

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta

**CYTOMORFOLOGIE A IMUNOFENOTYP ZRALÝCH
CD5-POZITIVNÍCH B-LYMFOIDNÍCH NEOPLÁZIÍ**

Dizertační práce

MUDr. David Starostka

Olomouc 2017

Jméno a příjmení autora:

MUDr. David Starostka

Název dizertační práce:

Cytomorfologie a imunofenotyp zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií

Pracoviště:

Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.

Školící pracoviště:

Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Školitel: prof. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.

Rok obhajoby disertační práce: 2017

Abstrakt:

Diagnostika zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií je multidisciplinární. Cílem práce bylo vyhodnocení cytomorfologie a analýza imunofenotypu v souboru 233 diagnostických vzorků CD5+ B-lymfoidních neoplázií. V analyzovaném souboru se vyskytly: typická CLL, atypická CLL (CLL/PL a pleomorfní varianta CLL); malobuněčný typ u SLL; klasický MCL, malobuněčná, pleomorfní, blastoidní a MZL-like varianta MCL; malobuněčný typ, typ se středními/velkými lymfocyty, pleomorfní typ a typ s vilózními lymfocyty u CD5+ MZL; centroblastická, imunoblastická a anaplastická varianta u CD5+ DLBCL; malobuněčný typ, typ se středními/velkými lymfocyty a pleomorfní typ u skupiny neklasifikovatelných případů. MFI markerů CD79b, CD23, CD43, CD38, CD11c, FMC7, CD200 a lehkých řetězců kappa a jejich kombinace spolehlivě odlišily CLL od MCL i CD5+ MZL, a to včetně atypických případů. Kvantitativní analýza exprese použitým panelem markerů neumožnila zcela dokonalé rozlišení MCL a CD5+ MZL, přestože výrazně zpřesnila jejich odlišení v porovnání s kvalitativním hodnocením. Přehlednou vizualizaci expresního imunofenotypového profilu umožnila konstrukce datových sítí. Kvantifikace exprese informativních markerů s využitím MFI zpřesňuje diagnostiku zralých CD5+ B-lymfoidních neoplázií v porovnání s kvalitativním (pozitivita/negativita) či semikvantitativním hodnocením. Rutinní použití kvantitativního hodnocení expresního profilu vyžaduje konstrukci matematických modelů, které minimalizují subjektivitu hodnocení na expertní bázi.

Klíčová slova: cytomorfologie, imunofenotyp, CD5, B-lymfocyt, lymfom, leukémie

Dizertační práce byla zpracována v rámci řešení výzkumného záměru IGA_LF_2012_007, IGA_LF_2013_004, IGA_LF_2014_001.

The autor's first name and surname: David Starostka, M.D.

The title of the doctoral thesis:

Cytomorphology and immunophenotype of mature CD5-positive B-cell neoplasms

Department:

Department of Clinical Haematology, Hospital in Havířov

Department of Hemato-Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký
University Olomouc

Supervisor: Professor Tomáš Papajík, M.D., Ph.D.

The year of presentation: 2017

Abstract:

Diagnosis of mature CD5-positive B-cell neoplasms is multidisciplinary. The study aimed at evaluation of the cytomorphology and the analysis of immunophenotyped in 232 diagnostic specimens of mature CD5-positive B-cell neoplasms. The occurrence of cytomorphological types in specimens was: in CLL - typical form and atypical CLL (CLL/PL, pleomorphic CLL); in SLL – small cell type; in MCL – classical type, small cell, pleomorphic, blastoid and MZL-like variant, in CD5+ MZL – small cell type, medium/large lymphocyte type, pleomorphic type and type with villous lymphocytes; in CD5+ DLBCL – centroblastic, immunoblastic, anaplastic variant; in unclassified cases - small cell type, medium/large lymphocyte type, pleomorphic type. The intensity of expression (MFI) of CD79b, CD23, CD43, CD38, CD11c, FMC7, CD200 and kappa light chains and their combination reliably distinguish CLL from both MCL and CD5+ MZL, including atypical cases. Although quantitative analysis of expression with the studied panel of markers failed to perfectly distinguish MCL and CD5+ MZL, it considerably improved their distinction as compared with the qualitative assessment. The immunophenotypic expression profile was clearly visualized by constructing data networks. The quantification of expression of informative markers increases the diagnostic value of immunophenotyping as compared with qualitative (positivity/negativity) or semiquantitative assessments. The routine use of quantitative assessment of the expression profile requires the development of mathematical models that considerably minimize the subjectivity of expert-based assessment.

Keywords: cytomorphology, immunophenotype, CD5, B-cell, lymphoma, leukaemia

Supported by research projects IGA_LF_2012_007, IGA_LF_2013_004, IGA_LF_2014_001.

Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracoval samostatně pod vedením prof. MUDr. Tomáše Papajíka, CSc., uvedl jsem všechny použité literární zdroje a dodržoval jsem zásady vědecké etiky.

Souhlasím s půjčováním dizertační práce v rámci knihovních služeb.

V Havířově 5.4.2017

MUDr. David Starostka

Poděkování a věnování

Upřímný dík patří především mému školiteli panu prof. MUDr. Tomáši Papajíkovi, CSc., přednostovi Hemato-onkologické kliniky LF UP a FN Olomouc, za vedení během celé doby postgraduálního studia, za cenné rady a připomínky při tvorbě dizertační práce a též za dlouhodobou přátelskou spolupráci při diagnostice a léčbě pacientů s nemocemi krve tvorby.

Děkuji panu prof. MUDr. Karlu Indrákovi, DrSc., bývalému přednostovi Hemato-onkologické kliniky LF UP a FN Olomouc, který mě inspiroval k zahájení postgraduálního studia.

Chci poděkovat paní Dr. Ing. Evě Kriegové z Ústavu imunologie LF UP a FN Olomouc a informatikům z Fakulty elektrotechniky a informatiky VŠB-TU Ostrava v čele s doc. Mgr. Milošem Kudělkou, Ph.D., za neocenitelnou pomoc se zpracováním dat využitých v dizertační práci.

Tento spis by nemohl vzniknout bez precizní práce mých spolupracovníků – lékařů, VŠ specialistů a laborantek z Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., za což jim náleží mé upřímné poděkování. Inspirující a přátelské týmové prostředí, které vytvářejí, je trvalým zdrojem mé radosti.

Děkuji své učitelce paní primářce MUDr. Libuši Novosadové, pod jejímž vedením jsem dlouhá léta pracoval a která mě systematicky a nezištně prováděla cestami poznání oboru hematologie.

Na tomto místě bych také rád věnoval vzpomínku panu prof. MUDr. Ladislavu Chrobákovi, CSc., in memoriam, svému prvnímu učiteli klinické medicíny, vynikajícímu lékaři a vzácnému člověku, který ve mně vzbudil zájem o obor, ve kterém nyní pracuji.

Tuto práci věnuji paní primářce MUDr. Libuši Novosadové.

OBSAH

1. Úvod	11
2. Charakteristika a cíle práce	12
2.1. Charakteristika práce	12
2.2. Cíle práce	12
3. WHO klasifikace B-lymfoidních neoplázií	13
3.1 Principy WHO klasifikace nádorů hematopoetických a lymfoidních tkání	13
3.2 Rozdělení neoplázií ze zralých B-lymfocytů na základě principů WHO klasifikace	13
3.3 Změny WHO klasifikace nádorů hematopoetických a lymfoidních tkání ve skupině neoplázií ze zralých lymfocytů	14
4. Laboratorní metody diferenciální diagnostiky zralých B-lymfoidních neoplázií	16
4.1. Morfologický obraz – morfologické metody	16
4.1.1 <i>Cytologická analýza</i>	16
4.1.1.1 Základní princip hematologické cytologie	16
4.1.1.2 Pappenheimova metoda fixace a barvení	16
4.1.1.3 Cytologické hodnocení morfologie lymfocytů	17
4.1.2 <i>Histologická analýza</i>	18
4.2. Stanovení imunofenotypu – metoda průtokové cytometrie a imunohistochemie	18
4.2.1 <i>Analýza průtokovou cytometrií</i>	18
4.2.1.1 Základní charakteristika průtokové cytometrie	18
4.2.1.2 Základní konstrukční komponenty průtokového cytometru	18
4.2.1.2 Základní parametry analýzy průtokovou cytometrií	19
4.2.1.3 Monoklonální protilátky	21
4.2.1.4 Využití průtokové cytometrie u zralých B-lymfoidních neoplázií	21
4.2.2 <i>Imunohistochemická analýza</i>	25
4.3. Stanovení genetického profilu – cytogenetické a molekulárně cytogenetické metody	25
4.3.1 <i>Cytogenetická analýza</i>	25
4.3.2 <i>Molekulárně cytogenetická analýza</i>	25
4.3.2.1 Fluorescenční in situ hybridizace	25
4.3.2.2 Mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace	26
4.3.2.3 Spektrální karyotypování	26
4.3.2.4 Komparativní genomová hybridizace	26

