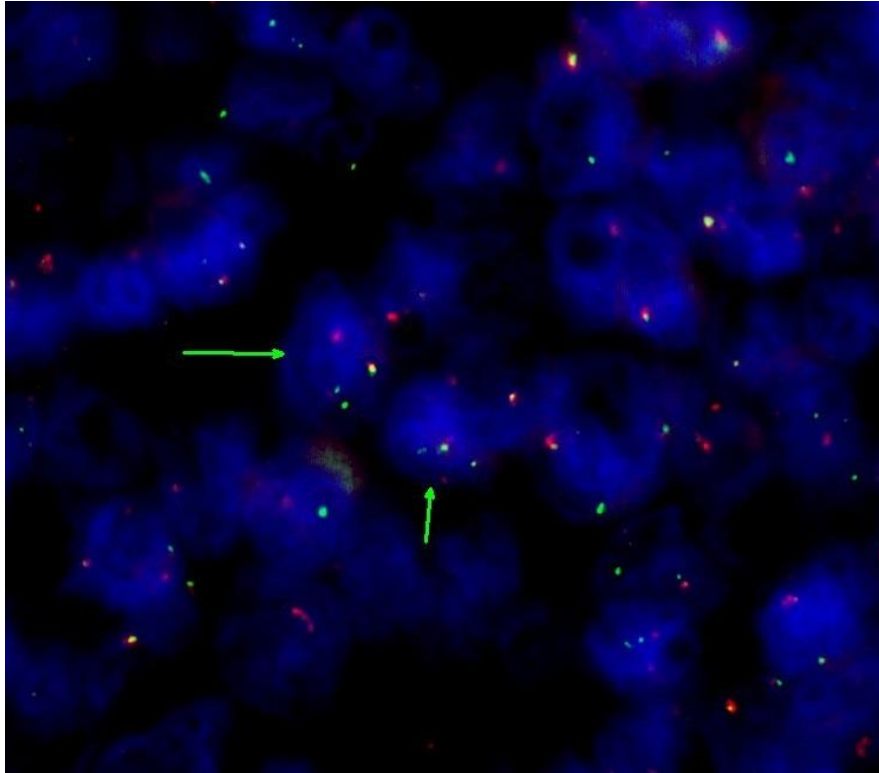
FL byl histopatologicky odečten u tří pacientů, z čehož ve dvou případech se jednalo o ženy a v jednom případě o muže. Medián věku činil 64 let. U všech tří pacientů byla prokázána translokace t(14;18)(q32;q21) s fúzí genů *IGH* a *BCL2* (viz Tabulka č. 8).

Tabulka č. 8: Výsledky vyšetření FISH u pacientů s FL

Č. pacienta	Pohlaví	Diagnóza	FISH							
			<i>MYC</i>	t(8;14)	<i>IGH</i>	t(14;18)	<i>BCL2</i>	<i>BCL6</i>	<i>MALT1</i>	t(11;18)
22	M	FL	NL	ND	+	+	+	NL	x	ND
28	Ž	FL	NL	NL	+	+	+	NL	ND	ND
43	Ž	FL	ND	ND	+	+	+	ND	NL	ND

Legenda: M = muž, Ž = žena, FL = folikulární lymfom, NL = normální nález, + = pozitivní nález, ND = not done, x = neúspěšné vyšetření

[Type here]



Obrázek č. 22: Výsledek FISH na FFPE řezu u pacienta č. 22 se sondou ZytoLight SPEC *BCL2/IGH* Dual Color Dual Fusion Probe. Na obrázku je znázorněna translokace t(14;18)(q32;q21) s fúzí genů *IGH/BCL2*, typická pro FL. Zeleně je označen gen *IGH*, oranžově gen *BCL2*.

VÝSLEDKY FISH NA FFPE ŘEZECH U PACIENTŮ S JINOU NEBO NEZNÁMOU DIAGNÓZOU

Ze 44 vyšetřených pacientů mělo 12 pacientů jinou nebo blíže neurčenou diagnózu B-NHL, tyto pacienti byli na Ústav klinické a molekulární patologie zasláni pouze ke konzultačnímu vyšetření z jiného externího pracoviště. Provedli jsme vyšetření nejčastěji přestavěných genů, které bylo neúspěšné u jednoho pacienta, u 3 pacientů bylo vyšetření částečně úspěšné (viz Tabulka č. 9).

[Type here]

Tabulka č. 9: Výsledky FISH u pacientů s neznámou nebo jinou diagnózou

Č. pacienta	Pohlaví	Diagnóza	FISH						Počty kopií	Poznámka
			<i>MYC</i>	t(8;14)	<i>IGH</i>	t(14;18)	<i>BCL2</i>	<i>BCL6</i>		
Neznámá diagnóza										
3	M	-	NL	NL	NL	NL	NL	NL	-	-
5	M	-	ND	ND	ND	NL	x	ND	-	-
9	Ž	-	ND	ND	NL	ND	ND	ND	3 kopie <i>IGH</i>	<i>IRF4</i> x
14	M	-	NL	NL	NL	NL	x	x	-	-
17	M	-	ND	ND	NL	NL	NL	ND	-	<i>IGK</i> , <i>MALT1</i> a t(11;18) NL
18	M	-	+	+	+	NL	NL	NL	1 kopie <i>MYC</i> a <i>IGH</i>	-
19	Ž	-	x	x	x	x	x	x	-	-
25	M	-	NL	NL	+	+	+	NL	3 kopie <i>MYC</i> a <i>BCL6</i>	-
26	M	-	NL	NL	NL	NL	NL	NL	3 kopie <i>MYC</i> , <i>IGH</i> , <i>BCL2</i>	-
Známa diagnóza										
1	M	PMBL	x	x	+	x	x	x	-	-
10	M	SLL	ND	ND	ND	x	ND	ND	-	t(11;14) NL
20	M	ALCL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	<i>ALK</i> NL

Legenda: M = muž, Ž = žena, PMBL = primární mediastinální velkobuněčný B-lymfom, SLL = lymfom z malých lymfocytů, ALCL = anaplastický velkobuněčný lymfom, - = diagnóza neurčena, NL = normální nález, + = pozitivní nález, ND = not done, x = neúspěšné vyšetření

VÝSLEDKY FISH NA FFPE ŘEZECH U PACIENTŮ S DIAGNÓZOU high grade B-NHL

Dále bylo v rámci spolupráce s Ústavem klinické a molekulární patologie FNOL retrospektivně (od roku 2017 do roku 2019) vyšetřeno 23 pacientů s DLBCL, u kterých byl podle agresivního chování onemocnění, morfologických a histopatologických znaků předpoklad DHL nebo THL. U těchto pacientů byla nejdříve vyšetřena pouze přestavba genu *MYC* a translokace t(8;14), pokud byla přestavba genu *MYC* prokázána, byly vyšetřeny další genové lokusy (viz Tabulka č. 10). V tomto souboru bylo celkem 23 pacientů, z čehož 16 pacientů byli muži (70 %) a 7 pacientů ženy (30 %). Medián věku činil 73 let. Nejstaršímu pacientovi bylo 82 let, nejmladšímu 38 let. Devět vzorků bylo vyšetřeno neúspěšně a 4 částečně úspěšně.

Diagnóza DHL byla potvrzena pouze u pacientky E, u které byla prokázána translokace t(8;14)(q24;q32) s fúzí genů *MYC* a *IGH* a současná přestavba genu *BCL6* s neznámým partnerským chromozomem.