4.3.2.5 Polymerázová řetězová reakce	26
4.3.2.6 Sekvenování nové generace	27
5. Základní charakteristika CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií	28
5.1 Antigen CD5 a jeho exprese na lymfocytech	28
5.2 Rozdělení zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií	29
6. Laboratorní charakteristika jednotlivých zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií – základní údaje	30
6.1 Chronická lymfocytární leukémie (CLL) a lymfom z malých lymfocytů (SLL)	30
6.1.1 Epidemiologie CLL	30
6.1.2 Diagnostická kritéria CLL	30
6.1.3 Morfologický obraz CLL	30
6.1.3.1 Lymfatické uzliny a slezina	30
6.1.3.2 Kostní dřeň a periferní krev	31
6.1.3.3 Atypická CLL	32
6.1.4 Imunofenotyp CLL	34
6.1.5 Genetika CLL	36
6.1.6 Progrese a transformace CLL do lymfomu s vysokým stupněm malignity	37
6.1.7 Lymfom z malých lymfocytů (SLL)	38
6.2 Lymfom z plášťových buněk (lymfom z buněk pláště, mantle cell lymphoma, MCL)	38
6.2.1 Definice MCL	38
6.2.2 Epidemiologie MCL	38
6.2.3 Morfologický obraz MCL	39
6.2.4 Imunofenotyp MCL	41
6.2.5 Genetika MCL	41
6.3 B-prolymfocytární leukémie (B-PLL)	42
6.3.1 Definice B-PLL	42
6.3.2 Epidemiologie B-PLL	43
6.3.3 Morfologický obraz B-PLL	43
6.3.3.1 Periferní krev a kostní dřeň.....	43
6.3.3.2 Ostatní tkáň mimo kostní dřeň	44
6.3.4 Imunofenotyp B-PLL	44
6.3.5 Genetika B-PLL	44
6.4 Lymfom z marginální zóny (marginal zone lymphoma, MZL)	44

6.4.1 Základní charakteristika MZL	44
6.4.2 Morfologický obraz MZL	45
6.4.3 Imunofenotyp MZL	45
6.4.4 Genetika MZL	45
6.4.5 Splenický (slezinný) lymfom z marginální zóny (splenic marginal zone lymphoma, SMZL)	46
6.4.5.1 Definice splenického MZL	46
6.4.5.2 Epidemiologie SMZL	46
6.4.5.3 Morfologický obraz SMZL	46
6.4.5.4 Imunofenotyp SMZL	47
6.4.5.5 Genetika SMZL	48
6.5 Zralé B-lymfoidní neoplázie s raritní expresí CD5	48
6.5.1 Difúzní velkobuněčný B-lymfom (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)	48
6.5.1.1 Definice DLBCL	48
6.5.1.2 Morfologický obraz DLBCL	48
6.5.1.2 Imunofenotyp DLBCL	50
6.5.2 Folikulární lymfom (follicular lymphoma, FL)	50
6.5.2.1 Definice FL	50
6.5.2.2 Morfologický obraz FL	51
6.5.2.3 Imunofenotyp FL	51
6.5.3 Lymfoplazmocytární lymfom/Waldenströmova makroglobulinémie (lymphoplasmacytic lymphoma, LPL)	52
6.5.3.1 Definice LPL	52
6.5.3.2 Morfologický obraz LPL	52
6.5.3.3 Imunofenotyp LPL	53
6.5.4 Burkittův lymfom (Burkitt lymphoma, BL)	54
6.5.4.1 Definice BL	54
6.5.4.2 Morfologický obraz BL	54
6.5.4.3 Imunofenotyp BL	55
7. Cytomorfologie a imunofenotyp souboru CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií	56
7.1 Základní charakteristika souboru	56
7.2 Metody	59
7.2.1 Metodika cytomorfologického hodnocení	59

7.2.1.1 Odběr primárního vzorku a transport do laboratoře	59
7.2.1.2 Zpracování primárního vzorku před fixací a barvením	59
7.2.1.3 Fixace a barvení nátěrů, cytocentrifugovaných preparátů a otiskových preparátů uzlin	60
7.2.1.4 Cytologické hodnocení nátěrů, cytocentrifugovaných preparátů a otiskových preparátů uzlin	61
7.2.2 Metodika stanovení imunofenotypového profilu	62
7.2.2.1 Odběr primárního vzorku a transport do laboratoře	62
7.2.2.2 Příprava buněčné suspenze	62
7.2.2.3 Zpracování vzorku (buněčné suspenze) k analýze průtokovou cytometrií	63
7.2.2.4 Analýza průtokovou cytometrií	66
7.2.2.5 Kalibrace průtokového cytometru a kontrola kvality	68
7.2.3 Metodika statistického zpracování dat	69
7.3 Výsledky	69
7.3.1 Výsledky cytomorfoloické analýzy	69
7.3.1.1 Cytomorfologie chronické lymfocytární leukémie a lymfomu z malých lymfocytů	69
7.3.1.2 Cytomorfologie lymfomu z plášťových buněk	75
7.3.1.3 Cytomorfologie lymfomu z marginální zóny	81
7.3.1.4 Cytomorfologie difúzního velkobuněčného B-lymfomu	86
7.3.1.5 Cytomorfologie neklasifikovatelných CD5+ B-lymfoidních neoplázií	89
7.3.1.6 Výskyt morfoloických typů zralých CD5-pozitivních neoplázií	89
7.3.2 Výsledky analýzy imunofenotypu průtokovou cytometrií	90
7.3.2.1 Imunofenotyp chronické lymfocytární leukémie a lymfomu z malých lymfocytů	90
7.3.2.2 Imunofenotyp lymfomu z plášťových buněk	95
7.3.2.3 Imunofenotyp lymfomu z marginální zóny	99
7.3.2.4 Imunofenotyp difúzního velkobuněčného B-lymfomu	100
7.3.2.5 Imunofenotyp neklasifikovatelných CD5+ B-lymfoidních neoplázií	102
7.3.2.6 Hodnoty CLL skóre u jednotlivých diagnostických skupin	103
7.3.2.7 Srovnání imunofenotypových rysů mezi jednotlivými diagnostickými entitami na základě MFI	103
7.3.2.7.1 Selekcce případů pro komparaci	103
7.3.2.7.2 Srovnání CLL/SLL a MCL	104

7.3.2.7.3 Srovnání CLL/SLL a CD5+ MZL	107
7.3.2.7.4 Srovnání MCL a CD5+ MZL	110
7.3.2.7.5 Srovnání podskupin CLL (podskupina s CLL skóre 4+5 a podskupina s CLL skóre 3)	113
7.3.2.8 Vyhodnocení diferenciálně diagnostického potenciálu dvojkombinací a trojkombinací informativních markerů u CLL, MCL a CD5+ MZL	116
7.3.2.8.1 Diferenciální diagnostika CLL a MCL	116
7.3.2.8.2 Diferenciální diagnostika CLL a CD5+ MZL	118
7.3.2.8.3 Diferenciální diagnostika MCL a CD5+ MZL	120
7.3.2.8.4 Grafické znázornění rozdílů exprese nejinformativnějších markerů odlišujících CLL/SLL, MCL a CD5+MZL.....	122
7.3.2.8.5 Rozdíly imunofenotypu CLL3 a CLL4+5.....	124
7.3.2.9 Vizualizace expresního profilu imunofenotypu CLL/SLL, MCL, CD5+ MZL a neklasifikovatelných zralých CD5-pozitivních neoplázií pomocí datových sítí	124
8. Diskuze	129
8.1 Cytomorfologie zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií	129
8.2 Imunofenotyp zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií	132
8.2.1 Konstrukce diagnostického panelu	132
8.2.2 Diagnostický význam analyzovaných markerů	133
8.2.3 Diagnostický význam kombinací informativních markerů.....	137
8.2.4 Diagnostický význam CLL skóre	138
8.2.5 Atypický (variantní) imunofenotyp	138
8.2.6 Intratumorózní variabilita imunofenotypu	140
9. Závěry	141
10. Abecední seznam zkratk	144
11. Reference	147
12. Přehled obrázků	157
13. Přehled tabulek	163

1. Úvod

Zralé CD5-pozitivní B-lymfoidní neoplázie představují významnou skupinu definovaných diagnostických jednotek v rámci WHO klasifikace nádorů hematopoetické a lymfoidní tkáně. Laboratorní diagnostika CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií je multidisciplinární a zahrnuje metody morfologické, metody stanovení imunofenotypu a metody cytogenetiky a molekulární cytogenetiky. Podrobná diferenciální diagnostika těchto onemocnění je zcela nezbytná a má zásadní klinický význam. Biologický charakter jednotlivých entit této skupiny nemocí je totiž velmi rozmanitý, což klíčovým způsobem rozhoduje o jejich klinickém průběhu a ovlivňuje volbu individuální léčebné strategie u těchto chorob. Cytomorfologický obraz těchto nemocí je velmi pestrý a má značný morfologický překryv. Standardní hodnocení jejich imunofenotypu je kvalitativní či semikvantitativní. Údaje o klinickém využití kvantitativního hodnocení expresního profilu imunofenotypu těchto nemocí jsou omezené.

2. Charakteristika a cíle práce

2.1. Charakteristika práce

Předkládaná práce analyzuje soubor 232 vzorků zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií z hlediska jejich cytomorfologických a imunofenotypových rysů. V tomto kontextu práce zdůrazňuje detailní prvky diferenciální diagnostiky jednotlivých entit CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií v rámci WHO klasifikace nádorů hematopoetické a lymfoidní tkáně.

2.2. Cíle práce

2.2.1. Podat komplexní a aktuální přehled poznatků o cytomorfolologii a imunofenotypu zralých CD5-pozitivních neoplázií.

2.2.2. Sestavit vlastní diagnostický panel pro stanovení imunofenotypu zralých B-lymfoidních neoplázií metodou multiparametrové průtokové cytometrie v rámci WHO klasifikace nádorů hematopoetické a lymfoidní tkáně.