[Type here]

Zajímavým případem je i pacient J, u kterého bylo pozorováno buď zmnožení kopií genů *MYC*, *IGH*, *BCL6* a *IGL* nebo přestavba genu *IGH* pravděpodobně s genem *BCL6* a přestavba genu pro lehký imunoglobulinový řetězec *IGL*. Tento případ ovšem neřadíme do kategorie DHL, jelikož nedošlo k přestavbě genu *MYC*.

[Type here]

Tabulka č. 10: Výsledky FISH u pacientů s diagnózou high grade B-NHL

Č. pacienta	Pohlaví	Věk	Materiál	FISH				Poznámka
				<i>MYC</i>	t(8;14)	<i>IGH</i>	t(14;18)	
A	M	74	uzlina	x	NL	ND	ND	-
B	Ž	73	tonzila	x	NL	ND	ND	-
C	M	75	kůže	NL	NL	+	x	-
D	Ž	73	tonzila	x	x	ND	ND	-
E	Ž	61	sinus frontální	+	přestavba	ND	NL	více kopií <i>BCL2</i> , přestavba <i>BCL6</i>
F	M	74	uzlina	NL	x	ND	ND	-
G	M	38	uzlina	více kopií	NL	ND	ND	-
H	M	68	kostní dřev	x	x	ND	ND	-
I	Ž	45	uzlina	x	x	ND	ND	-
J	M	74	uzlina	více kopií	NL	+	NL	přestavba nebo více kopií <i>BCL6</i> , přestavba nebo více kopií <i>IGL</i>
K	M	57	uzlina	x	NL	více kopií nebo přestavba	NL	-
L	M	77	sternum	x	x	ND	ND	-
M	M	69	žaludek	NL	NL	ND	ND	-
N	M	60	mozek	NL	NL	ND	ND	-
O	M	50	mozek	více kopií	NL	ND	ND	-
P	Ž	76	pánev	x	x	ND	ND	-
Q	Ž	41	sval kosterní	x	x	ND	ND	-
R	M	80	žaludek	x	x	ND	ND	-
S	M	63	žaludek	více kopií	NL	ND	ND	-
T	Ž	78	uzlina	více kopií	NL	ND	ND	-
U	M	72	uzlina	x	x	ND	ND	-
V	M	82	nadledvina	x	x	ND	ND	-
W	M	74	oční víčko	NL	NL	ND	ND	-

Legenda: M = muž, Ž = žena, NL = normální nález, + = pozitivní nález, ND = not done, x = neúspěšné vyšetření

6 Diskuze

Nehodgkinské lymfomy představují 90 % všech lymfomů. Z těchto 90 % je 85 – 90 % odvozeno z B-lymfocytů a tvoří skupinu B-NHL. B-NHL je maligní lymfoproliferativní onemocnění vycházející z různě zralých B-lymfocytů. Na základě klinického projevu, histopatologického, imunofenotypického a genetického nálezu jej můžeme rozdělit do několika podskupin. Mezi nejčastější B-NHL řadíme: difuzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL), Burkittův lymfom (BL), folikulární lymfom (FL), lymfom z pláštěvých buněk (MCL) a lymfom z buněk marginální zóny (MZL) (Shankland *et al.*, 2012).

V období od října 2018 do března 2020 jsem v LCG HOK FNOL metodou FISH na FFPE řezech vyšetřila celkem 43 pacientů s B-NHL. Věkové rozmezí se pohybovalo od 26 do 83 let, medián věku činil 65 let. Pytlík *et al.* (2013) uvádí, že medián věku se u pacientů s B-NHL, vyjma BL, pohybuje v rozmezí 55 – 65 let. Medián mého souboru se tedy pohybuje na horní hranici. Celkem bylo úspěšně vyšetřeno 34 pacientů, z čehož u 30 (88 %) byla detekována nějaká chromozomová aberace.