2.2.3. Analyzovat vlastní výsledky stanovení cytomorfologických charakteristik a imunofenotypového profilu v souboru případů zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií a zasadit je do rámce známých údajů o imunocytologické diferenciální diagnostice těchto onemocnění.

3. WHO klasifikace neoplázií ze zralých B-lymfocytů

3.1 Principy WHO klasifikace nádorů hematopoetických a lymfoidních tkání

Klasifikace je jazykem medicíny: dříve než mohou být nemoci diagnostikovány, léčeny a studovány, musejí být popsány, definovány a pojmenovány. Hlavním principem WHO klasifikace je definice reálných nemocí, které lze rozpoznat s využitím dostupných vyšetřovacích metod a které se jeví být unikátními klinickými jednotkami. Tento přístup ke klasifikaci využívá všech dostupných informací – morfologie, imunofenotypu, genetického profilu a klinických rysů nádoru. Relativní důležitost zmíněných prvků klasifikace se liší mezi jednotlivými diagnostickými entitami a neexistuje „zlatý standard“, na jehož základě by bylo možno univerzálně definovat všechny nádory hematopoetické a lymfoidní tkáně. Diagnostika těchto neoplázií má proto komplexní a multidisciplinární charakter. (1)

3.2 Rozdělení neoplázií ze zralých B-lymfocytů na základě principů WHO klasifikace

WHO klasifikace nádorů hematopoetických a lymfoidních tkání z roku 2008 rozděluje zralé B-buněčné neoplázie následovně:

- chronická lymfocytární leukémie/lymfom z malých lymfocytů
- B-prolymfocytární leukémie
- splenický lymfom z marginální zóny
- vlasatobuněčná leukémie
- splenický B-buněčný lymfom/leukémie, neklasifikovatelný, včetně splenického difuzního malobuněčného lymfomu červené pulpy
- lymfoplazmocytární lymfom a Waldenströмова makroglobulinémie
- plazmocelulární neoplázie (nemoc z těžkých řetězců, plazmocelulární myelom, solitární kostní plazmocytom, extraoseální plazmocytom)
- extranodální lymfom z marginální zóny z lymfoidní tkáně sliznic (MALT lymfom)
- nodální lymfom z marginální zóny
- folikulární lymfom
- primární kožní lymfom z centra folikulů
- lymfom z buněk pláště (lymfom z plášťových buněk)

- difuzní velkobuněčný B-lymfom, jinak nespecifikovaný, včetně difuzního velkobuněčného B-lymfomu bohatého na T-lymfocyty/histiocyty, primárního difuzního velkobuněčného lymfomu CNS, primárního kožního lymfomu končetinového typu a EBV-pozitivního difuzního velkobuněčného B-lymfomu starších pacientů
- difuzní velkobuněčný B-lymfom asociovaný s chronickým zánětem
- lymfomatoidní granulomatóza
- primární mediastinální (thymický) velkobuněčný B-lymfom
- intravaskulární velkobuněčný B-lymfom
- ALK-pozitivní velkobuněčný B-lymfom
- plazmablastický lymfom
- velkobuněčný B-lymfom vznikající u HHV-8 asociované mulicentrické Castlemanovy nemoci
- primární lymfom výpotku
- Burkittův lymfom
- neklasifikovatelný B-buněčný lymfom s rysy intermediárními mezi difuzním velkobuněčným lymfomem a Burkittovým lymfomem
- neklasifikovatelný B-buněčný lymfom s rysy intermediárními mezi difuzním velkobuněčným B-lymfomem a klasickým Hodgkinovým lymfomem. (1)

3.3 Změny WHO klasifikace nádorů hematopoetických a lymfoidních tkání ve skupině neoplázií ze zralých lymfocytů

V roce 2016 byly připraveny změny WHO klasifikace nádorů hematopoetických a lymfoidních tkání, které zahrnují v rámci zralých B-buněčných neoplázií:

- zdůraznění souvislosti monoklonální B-lymfocytózy s vyšším počtem lymfocytů a chronické lymfocytární leukémie/lymfomu z malých lymfocytů
- intenzivní zájem o proliferální centra u chronické lymfocytární leukémie/lymfomu z malých lymfocytů
- přejmenování folikulárního lymfomu in situ na in situ folikulární neoplázií
- definice pediatrického typu folikulárního lymfomu jako nové diagnostické entity
- zdůraznění specifických rysů duodenálního typu folikulárního lymfomu a difuzního low-grade folikulárního lymfomu

- vyčlenění difuzního B-lymfomu s přestavbou IRF4 jako provizorní diagnostické entity
- zdůraznění rozdílu mezi klasickým lymfomem z pláštěvých buněk a leukemickým neuzlinovým lymfomem z pláštěvých buněk s většinovým indolentním průběhem
- přejmenování lymfomu z pláštěvých buněk in situ na in situ neoplázií z pláštěvých buněk
- zdůraznění nově definovaných molekulárně genetických změn na základě sekvenování nové generace („next generation sequencing“) u vlasatobuněčné leukémie, lymfoplazmocytárního lymfomu / Waldenströmovy makroglobulinémie, chronické lymfocytární leukémie, lymfomu z pláštěvých buněk a folikulárního lymfomu
- zdůraznění nutnosti rozlišení mezi GCB a ABC subtypem difuzního velkobuněčného lymfomu minimálně na základě imunohistochemického nálezu se zásadním klinickým dopadem
- zdůraznění významu přestavby genu *MYC* a dalších změn detegovaných pomocí sekvenování nové generace u difuzního velkobuněčného lymfomu
- přejmenování EBV+ difuzního velkobuněčného lymfomu dospělých na EBV+ difuzní velkobuněčný B-lymfom, blíže nespecifikovaný
- vyčlenění nové diagnostické kategorie EBV+ mukokutánní vřed
- zdůraznění významu genetických změn nově detegovaných pomocí sekvenování nové generace u Burkittova lymfomu a zřízení nové provizorní diagnostické jednotky lymfom podobný Burkittovu lymfomu s aberací 11q
- zrušení diagnostické kategorie neklasifikovatelný B-buněčný lymfom s rysy intermediárními mezi difuzním velkobuněčným lymfomem a Burkittovým lymfomem a její náhrada kategoriemi „high-grade“ B-lymfom s přestavbou *MYC* a *BCL2* a/nebo *BCL6* a „high-grade“ B-lymfom, blíže nespecifikovaný. (2)

4. Laboratorní metody diferenciální diagnostiky zralých B-lymfoidních neoplázií – základní principy

Laboratorní diferenciální diagnostika CD5+ B-lymfoproliferací se opírá o tři multidisciplinární diagnostické pilíře: morfologický obraz, imunofenotypový profil a genetickou charakteristiku.

4.1. Morfologický obraz - morfologické metody

4.1.1 Cytologická analýza

4.1.1.1 Základní princip hematologické cytologie

U cytologie jsou vyšetřovaným materiálem nátěry periferní krve a kostní dřeně, otiskové preparáty lymfatických uzlin nebo preparáty tělesných tekutin (punktát či mozkomíšní mok) zpracované cytocentrifugací, které jsou následně barveny panoptickým barvením Pappenheimovou metodou a vyšetřovány ve světelném mikroskopu. (3)

4.1.1.2 Pappenheimova metoda fixace a barvení

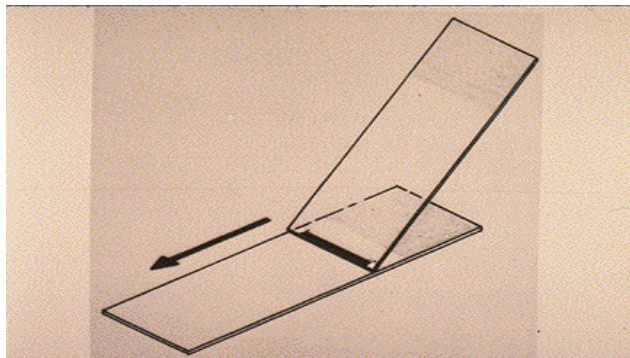
Pappenheimova metoda se skládá z následujících úkonů:

- zhotovení nátěru, otiskového preparátu nebo preparátu tělesných tekutin,
- fixace nátěru, otiskového preparátu nebo preparátu tělesných tekutin,
- barvení nátěru, otiskového preparátu nebo preparátu tělesných tekutin,
- hodnocení nátěru, otiskového preparátu nebo preparátu tělesných tekutin. (4)

Nátěry lze zhotovit manuálně pomocí roztěrového sklíčka, pomocí speciálních přístrojů využívajících roztěrové sklíčko nebo sprejování nebo na barvicím automatu. Nátěry se mají připravit nejpozději do 4 hodin po odběru. Při manuálním zhotovení nátěru se kapka krve či kostní dřeně nanese do středu podložního sklíčka a asi ¼ od jeho okraje. Nátěr se provede lehkým rovnoměrným pohybem roztěrového sklíčka přiloženého pod úhlem 30-40° (obr. 1). Nátěr musí být rovnoměrný, stejnorodý a přiměřeně tenký, musí

mít dlouhé rovné okraje a přecházet do ztracena cca 2 cm před koncem sklíčka. Hotový nátěr se nechá na vzduchu dobře zaschnout. (4)

Obr. 1. Provádění nátěru periferní krve a kostní dřeně



Otiskový preparát k cytologickému hodnocení se zhotovuje plošným či meandrovitým otiskem řezné plochy odebrané tkáně, nejčastěji lymfatické uzliny či její části, na podložní sklíčko.

Preparát tělesné tekutiny se zhotovuje cytocentrifugací.

Fixace a barvení nátěru se provádí s využitím kombinace barviv May-Grünwald a Giemsa-Romanowski. Složkami barviva May-Grünwald jsou eozin, metylenová modř, metylalkohol a glycerol, u barviva Giemsa-Romanowski jsou to azur-eozin II, azur II, glycerol a metylalkohol. May-Grünwald barví acidofilní buňky a neutrofilní granulaci leukocytů, Giemsa-Romanowski barví jak cytoplazmu monocytů a lymfocytů, tak chromatin jádra. (4)

Obarvené a osušené nátěry se hodnotí světelným mikroskopem s využitím imerzních nebo neimerzních objektivů v přiměřeně tenké oblasti nátěru. Zvětšení mikroskopu se volí podle toho, zda je nátěr volně prohlížen (hodnocení kvality, buněčnosti a rozložení buněk při 100-200 násobném zvětšení) nebo se provádí detailní hodnocení jednotlivých buněk (zvětšení 500-1000 krát). K dispozici jsou také digitální morfologické analyzátory. (4)

4.1.1.3 Cytologické hodnocení morfologie lymfocytů

V případě lymfocytů (předmět dizertační práce) se stanovuje jejich početní zastoupení včetně výskytu a kvantity patologických lymfocytů. Hodnocené morfologické prvky při

1000 násobném zvětšení zahrnují: velikost buněk, poměr cytoplazmy a jádra, velikost, tvar a lokalizace jádra, charakter jaderného chromatinu, přítomnost a lokalizace nukleolů, barvitelnost cytoplazmy, přítomnost intracytoplazmatických vakuol, granulí nebo inkluzí. (3)

4.1.2 Histologická analýza

Histologické vyšetření se realizuje u bioptických vzorků po jejich fixaci a zpracování do podoby tenkých tkáňových řezů z parafínových bločků. Základním histologickým barvením je hematoxylin-eozin, morfologické hodnocení světelnou mikroskopií je obdobné jako v případě cytologie, navíc využívá informací o detailní mikroarchitektonice postižené tkáně. (3)

4.2. Stanovení imunofenotypu – metoda průtokové cytometrie a imunohistochemie

4.2.1 Analýza průtokovou cytometrií

4.2.1.1 Základní charakteristika průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie umožňuje rychlou kvalitativní a kvantitativní analýzu optických a fluorescenčních vlastností obrovského množství elementů (buněk nebo jiných částic) v tekutých suspenzích. Tato vysoce senzitivní a rychlá laboratorní metoda v sobě spojuje principy fluorescenční mikroskopie a hematologického analyzátoru. Multiparametrický charakter analýzy umožňuje souběžné stanovení řady parametrů na povrchu či uvnitř buněk. Základními analyzovanými prvky jsou velikost částic, denzita jejich vnitřního obsahu (granularita) a intenzita fluorescence. (3, 5, 6)

4.2.1.2 Základní konstrukční komponenty průtokového cytometru

Základními konstrukčními prvky průtokového cytometru je fluidní systém, optický systém a počítačový systém.

Fluidní systém zajišťuje transport analyzovaných částic nosnou kapalinou do místa měření v průtokové kyvetě. Laminárním prouděním nosné kapaliny a konickým tvarem průtokové kyvety je docílena tzv. hydrodynamická fokuzace vstříkovaného vzorku, tj. vytvoření koaxiálního proudu měřených elementů, ve kterém v místě měření prochází v okamžiku analýzy pouze jediná buňka. (5, 6)

Optický systém se sestává z excitační optiky a sběrných optických cest. Excitační optiku tvoří zdroj záření se stabilní emisí fotonů a optická soustava usměrňující paprsek do měřicího bodu. Zdrojem záření je jeden či více laserů, nejčastěji argonový (modrý) laser s emisní vlnovou délkou 488 nm a helium-neonový (červený) laser emitující světlo o vlnové délce 635 nm. Kromě těchto základních typů se používají též jiné druhy laserů (Kr, He-Cd, neodým-YAG, polovodičový atd.) Sběrnou optiku tvoří soustava čoček, dichroických zrcadel a filtrů zajišťující usměrnění rozptýleného světla (light scatter) a emisního záření, které vzniká dopadem laserového záření na částice značené fluorochromem, na příslušné detektory. Signál dopředného rozptylu (forward scatter) zachytí fotodioda dopředného rozptylu. Signál bočního rozptylu (side scatter) a fluorescence zachycují detektory skládající se z fotonek s násobičem. Detegované fotony jsou převedeny na sekundární emisi elektronů transformovanou na napěťový pulz, který je následně lineárně či logaritmicky amplifikován, digitalizován a graficky znázorněn pomocí počítačového (výpočetního) systému (software). Počítačový systém slouží také k elektronické selekci analyzovaných částic (gating) a simultánnímu zpracování jednotlivých signálů. (5, 6)

4.2.1.2 Základní parametry analýzy průtokovou cytometrií

Mezi základní parametry analyzované průtokovou cytometrií patří dopředný rozptyl, boční rozptyl a fluorescence.

Fotodioda dopředného rozptylu zachycuje signál v úhlu 20° od osy laserového paprsku nazývaném forward scatter channel (FSC), který poskytuje informaci o velikosti analyzovaných elementů. (5, 6)

Signál v úhlu 90° od osy laserového paprsku zachycovaný fotonásobičem (ohyb a odraz světelného paprsku) se nazývá side scatter channel (SSC) a informuje o vnitřní struktuře (granularitě) buněk. (5, 6)

Záznam hodnot FSC a SSC na osy x a y představuje dvojrozměrné grafické zobrazení analyzovaných elementů dle jejich velikosti a vnitřní struktury (tzv. scattergram). (6)

Fluorescence je emise světelné energie (fotonů) o konkrétní vlnové délce způsobená předchozí excitací laserovým zářením specifické vlnové délky odpovídající adsorbčnímu maximu příslušného fluorochromu. Rozdíl mezi vlnovou délkou excitačního a

emitujícího záření se nazývá Stokesův posun. Fluorescence je detegována fotonásobičem separátně pro každý fluorochrom v úhlu 90° od osy laserového paprsku. Analýza fluorescence poskytuje kvalitativní a kvantitativní informaci o membránových nebo intracelulárních receptorech značených fluorochromem v důsledku vazby jeho konjugátu s monoklonální protilátkou na cílový antigen. Fluorescenci lze hodnotit kvalitativně jakou slabou, přiměřenou a silnou. Přesnější hodnocení poskytuje průměrná fluorescenční intenzita (MFI), přesná kvantifikace je možná pomocí arbitrárních jednotek sABC (specific antibody binding capacity) a MESF (molecules of equivalent soluble fluorochrome). (5, 6)

V praxi se využívají fluorochromy samostatné nebo tandemové, u kterých excitace primárního fluorochromu aktivuje k excitaci sekundární fluorochrom přenosem energie nazývaným FRET (fluorescence resonant energy transfer). Zářivější fluorochromy slouží k detekci antigenů se slabší expresí. Mezi samostatné fluorochromy řadíme FITC (fluorescein izothiokyanát), APC (allofykocyanin), Pacific Blue, PerCP (peridinin-chlorofyl-protein), PE (fykoerytrin), Alexa Fluor, mezi tandemové fluorochromy pak APC-Alexa Fluor, PerCP-Cy5.5, APC-Cy5.5, APC-Cy7, PE-Cy5.5, PE-Cy5, PE-Cy7, PE-Texas red. (5, 6)

Využití škály fluorochromů s diferencovaným emisním spektrem umožňuje provádět současnou multiparametrovou analýzu exprese znaků při vazbě řady monoklonálních protilátek na jedinou buňku. Multiparametrová analýza je ovšem na druhé straně spojena s fenoménem spektrálního překryvu emisních spekter mnoha fluorochromů (spektrální přesvit, spectral overlap). Tento problém je řešitelný použitím fluorochromů bez spektrálního překryvu nebo procesem fluorescenční kompenzace založeným na matematické korekci přesvitu prováděné automaticky analytickými softwary moderních cytometrů. (3, 5, 6, 7)

Při tvorbě diagnostických panelů je nutné respektovat relativní intenzitu jednotlivých fluorochromů. PE a tandemové fluorochromy s PE mají nejvyšší relativní intenzitu, následují APC a tandemové fluorochromy s APC. Relativní intezita fluorescence ostatních fluorochromů je o jeden logaritmus nižší. Fluorochromy s vyšší relativní intenzitou fluorescence slouží k detekci slabě exprimovaných antigenů (např. CD56, CD13, CD33, CD117, CD133, CD19). (5)

Součástí speciálních cytometrů může být sortovací modul sloužící k separaci zájmové populace z analyzovaného vzorku. (6)

4.2.1.3 Monoklonální protilátky

Vazba fluorochromu na specifický antigen je zajištěna jeho konjugací s monoklonální protilátkou. Pro diagnostické účely se používají komerční konjugáty monoklonální protilátky s fluorescenčním barvivem získávané většinou hybridomovou technologií z imunizovaných myší. Takto vzniklé protilátky mají přesně definovanou třídu, podtřídu a specificitu zajišťující standardizaci analýzy. (6)

4.2.1.4 Využití průtokové cytometrie u zralých B-lymfoidních neoplázií

Vyšetřovaným materiálem v případě lymfoproliferativních onemocnění je periferní krev, kostní dřeň, punktát, mozkomíšni mok nebo buněčná suspenze získaná dezintegrací celistvé tkáně (lymfatické uzliny, sleziny nebo biopsie). (3)