Z celého souboru měli dva pacienti na základě vyšetření klinikem a histopatologem navrženou diagnózu BL, 3 pacienti FL, 23 pacientů DLBCL/HGBL, 1 pacient MCL, 2 pacienti MZL a 12 pacientů mělo jinou nebo zatím blíže neurčenou diagnózu. Diagnóza byla kombinací metody FISH na FFPE řezech a imunohistochemického vyšetření potvrzena u DLBCL v 18 případech (62 %), u FL (10 %), BL (7 %), MZL (7 %) a MCL (3 %) ve všech případech podezření. Zbýlých 11 % tvořili pacienti s jinou diagnózou. U některých pacientů není konečná diagnóza známa z důvodu provedení pouze konzultace pro jiné externí pracoviště. Swerdlow *et al.* (2017) uvádí, že nejčastějším typem B-NHL je DLBCL, který je detekován ve 30 % případů, druhým nejčastějším typem je FL, který se vyskytuje ve 25 % případů, následují MZL v 8 % případů, MCL 3 – 10 % případů a velmi vzácně BL. Procentuální rozdíly mezi mým souborem pacientů a literaturou jsou pravděpodobně zapříčiněny malým počtem vyšetřených pacientů a selekcí pacientů.

V rámci mé diplomové práce jsem se také zaměřila na nově vzniklou kategorii high-grade B-buněčných lymfomů s přestavbou genů *MYC*, *BCL2* a *BCL6*, tzv. double-hit, případně triple-hit lymfomy. V mém souboru pacientů byl zachycen jeden pacient s THL (6 %) a dva pacienti (11 %) se suspektním DHL (celkem 17 %). U těchto dvou pacientů byla shodně prokázána translokace t(8;14)(q24;q32) s přestavbou genů *MYC* a *IGH*. Zároveň byla u obou prokázána delece oblasti přiléhající k 5' konci genu *BCL6*, která by mohla být způsobena např. nebalancovanou translokací oblasti 3q27.3 s neznámým partnerským chromozomem, popř. intersticiální delecí na dlouhých ramenech chromozomu 3, což by mohlo vést k následné

[Type here]

přestavbě genu *BCL6*, jako je tomu u pacientů s DHL. Tyto pacienty nelze dále přesněji vyšetřit z důvodu nedostatku vhodného materiálu pro další molekulárně biologické analýzy a z důvodu nedostupnosti komerční sondy, která by pokrývala samotný gen *BCL6*. U těchto pacientů doporučujeme pečlivé sledování klinického průběhu jejich onemocnění. Stephens *et al.* (2018) uvádí, že mezi nově diagnostikovanými DLBCL představují DHL a THL až 10 % všech případů.

Také jsem v rámci spolupráce s Ústavem klinické a molekulární patologie FNOL retrospektivně (od roku 2017 do roku 2019) vyšetřila 23 pacientů s diagnózou DLBCL. Tito pacienti byli vybíráni cíleně – na základě agresivního chování onemocnění a morfologických a histopatologických znaků zde existoval předpoklad pro DHL nebo THL. Celkem bylo úspěšně vyšetřeno 14 pacientů, z čehož byl DHL prokázán u jedné pacientky (8 %).

Obrovským limitem cytogenetického vyšetření u B-NHL je v drtivé většině případů nedostupnost nativního nádorového materiálu, z důvodu nízké infiltrace periferní krve nebo kostní dřeně nádorovými buňkami. Z tohoto důvodu se přistupuje k FISH na FFPE řezech. Úspěšnost FISH na FFPE řezech je závislá na délce fixace nádorového materiálu ve formolu a na kvalitě řezu, především na jeho tloušťce. Čím déle působí formaldehyd na tkáň, tím více dochází k degradaci DNA, změně primární struktury DNA a vytváření cross-linkových vazeb mezi vlákny DNA (Karlsen *et al.*, 1994). Díky těmto změnám nedochází k nasednutí sondy na DNA a hybridizace je nehodnotitelná. Na FFPE řezech lze navíc technicky spolehlivě hodnotit pouze přestavby genů, numerické aberace jsou obtížně hodnotitelné. V ideálním případě, kdy je k dispozici nativní nádorový materiál, může být provedena klasická cytogenetika, FISH na kultivovaných buňkách, případně pokud jsou k dispozici mitózy, tak mFISH.