Mezinárodní konsenzus přijatý v Bethesda v roce 2006 doporučuje využít průtokovou cytometrii z diferenciálně diagnostických důvodů v případě nálezu cytopenie, leukocytózy (zejména lymfocytózy), při přítomnosti atypických buněk či blastů v periferní krvi či kostní dřeni, při plazmocytóze či monoklonální gamapatii, organomegalii a tkáňových masách. Všechny uvedené indikace mohou být spojeny se zralými B-lymfoidními neopláziemi. Po stanovení diagnózy je analýza průtokovou cytometrií indikována v rámci stážování nemoci, k hodnocení některých prognostických ukazatelů, k detekci potenciálních terapeutických cílů, pro stanovení léčebné odpovědi (měření minimální reziduální nemoci), k průkazu progresu či relapsu choroby nebo její akcelerace. (8)

Vyšetření průtokovou cytometrií má u zralých B-lymfoidních neoplázií mimořádně důležitý význam. Jde o velmi rychlou metodu umožňující širší analýzu imunofenotypu nežli imunohistochemie, korelaci řady charakteristik jednotlivých buněk, kvantifikaci patologických populací včetně detekce diskretních nálezů a precizní stanovení úrovně exprese jednotlivých antigenů. (9)

Imunofenotypizace průtokovou cytometrií dostatečně širokým diagnostickým panelem umožňuje u řady B-lymfoproliferací přesnou kategorizaci v rámci WHO klasifikace, a to

zejména ve spojení s cytologickým vyšetřením. Specificita metody dosahuje u některých diagnostických entit až 95 % a u většiny případů zralých B-lymfoidních neoplázií dosahuje vysokou míru korelace s výsledky histologické a imunohistochemické analýzy. Přítomnost aberantních imunofenotypů je výhodná nejen z hlediska diagnostického, ale též při detekci minimální reziduální choroby. (10, 11, 12)

Existuje řada doporučení pro konstrukci diagnostických panelů pro klasifikaci zralých B-lymfoidních neoplázií. Doporučený panel podle Evropské skupiny pro imunologickou klasifikaci leukémií (EGIL) zahrnuje v případě B-lymfoproliferací:

- markery pro gating: CD19;
- základní B-lymfoidní markery - CD20, CD22, CD23, CD103, FMC7, CD5, CD10, lehké řetězce kappa/lambda, CD25, CD38, CD79b;
- dodatečné B-lymfoidní markery – CD2, CD7, CD123, CD138, HLA-DR, CD11c, CD24, CD43, CD81, IgG/A/M/D, CD81, bcl-2, ZAP-70. (5)

Již zmíněný mezinárodní konsenzus z Bethesda (2006) rozděluje diagnostické B-lymfocytární markery z hlediska určení liniové příslušnosti, stanovení monoklonality a další podrobné klasifikace na primární (CD5, CD10, CD19, CD20, CD45, kappa a lambda) a sekundární (CD9, CD11c, CD15, CD22, sCD22, CD23, CD25, CD13, CD33, CD34, CD38, CD43, CD58, sCD79a, CD79b, CD103, FMC7, bcl-2, c-kappa, c-lambda, TdT, ZAP-70, clgM). (13) Přehled důležitých diferenciatně diagnostických markerů podává tab. 1.

Práce Craiga a Foona z roku 2008 definuje prakticky identický rozsah potřebných diferenciatně diagnostických markerů a v rámci klasifikace zralých B-lymfoidních neoplázií definuje čtyři širší základní skupiny s charakteristickým imunofenotypem:

- CD5+/CD10-: chronická lymfocytární leukémie/lymfom z malých lymfocytů, lymfom z plášťových buněk, část B-prolymfocytárních leukémií a malá část lymfomů z marginální zóny, difuzních velkobuněčných B-lymfomů a lymfoplazmocytárních lymfomů;
- CD5-/CD10+: difuzní velkobuněčný lymfom, folikulární lymfom, vzácné případy lymfoplazmocytárního lymfomu, lymfomu z marginální zóny, lymfomu z plášťových buněk a vlasatobuněčné leukémie;

- CD5-/CD10-: difuzní velkobuněčný B-lymfom, lymfom z marginální zóny, vlasatobuněčná leukémie, lymfoplazmocytní lymfom, CD10- folikulární lymfom a CD5- lymfom z pláštových buněk;
- CD5+/CD10+: neobvyklé případy difuzního velkobuněčného lymfomu, folikulárního lymfomu, lymfomu z pláštových buněk, chronické lymfocytní leukémie/lymfomu z malých lymfocytů a Burkittova lymfomu. (14)

Analýza exprese lehkých řetězců imunoglobulinů přispívá klíčovým způsobem k přímému stanovení monoklonality v B-linii průkazem dominance (restrikce) lehkého imunoglobulinového řetězce kappa nebo lambda. Obvykle se udává patologická hodnota poměru lehkých řetězců kappa:lambda vyšší než 4:1 či nižší než 1:2. Interpretační hodnotu poměru kappa:lambda může ovlivňovat diskrétní velikost nádorové populace s převažujícím pozadím fyziologických B-lymfocytů, hraniční hodnoty poměru u některých patologií, nízká exprese či úplná absence lehkých řetězců imunoglobulinů u některých B-lymfomů a též známý fakt, že monoklonální populaci B-lymfocytů lze nalézt u některých nenádorových stavů. (10, 14)

Přesnost diferenciální diagnostiky na základě analýzy průtokovou cytometrií zvyšuje v případě zralých B-lymfoidních neoplázií využití některých „novějších“ markerů. Jako příklad lze uvést význam znaku CD200 pro odlišení CLL/SLL a non-CLL lymfoproliferací. (15, 16, 17, 18) Podobně je znak CD305 vysoce specifický pro vlasatobuněčnou leukémii.

Problematikou imunofenotypizace lymfoidních neoplázií v konceptu vysoké úrovně mezilaboratorní standardizace se podrobně zabývá například konsorcium EuroFlow.

Tab. 1. Přehled nejdůležitějších diferenciálně diagnostických B-markerů (3, 5)

Marker	Struktura	Funkce
CD5	Transmembránový glykoprotein, 67 kDa	CD72 ligand
CD10	Integrální membránový protein, 100 kDa	Neutrální endopeptidáza
CD11c	Transmembránový glykoprotein, 150 kDa	Integrin - α X podjednotka
CD19	Membránový glykoprotein, 95 kDa	Regulace, aktivace a diferenciacie B-lymfocytu
CD20	Membránový protein, izoformy 33-37 kDa	Regulace, aktivace a diferenciacie B-lymfocytu
CD21	Transmembránový glykoprotein, 145 kDa	C3d receptor, EBV receptor, aktivace a proliferace B-lymfocytu
CD22	Transmembránový glykoprotein, izoformy 130 a 140 kDa	Aktivace a diferenciacie B-lymfocytu, ztráta po aktivaci B-lymfocytu před stadiem plasmocytu
CD23	Transmembránový glykoprotein, 45 kDa, asociace s MHC II. Třídy	Nízkoafinitní receptor pro IgE
CD25	Glykoprotein, 55 kDa	Receptor pro IL-2
CD38	Integrální membránový glykoprotein, 45 kDa	Enzym (NAD-glykohydroláza, ADP-ribozylcykláza, cyklická ADP-ribózo-hydroláza)
CD40	Glykozylovaný fosfoprotein, 44-48 kDa	Receptor pro TNF
CD79a/ CD79b	Glykoprotein, 33-45 kDa, asociace se Smlg	Struktura BCR komplexu
CD103	Dvouřetězcový heterodimer, 25 a 150 kDa	Integrin - α E podjednotka
CD123	Glykoprotein, 43 kDa	α -řetězec nízkoafinitního receptoru pro IL-3, buněčný růst a diferenciacie
CD138	Transmembránový heparan-sulfát-proteoglykan (Syndecan-1)	Adhezivní molekula
CD200	OX-2 membránový glykoprotein	Regulace aktivity v myeloidní linii, inhibiční signály pro makrofágy
CD305	Transmembránový glykoprotein, 40 kD (LAIR-1)	Inhibice cytotoxicity, buněčná aktivace, proliferace a diferenciacie
ZAP-70	TCR-zeta asociovaný protein, 70 kDa	Proteinová tyrozinkináza

4.2.2 Imunohistochemická analýza

Imunohistochemie představuje imunofenotypizaci v tkáňových řezech. Detekce specifických antigenních determinant probíhá na stejném základním principu jako u průtokové cytometrie – vizualizace vazby antigenu a protilátky. Přímá metoda vhodná pro vysoce koncentrované antigeny lokalizuje antigen vazbou primární protilátky konjugované s fluoresceinem, enzymem nebo kovem. Nepřímá metoda (dvojstupňová nebo trojstupňová) využívá vazby konjugované sekundární protilátky proti Fc fragmentu protilátky primární, je citlivější a vhodná k průkazu níže exprimovaných markerů. (3, 19)

4.3. Stanovení genetického profilu – cytogenetické a molekulárně cytogenetické metody

4.3.1 Cytogenetická analýza

Cytogenetické vyšetření se nejčastěji provádí ve vzorcích kostní dřeně. Odebraný materiál je kultivován s různými kultivačními médii (nejčastěji RPMI), následuje zástava buněčného cyklu v metafázi, přidání hypotonického roztoku a fixace buněk. Pro stanovení karyotypu se nejčastěji využívá metoda G-pruhování založená na působení trypsinu a barvení barvivem Giemsa-Romanowski, hodnocení probíhá pomocí světelného mikroskopu, standardně se hodnotí 30 mitóz. (3, 7)