Metoda FISH je velmi důležitá především při dělení B-NHL do jednotlivých skupin. Pro každou skupinu existují typické chromozomové aberace a genové mutace, z nichž některé mají prognostický význam. Detekce těchto chromozomových aberací a genových přestaveb v kombinaci s dalšími klinickými, imunofenotypickými a histopatologickými parametry je velmi důležitá pro správnou diagnostiku těchto onemocnění, přispívá ke stanovení prognózy a volbě léčebné strategie a zároveň je důležitým nástrojem pro sledování případné progresse onemocnění.

Díky FISH jsme rovněž schopni detekovat DHL nebo THL, které nelze spolehlivě jinými analýzami rozpoznat. V těchto případech je jednoznačná diagnóza nesmírně důležitá, jelikož DHL/THL patří mezi vysoce agresivní lymfomy, které jsou rezistentní ke standardní terapii, a díky přesné diagnóze může být použita cílenější terapie.

7 Závěr

Cílem této práce byla detekce přestaveb kandidátních genů, mezi které patří geny *MYC*, *BCL2* a *BCL6* a další, na FFPE řezech u pacientů s B-nehodgkinskými lymfomy (B-NHL) pomocí metody FISH. Sestavila jsem dva soubory pacientů s B-NHL s imunohistochemicky stanovenou expresí genů *MYC*, *BCL2*, *BCL6* a dalších. U těchto pacientů jsem prováděla metodu FISH na parařinových řezech tkání s použitím sond specifických pro B-NHL: *MYC*, *BCL2*, *BCL6* a dalších. Pokud byl k dispozici i nativní nádorový materiál, prováděla jsem FISH, případně mFISH na kultivovaných buňkách. Výsledky hybridizací jsem hodnotila pod fluorescenčním mikroskopem, získaná data byla dále použita v klinickém rozhodování. V rámci prvního souboru jsem vyšetřila 43 pacientů s diagnózou B-NHL, z nichž dva pacienti měli na základě vyšetření klinikem a histopatologem navrženou diagnózu BL, 3 pacienti FL, 23 pacientů DLBCL/HGBL, 1 pacient MCL, 2 pacienti MZL a 12 pacientů mělo jinou nebo zatím blíže neurčenou diagnózu. Z 18 potvrzených případů DLBCL spadali dva pacienti do nově vzniklé kategorie podle WHO 2017 double-hit lymfom a jeden pacient do kategorie triple-hit lymfom. Diagnóza byla potvrzena u všech pacientů, kteří přišli s podezřením na BL, FL, MZL a MCL. U některých pacientů není známa konečná diagnóza z důvodu provedení pouze konzultačního vyšetření pro jiné externí pracoviště. Dále jsem retrospektivně vyšetřila 23 pacientů s diagnózou DLBCL, u kterých byl předpoklad DHL nebo THL. Z 14 úspěšně vyšetřených pacientů byla tato diagnóza prokázána u jedné pacientky.

Cytogenetické a molekulárně cytogenetické změny mají u B-NHL velký význam pro stanovení diagnózy či upřesnění subtypu onemocnění, zároveň mají také vliv na volbu léčebné strategie. Z nedostatku vhodného materiálu se velmi často vyšetření provádí metodou FISH na FFPE řezech nádorových tkání, která má sice svá omezení, avšak přesto přináší velmi cenné informace. Pro správné určení diagnózy je nezbytné výsledky FISH na FFPE řezech kombinovat s výsledky dalších laboratorních vyšetření a s klinickou charakteristikou pacientů.

[Type here]

8 Literatura

Adam Z., Krejčí M., Vorlíček J. (2008): Hematologie – Přehled maligních hematologických nemocí: 2., doplněné a zcela přepracované vydání. Grada, Praha.

Armitage J. O., Mauch P. M., Lee Haris N., Coiffier B., Dalla-Favera R. (2009): Non-Hodgkin Lymphomas. Lippincott Williams and Wilkins.

Belada D., Trněný M., Campr V., Dědečková K., Janíková A., Jindra P., Klener P., Kopecký O., Kouba M., Král Z., Kopečková K., Marková J., Móciková H., Polívka J., Procházka V., Pytlík R., Rusinová K., Smolej L., Sýkorová A., Šálek D., Šmardová L., Špaček M., Válková V., Vokurka S. (2018): Diagnostické a léčebné postupy u nemocných s maligními lymfomy. HK CREDIT s.r.o., Hradec Králové.

Bouchalová K., Hajdúch M., Bouchal J., Hlobilková A., Houdová M., Hudcová M., Koudeláková V., Medalová J., Srovnal J., Trojanec R. (2016): Prediktivní a prognostická onkologie. Univerzita Palackého Olomouc, Olomouc.

Copie-Bergman Ch., Cuillière-Dartigues P., Baia M., Briere J., Delaure R., Canioni D., Salles G., Parrens M., Belhadj K., Fabiani B., Recher Ch., Petrella T., Kettener N., Peyrade F., Haioun C., Nagel I., Siebert R., Jardin F., Leroy K., Jais J-P., Tilly H., Molina T. J., Gaulard P. (2015): *MYC-IG* rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood* (126): 2466 – 2474.

Dierlamm J., Baens M., Wlodarska I., Stefanova-Ouzounova M., Hernandez J. M., Hossfeld D. K., De Wolf-Peeters Ch., Hagemeijer A., Van den Berghe H., Marynen P. (1999): The Apoptosis Inhibitor Gene *API2* and a Novel 18q Gene, *MLT*, Are Recurrently Rearranged in the *t(11;18)(q21;q21)* Associated With Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphomas. *Blood* (93) 3601 – 3609

Evrard S.M., Péricart S., Grand D., Amara N., Escudié F., Gilhodes J., Bories P., Traverse-Glehen A., Dubois R., Brousset P., Parrens M., Laurent C. (2019): Targeted next sequencing reveals high mutation frequency of *CREBBP*, *BCL2* and *KMT2D* in high-grade B-cell lymphoma with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* rearrangements. *Morphologie* 103(342): 80-81.

Federico M., Bellei M., Marcheselli L., Luminari S., Lopez-Guillermo A., Vitolo U., Pro B., Pileri S., Pulsoni A., Soubeyran P., Cortelazzo S., Martinelli G., Martelli M., Rigacci L., Arcaini L., Di Raimondo F., Merli F., Sabattini E., McLaughlin P., Solal-Céligny P. (2009): Follicular Lymphoma International Prognostic Index 2: A New Prognostic Index for

[Type here]

Follicular Lymphoma Developed by the International Follicular Lymphoma Prognostic Factor Project. *Journal of Clinical Oncology* (27): 4555 – 4562.

Gebauer N., Bernard V., Gebauer W., Thorns Ch., Feller A.C., Merz H. (2015): TP53 mutations are frequent events in double-hit B-cell lymphomas with MYC and BCL2 but not MYC and BCL6 translocations. *Leukemia a Lymphoma* 56(1): 179-185.

Ghielmini M., Montoto S. (2015). *Lymphomas essentials for clinicians*. ESMO press, Viganello-Lugano.

Gonzalez-Farre B., Ramis-Zaldivar J. E., Salmeron-Villalobos J., Balagué O., Celis V., verdum Amoros J., Nadeu F., Sábado C., Ferrández A., Garrido M., Panizo F. M., Astigarraga I., Andrés M., Jaffe E. S., Campo E., Salaverria I. (2019): Burkitt-like lymphoma with 11q aberration: a geminal center-derived lymphoma genetically unrelated to Burkitt lymphoma. *Haematologica* 104 (9): 1822 – 1829.