4.3.2 Molekulárně cytogenetická analýza

Molekulárně cytogenetické metody umožňují precizní a senzitivní identifikaci patologických genetických změn na různých principech. (3, 7, 20, 21)

4.3.2.1 Fluorescenční in situ hybridizace

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) umožňuje pomocí fluorescenčního mikroskopu vizualizovat sekvence nukleových kyselin v mikroskopických preparátech obsahujících morfologicky zachovalé chromozomy, jádra či tkáňové řezy komplementární vazbou fluorochromem značené hybridizační sondy (krátkého úseku DNA) k cílové sekvenci DNA. Hybridizační sondy se podle místa vazby rozdělují na centromerické, celochromozomové a genově specifické. Metoda se využívá zejména k detekci translokací, delecí a amplifikací. (3, 7, 20, 21)

4.3.2.2 Mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace

Mnohobarevná FISH (mFISH) využívá hybridizaci celochromozomových sond značených kombinací spektrálně odlišných fluorochromů detekovaných s využitím sady úzkopásmových optických filtrů eliminujících spektrální překryv. Výsledkem počítačového zpracování je zobrazení metafáze, kde každý chromozom je odlišen určitou barvou. Metoda slouží zejména k detekci složitých přestaveb (kryptické translokace, inverze) a komplexních změn karyotypu. (3, 7, 20, 21)

4.3.2.3 Spektrální karyotypování

Spektrální karyotypování (SKY) umožňuje stejně jako mFISH současnou vizualizaci všech lidských chromozomů v odlišných barvách s využitím rozdílně značených celochromozomových sond. Zobrazení celého karyotypu vzniká jako výsledek analýzy emisního spektra po současné excitaci všech fluorochromů. Využití je stejné jako u mFISH. (3, 7, 20, 21)

4.3.2.4 Komparativní genomová hybridizace

Komparativní genomová hybridizace (CGH) analyzuje chromozomové změny v celém genomu během jedné hybridizační reakce, při které je testovaná genomová DNA označená modifikovanými nukleotidy použita jako hybridizační sonda s normálními metafázními chromozomy. Simultánně probíhá hybridizace kontrolní DNA z buněk s normálním karyotypem, testovaná a kontrolní DNA jsou označeny spektrálně diferencovanými fluorochromy. Metoda je vhodná k celogenomovému screeningu nebalancovaných přestaveb (ztráta nebo zmnožení genetického materiálu). Zdokonalení metody CGH představuje technika array-CGH, která využívá místo metafázních chromozomů krátké cílové sekvence DNA vázané na speciálně upraveném povrchu (tzv. DNA-čip). (3, 7, 20, 21)

4.3.2.5 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je mimořádně senzitivní metoda umožňující exponenciální amplifikaci genového úseku ohraničeného dvojicí krátkých oligonukleotidových sekvencí (tzv. primerů). Metoda se využívá v celé řadě modifikací, v případě CD5+ B-lymfoproliferací slouží zejména k analýze přestavby genu pro těžký

imunoglobulinový řetězec (IgH) a stanovení mutačního stavu v jeho variabilní části (*IGHV*). (3, 7, 20, 21)

4.3.2.6 Sekvenování nové generace (NGS, z angl. new generation sequencing)

V posledních letech se stále více využívá k detekci klinicky relevantních mutací technika sekvenování nové generace. Díky vysoké citlivosti se NGS využívá zejména u somatických mutací, neboť umožňuje detegovat i subklony, které jsou zastoupeny v množství pod 20 %. Další velkou výhodou je možnost současného sekvenování několika desítek až stovek genů asociovaných s daným onemocněním, příp. rezistencí na léčbu nebo horší prognózou. (22, 23)

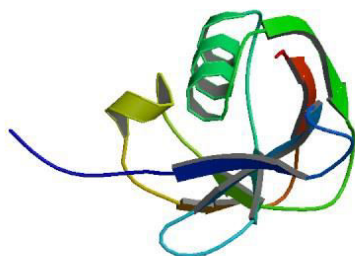
Diferenciálně diagnostický význam jednotlivých genetických změn ve skupině CD5- pozitivních B-lymfoidních neoplázií je podrobně uveden v kapitole 6.

5. Základní charakteristika zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií

5.1 Antigen CD5 a jeho exprese na lymfocytech

Ze strukturálního hlediska je povrchový buněčný antigen CD5 protein s molekulární hmotností 67kD, jeho strukturu zobrazuje obr. 2 (5).

Obr. 2. Struktura antigenu CD5 (B. Rodamilans a kol., 2007) (24).



Za fyziologických okolností je antigen CD5 exprimován na povrchu většiny T-lymfocytů; objevuje se na povrchu T-lymfoidních prekurzorů a přetrvává do pozdních fází T-lymfoidní diferenciaci. U B-lymfocytů je jeho výskyt omezen na povrchovou expresi u minoritního B-lymfocytárního subsetu, tzv. B-1 buněk lymfatických uzlin, sleziny, pleurální a peritoneální dutiny. Tato minoritní B-lymfocytární subpopulace se vyznačuje omezenou diverzitou (polyspecificitou) B-buněčného receptoru (BCR), predominantní sekrecí imunoglobulinu M a potenciální autoreaktivitou. CD5 je ligandem CD72, účastní se v modulaci signálu z BCR a je mediátorem interakce mezi jednotlivými B-lymfocyty a B-lymfocyty a T-lymfocyty. Vzhledem k limitované povrchové expresi antigenu CD5 na B-lymfocytech slouží jeho přítomnost u nádorové populace jako jeden z nejdůležitějších prvků diferenciální diagnostiky zralých B-lymfoidních neoplázií. (3, 25)

5.2 Rozdělení zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií

V rámci WHO klasifikace zralých B-lymfocytárních neoplázií jsou vyčleněny definované diagnostické entity s více či méně charakteristickou expresí znaku CD5.

Tyto diagnostické jednotky lze rozčlenit do tří skupin:

- diagnostické jednotky s expresí antigenu CD5 u většiny případů – chronická lymfocytární leukémie a lymfom z malých lymfocytů, lymfom z plášťových buněk,
- diagnostické jednotky s expresí antigenu CD5 u významné menšinové části případů – B-prolymfocytární leukémie, lymfom z marginální zóny (zejména splenický lymfom z marginální zóny),
- diagnostické jednotky s raritní expresí antigenu CD5 – difúzní velkobuněčný B-lymfom, folikulární lymfom, lymfoplazmocytární lymfom, Burkittův lymfom. (3)

Podrobná charakteristika jednotlivých diagnostických jednotek je uvedena dále v kapitole 6.

6. Laboratorní charakteristika jednotlivých zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií

6.1 Chronická lymfocytární leukémie (CLL) a lymfom z malých lymfocytů (SLL)

6.1.1 Epidemiologie CLL

CLL je nejčastější leukémií dospělých v západních zemích. Její incidence v USA je 5.04 případů na 100 000 osob za rok (26); v ČR udává literatura incidenci nemoci 5.8 – 6.2 případů na 100 000 osob za rok (27). Incidence se zvyšuje s věkem dosahujíc incidence 12.8 – 14.3/100 000 osob za rok ve věku 65 let (1, 26). Eichhorstová uvádí medián věku v době diagnózy 72 let (28). Muži jsou postižení asi 1,5-2 krát častěji než ženy (1, 26). CLL/SLL čítá 6.7 % non-hodgkinských lymfomů v biopsiích (1). CLL je velmi vzácná v zemích Dálného Východu a tato nízká incidence se udržuje v populacích přistěhovalců, což hovoří ve prospěch genetické predispozice (1, 26).

6.1.2 Diagnostická kritéria CLL

Diagnostická kritéria chronické lymfocytární leukémie dle WHO klasifikace nádorů hematopoetické a lymfoidní tkáně a National Cancer Institute-Sponsored Working Group (NCI-WG) jsou shrnuta v tab. 2. (1, 3, 29) Pro diagnózu CLL je postačující vyšetření periferní krve.