Hatton Ch., Collins G., Sweetenham J. (2014): *Fast Facts: Lymphoma*. Health Press Limited, Oxford.

Hermine O., Haioun C., Lepage E., d'Agay M-F., Briere J., Lavignac C., Fillet G., Salles G., Marolleau J-P., Diebold J., Reyes F., Gaulard P. (1996): Prognostic Significance of bcl-2 Protein Expression in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* (87): 265 – 272.

Hořejší V., Bartůňková J., Brdička T., Spíšek R. (2017): *Základy imunologie*. Triton, Praha.

Hoster E., Dreyling M., Klapper W., Gisselbrecht Ch., van Hoof A., Kluin-Nelemans H. C., Pfreundschuh M., Reiser M., Metzner B., Einsele H., Peter N., Jung W., Wörmann B., Ludwig W. D., Dührsen U., Eimermacher H., Wandt H., Hasford J., Hiddemann W., Unterhalt M. (2008): A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 111 (2): 558 - 565.

Huang S., Nong L., Wang W., Liang L., Zheng Y., Liu J., Li D., Zhang B., Li T. (2019): Prognostic impact of diffuse large B-cell lymphoma with extra copies of MYC, BCL2 and/or BCL6: comparasion with double/tripple hit lymphoma and double expressor lymphoma. *Diagnostic Pathology* 14: 81.

Chen B-J., Fend F., Campo E., Martinez L.Q. (2019): Aggressive B.cell lymphomas-from morphology to molecular pathogenesis. *Annals of Lymphoma* 3: 3:1.

Chisholm K. M., Bangs Ch. D., Bacchi C. E., Molina-Kirsch H., Cherry A., Natkunam Y. (2015): Expression Profiles of MYC Protein and MYC Gene Rearrangement in Lymphomas. *The American Journal of Surgical Pathology* (39): 294 – 303.

[Type here]

Karlsen F, Kalantari M, Chitemerere M, Johansson B, Hagmar B. (1994): Modifications of Ahuman and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. *Lab Invest* 71(4):604 - 611.

Klein U., Dalla-Favera R. (2008): Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Reviews Immunology* (8): 22 – 33.

Korsmeyer S. J. (1999): BCL-2 Gene Family and the Regulation of Programmed Cell Death. *Cancer Research* 59: 1693 – 1700.

Kubisz P. a kolektiv (2006): Hematol6gia a transfuziol6gia. Grada, Praha.

K6ppers R. (2005): Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature Reviews* (5): 251 – 262.

Lenz G., Wright G. W., Tolga Emre N. C., Kohlhammer H., Dave S. S., Davis R. E., Carty S., Lam L. T., Shaffer A. L., Xiao W., Powell J., Rosenwald A., Ott G., Muller-Hermelink H. K., Gascoyne R. D., Connors J. M., Campo E., Jaffe E. S., Delabie J., Smeland E. B., Rimsza L. M., Fischer R. I., Weisenburger D. D., Chan W. C., Staudt L. M. (2008): Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *PNAS* (36): 13520 – 13525.

McGowan-Jordan J., Simons A., Schmid M. (2016): ISCN 2016: An International System for human Cytogenomic Nomenclature. Karger.

Obr A., Procházka V., Jirkuvová A., Urbánková H., Kriegová E., Schneiderová P., Vatulíková M., Papajík T. (2018): TP53 Mutation and Complex Karyotype Portends a Dismal Prognosis in Patients With Mantle Cell Lymphoma. *Clinical Lymphoma, Myeloma And Leukemia* (18): 762 – 768.

Phuoc V., Sandoval-Sus J., Chavez J. C. (2019): Drug therapy for double-hit lymphoma. *Drugs in Context* (8): 1 – 13.