Tab. 2. Diagnostická kritéria CLL (1, 29)

B-lymfocyty v periferní krvi nad $5 \times 10^9/l$, průkaz monoklonality B-lymfocytů
Méně než 55 % atypických prolymfocytů v periferní krvi při cytologickém vyšetření
Typický imunofenotyp

6.1.3 Morfologický obraz CLL

6.1.3.1 Lymfatické uzliny a slezina

Postižené lymfatické uzliny u CLL/SLL vykazují setření architektury s pseudofolikulární strukturou pravidelně rozmístěných bledých okrsků odpovídajících proliferačním

centrům obsahujícím větší buňky na tmavém pozadí malých buněk. Postižení může být omezeno na interfolikulární oblasti. Převládající buňkou je malý nádorový lymfocyt. Patologické lymfocyty u CLL jsou monotónní, malé a zralé, jejich velikost nepřesahuje dvojnásobek velikosti erytrocytu. Lymfocyty mají kulatý či mírně oválný tvar, kulaté jádro je lokalizováno většinou lehce excentricky, jaderný chromatin je hutný, kondenzovaný, mívá mozaikovitou strukturu a někdy též malou prohlubeň na straně s větším množstvím cytoplazmy. Nukleoly nejsou ve světelné mikroskopii zřetelné ani při vysokém zvětšení. Světlá či lehce bazofilní cytoplazma tvoří úzký lem kolem jádra a jen vzácně obsahuje vakuoly či inkluze. U typické CLL nepřesahuje zastoupení prolymfocytů nebo atypických lymfocytů 10 %. Mitotická aktivita je obvykle velmi nízká. Proliferační centra obsahují kontinuum malých, středních a velkých buněk, mohou se vyskytnout prolymfocyty a paraimunoblasty. Prolymfocyty jsou většinou středně velké buňky s relativně hutným chromatinem a malými jádřky, paraimunoblasty jsou větší buňky s kulatými až oválnými jádry, rozptýleným chromatinem, centrálními eozinofilními jádřky a mírně bazofilní cytoplazmou. Velikost proliferáčních center a počet paraimunoblastů se liší případ od případu. Ve slezině je obvykle nápadné postižení bílé pulpy, ale červená pulpa je také postižena, proliferáční centra bývají méně zřetelná než v lymfatických uzlinách. Některé případy vykazují plazmocytoidní diferenciaci. (1, 3, 30, 31)

6.1.3.2 Kostní dřeň a periferní krev

V nátěrech kostní dřeně a periferní krve jsou přítomny výše popsané malé nádorové lymfocyty s hutným chromatinem a sporou cytoplazmou. V nátěrech periferní krve jsou typicky vidět jaderné stíny a košíkovité buňky. Gumprechtovy stíny představují artefakt vzniklý mechanickým poškozením fragilních lymfocytů při provádění nátěru a jsou pro CLL typické, i když ne diagnostické. U typické CLL nepřesahuje zastoupení prolymfocytů nebo atypických pleomorfních lymfocytů 10 %, obvykle je zastoupení prolymfocytů v nátěrech periferní krve pod 2 %. Zvýšené počty jsou spojeny s agresivnějším průběhem nemoci. Infiltrace kostní dřeně je u CLL intersticiální, nodulární, smíšená nebo difuzní. Proliferační centra jsou v kostní dřeni méně obvyklá než v lymfatických uzlinách; paratrabekulární agregáty nejsou typické. Definice minimálního postižení kostní dřeně požadovaného pro diagnózu CLL/SL

v nepřítomnosti ostatních definičních rysů není stanovena, ačkoli IWCLL popisuje jako charakteristickou přítomnost >30 % lymfocytů. (1, 3, 30, 31)

6.1.3.3 *Atypická CLL*

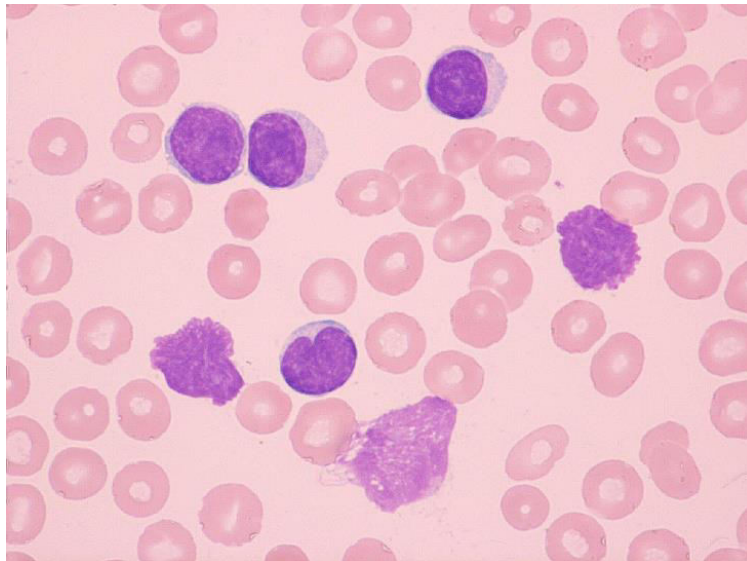
Atypická forma CLL se vyskytuje ve dvou variantách:

- prolymfocytární varianta CLL neboli CLL s prolymfocyty (CLL/PL) má zastoupení prolymfocytů 11-55 %,
- pleomorfní varianta CLL má zastoupení polymorfních lymfocytů vyšší než 15 %.

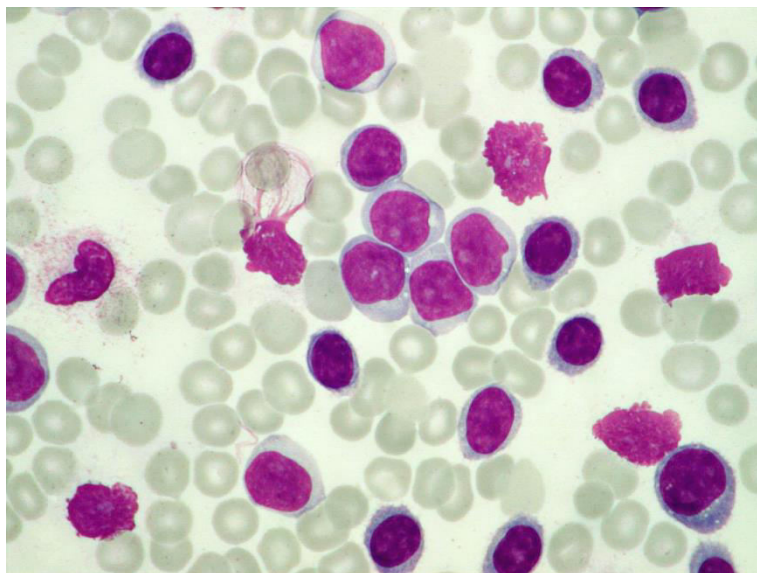
Prolymfocytární varianta CLL je charakteristická přítomností prolymfocytů. Jedná se o středně velké lymfocyty s kulatým jádrem, méně kondenzovaným jaderným chromatinem a výrazným nukleolem, který je většinou centrálně lokalizován. V některých případech má jádro nepravidelný tvar s indentacemi. Cytoplazma je bohatá a mírně bazofilní. (1, 3, 30, 31)

Pleomorfní varianta CLL je charakteristická přítomností pleomorfních (polymorfních) lymfocytů. Tyto lymfocyty vykazují různé atypie jádra a cytoplazmy. Jádro má často nepravidelný tvar, jaderný chromatin je většinou méně zahuštěný, jádérka bývají zřetelnější. Atypie cytoplazmy zahrnují patologické barvení, přítomnost výběžků nebo intracytoplazmatických inkluzí. Atypie jádra a cytoplazmy jsou častější u případů s trisomií 12 a jinými chromozomálními abnormalitami. (1, 3, 30, 31)

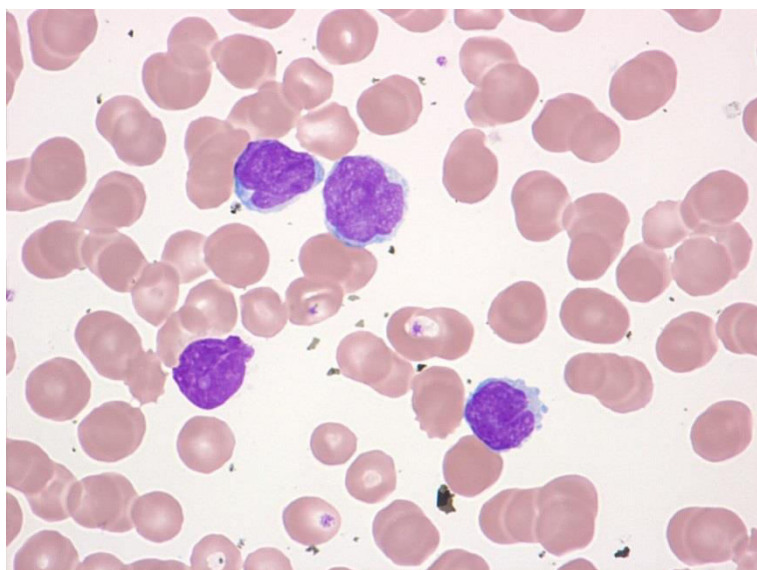
Obr. 3. CLL (zralé lymfocyty, Gumprechtovy stíny), periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



Obr. 4. CLL, prolymfocytární varianta, (zralé lymfocyty, prolymfocyty), periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



Obr. 5. CLL, pleomorfní varianta, (lymfocyty s jadernými atypiami a nukleoly, okrajové výběžky cytoplazmy), periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



6.1.4 Imunofenotyp CLL

U typické CLL jsou pan-B-antigeny (CD19, CD20, CD22, CD79) slabě exprimovány stejně jako dominantní povrchové lehké řetězce κ nebo λ , sIgM a sIgD. Znaky CD22 a CD79b mohou být i zcela negativní. Typická je pozitivita CD5, CD23, CD43 a bcl-2. Variabilní expresi mají markery CD25, CD11c, CD38 a ZAP-70 (vysoká exprese CD38 a ZAP-70 má negativní prognostický význam). Negativní je FMC7, CD10, CD103 a cyklin D1. Velmi vzácná je aberantní exprese T-lymfocytárních znaků CD2 nebo CD8. (1, 14, 30, 32)

Robustním diagnostickým a diferenciatně diagnostickým nástrojem je u CLL stanovení skóre dle systému sestaveného Estellou Matutes již v roce 1994. Skóre bylo upřesněno v roce 1997 využitím znaku CD79b a je shrnuto v tab. 3. Většina případů CLL vykazuje skóre 4 nebo 5, pro ostatní lymfoproliferace je charakteristické skóre 0-2. (33, 34) Případy s hraničním skóre 3 vyžadují další upřesňující analýzy v rámci diferenciatní diagnostiky.