Procházka V., Papajík T., Kubová Z., Trněný M., Kučerová L., Mysliveček M., Indrák K. (2009): Jak přistupovat k léčbě starších nemocných s difuzním velkobuněčným B-lymfomem. *Onkologie* (3): 158 – 163.

Pytlík R., Berková A., Ptáčník V. (2013): Moderní diagnostika a léčba nehodgkinských lymfomů. *Interní medicína pro praxi* 15 (3-4): 105 – 109.

Rokyta R. a kolektiv (2015): Fyziologie a patologická fyziologie. Grada, Praha.

Rosenthal A., Younes A. (2017): High grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 ond/or BCL6: Double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma. *Blood Reviews* (2) 37 – 42.

[Type here]

Sehn L. H., Berry B., Chhanabhai M., Fitzgerald C., Gill K., Hoskins P., Klasa R., Savage K. J., Shenkier T., Sutherland J., Gascoyne R. D., Connors J. M. (2007): The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* (109): 1857 – 1861.

Shaoying L., Desai P., Lin P., Yin C. C., Tang G., Wang X. J., Konoplev S N., Khoury J. D., Bueso-Ramos C. E., Medeiros L. J. (2016): MYC/BCL6 double-hit lymphoma (DHL): a tumour associated with an aggressive clinical course and poor prognosis. *Histopathology* 68(7): 1090 – 1098.

Shankland K. R., Armitage J. O., Hancock B. W. (2012): Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* (380): 848 – 857.

Shipp M. A., Harrington D. P., Anderson J. R., Armitage J. O., Bonadonna G., Brittinger G., Cabanillas F., Canellos G. P., Coiffier B., Connors J. M., Cowan R. A., Crowther D., Dahlberg S., Engelhard M., Fisher R. I., Gisselbrecht C., Horning S. J., Lepage E., Lister T. A., Meerwaldt J. H., Montserrat E., Nissen N. I., Oken M. M., Peterson B. A., Tondini C., Velasquez W. A., Yeap B. Y. (1993): A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *The New England Journal of Medicine* (329): 987 – 994.

Schneider Ch., Pasqualucci L., Dalla-Favera R. (2011): Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Seminars in Diagnostic Pathology* (28): 167 – 177.

Schuetz J. M., Johnson N. A., Morin R. D., Scott D. W., Tan K., Ben-Nierah S., Boyle M., Slack G. W., Marra M. A., Connors J. M., Brooks-Wilson A. R., Gascoyne R. D. (2012): BCL2 utations in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* (26): 1383 – 1390.

Stephens D. M., Smith S. M. (2018): Diffuse large B-cell lymphoma – who should we FISH?. *Ann Lymphoma* (2:8): 1 – 10.

Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L., Jaffe E. S., Pileri S. A., Stein H., Thiele J., Arber D. A., Hasserjian R. P., Le Beau M. M., Orazi A., Siebert R. (2017): WHO Classification of Tumorous of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

Šmardová J., Moulis M., Lišková K., Koptíková J., Hrabálková R., Klusáková J. (2014): Lymfomy se dvěma zásahy – přehled literatury a kazuistika. *Klinická Onkologie* (27): 24 – 32.

Tilly H., Gomes da Silva M., Vitolo U., Jack A., Meignan M., Lopez-Guillermo A., Walewski J., André M., Johnson P.W., Pfreundschuh M., Ladetto M. (2015): Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): EMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* (26): 116 – 125.

[Type here]

Ueda Ch., Akasaka T., Ohno H. (2009): Non-immunoglobulin/BCL6 Gene Fusion in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Prognostic Implications. *Leukemia a Lymphoma* (43): 1375 – 1381.

Urbánková H., Procházka V. (2020): Molekulárně genetická klasifikace difuzního velkobuněčného B-lymfomu. *Postgraduální medicína* (22)1: 5 – 8.