Tab. 3. Skórovací systém pro CLL dle Estelly Matutes (33, 34)

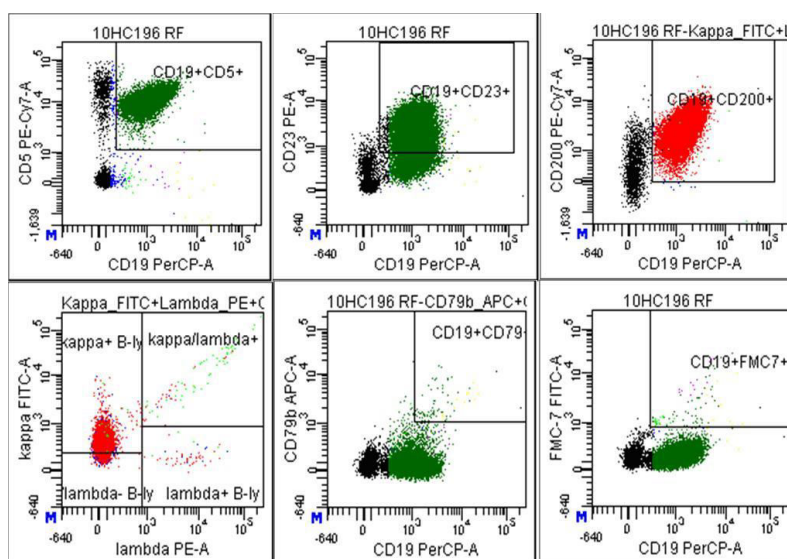
	Body	
	1	0
Parametr		
Exprese CD5	Pozitivita	Negativita
Exprese slg	Nízká	Vysoká
Exprese CD79b	Nízká	Vysoká
Exprese CD23	Pozitivita	Negativita
Exprese FMC7	Negativita	Pozitivita

Jako velmi užitečný se při diagnostice CLL jeví znak CD200, jeho vysoká exprese je v rámci CD5-pozitivních B-lymfoproliferací pro CLL poměrně specifická. (15, 16, 17, 18)

U atypické CLL se setkáváme s vyšší expresí CD19, CD20, CD22 a CD79b a slg včetně lehkých řetězců. Některé případy mohou být také CD5-negativní, CD23-negativní nebo FMC7-pozitivní. Tyto atypie se pak odrážejí v CLL skóre. (1, 14, 33, 34)

Některé imunofenotypové rysy lze využít pro hodnocení prognózy u CLL. Tyrozinkináza ZAP-70 patří mezi antigeny, jejichž exprese je u CLL spojena s nemutovaným stavem variabilního regionu genu pro těžké řetězce imunoglobulinů (*IGHV*). Metody vyšetření ZAP-70 průtokovou cytometrií byly vyvinuty jako náhrada technicky a časově náročného stanovení mutačního stavu CLL, ovšem až u 20 % případů je výsledek analýzy mutačního stavu CLL a exprese ZAP-70 diskordantní. Negativní prognostický význam je podle některých autorů spojen také s expresí znaku CD38. Za příznivější se považuje pozitivita MUM-1. (1, 30, 32)

Obr. 6. CLL, periferní krev, imunofenotyp CD19+CD5+CD23+CD200+kappa+CD79b-FMC7-, průtoková cytometrie (dot plot diagramy, selektovaná populace – lymfocyty, u povrchové exprese kappa, lambda selekce B-lymfocytů), archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.



6.1.5 Genetika CLL

Asi 80 % případů CLL má abnormální karyotyp prokázaný metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Nejčastějšími genetickými změnami u CLL jsou: delece 13. chromozomu (del 13q14), trizomie 12. chromozomu, delece 11. chromozomu (del 11q23), delece 17. chromozomu (del 17p13), delece 6. chromozomu (del 6q21). Delece 13. chromozomu vykazuje u CLL příznivou prognózu, trizomie 12. chromozomu znamená intermediární prognózu a delece 11. chromozomu, delece 17. chromozomu a delece 6. chromozomu jsou spojeny s nepříznivým průběhem onemocnění. Somatické mutace variabilního regionu genu *IGHV* nejsou přítomny u 40-50 % případů (>98 % homologie se zárodečnou linií), 50-60 % případů naopak vykazuje somatickou hypermutaci. Tyto dva podtypy choroby se liší v mnoha dalších biologických a klinických parametrech. Skupina s nemutovaným stavem *IGHV* má horší prognózu. Molekulárně cytogenetickým vyšetřením lze prokázat mutace genu *TP53* a *NOTCH1*. (1, 3, 32, 35) Frekvence výskytu uvedených genetických abnormit je shrnuta v tab. 4.

Tab. 4. Výskyt genetických aberací u CLL (1, 3, 30)

	Mutovaný stav <i>IGHV</i>	Nemutovaný stav <i>IGHV</i>
Aberace		
<i>Delece 13q</i>	65 %	48 %
<i>Izolovaná delece 13q</i>	50 %	26 %
<i>Trizomie 12</i>	15 %	19 %
<i>Delece 11q</i>	4 %	27 %
<i>Delece 17p</i>	3 %	10 %
<i>Delece 11q nebo 17p</i>	7 %	35 %

Přítomnost genetických změn má v diagnostice CLL pouze doplňkový význam, pro diagnózu je zcela postačující splnění kritérií uvedených v části 6.1.2. Stanovení genetického profilu nemoci je klíčové z hlediska hodnocení prognózy a výběru optimální léčebné modality.

6.1.6 Progrese a transformace CLL do lymfomu s vysokým stupněm malignity

V průběhu času se u CLL může objevit zvětšování velikosti buněk a nárůst proliferační aktivity stejně jako splývání proliferačních center v lymfatických uzlinách a kostní dřeni. Často to může souviset s přibýváním prolymfocytů v periferní krvi. Progrese CLL do B-PLL je extrémně vzácná. Při prolymfocytární progresi CLL si její buňky většinou ponechávají základní imunofenotyp CD19+CD5+CD23+, narůstá však intenzita exprese znaků charakteristická pro atypickou CLL, respektive B-PLL (CD20, CD22, CD79b, FMC7 a lehkých a těžkých řetězců). Při flow-cytometrické analýze se vzhledem k velikosti prolymfocytů mění také charakter forward scatter, který informuje o velikosti analyzovaných elementů. (1, 30)

U 2-8 % pacientů s CLL v průběhu choroby se vyvíjí difuzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL) a u <1 % klasický Hodgkinův lymfom (Richterova transformace). U většiny DLBCL byla popsána klonální příbuznost s předchozí CLL, většinou i zde si transformovaná populace ponechává kromě vysokého parametru forward scatter

imunofenotyp CLL. Některé případy vykazují ovšem odchylky fenotypu (zesílení exprese CD20, CD22, CD79b, FMC7 a lehkých řetězců imunoglobulinů, vymizení CD23 nebo CD5). Tyto případy mají nemutované *IGHV*, zatímco klonálně nepříbuzné případy DLBCL se obvykle objevují u případů s mutovanými *IGHV*. Převážná většina případů Hodgkinova lymfomu se objevuje u CLL s mutovanými *IGHV*. Velmi vzácně se popisuje také transformace CLL/SLL do prekurzorové B-akutní lymfoblastové leukémie/lymfoblastového lymfomu. (1, 30)

6.1.7 Lymfom z malých lymfocytů (SLL)

Termín lymfom z malých lymfocytů se používá pro zralé B-lymfoidní neoplázie s tkáňovou morfologií a imunofenotypem charakteristickým pro CLL, u kterých ovšem nejsou splněna arbitrární kritéria této nemoci (viz část 6.1.2). Také genetický profil nemoci je prakticky identický s CLL. Definice SLL podle IWCLL tedy vyžaduje lymfadenopatii, nepřítomnost cytopenií v důsledku infiltrace kostní dřeně CLL/SLL a $<5 \times 10^9/l$ monoklonálních B-lymfocytů v periferní krvi. Postižení kostní dřeně u SLL se popisuje asi u 70 % případů. (1, 30)

6.2 Lymfom z plášťových buněk (lymfom z buněk pláště, mantle cell lymphoma, MCL)

6.2.1 Definice MCL

Lymfom z plášťových buněk (MCL) je neoplázie ze zralých B-lymfocytů tvořená převážně monomorfními malými až středně velkými lymfocyty s nepravidelnými jadernými konturami vycházející z plášťové zóny lymfatických foliklů a vykazující expresi cyklinu D1 (event. vzácně cyklinu D2 nebo D3) spojenou s translokací genu *CCND1* - t(11; 14). (1, 30)

6.2.2 Epidemiologie MCL

MCL zahrnuje přibližně 3-8 % non-hodginských lymfomů. Vyskytuje se ve středním a vyšším věku s mediánem kolem 60 let, převážně bývají postižení muži (poměr 2:1 a více). (1, 30)

6.2.3 Morfologický obraz MCL

Nejčastěji bývají postiženy lymfatické uzliny, dalšími častými místy postižení je kostní dřeň a periferní krev. Často jsou postiženy také ostatní extranodální lokality (gastrointestinální trakt, Waldeyerův kruh). Většina případů gastrointestinální monohočetné lymfomatózní polypózy představuje postižení MCL. (1, 30)

Klasický MCL je monomorfní lymfoidní nádor nejčastěji tvořený z malých až středně velkých B-lymfocytů podobných centrocytům s nepravidelnými jadernými konturami, s rozptýleným jaderným chromatinem a nevýraznými jadérky. Růst nádoru je vágně nodulární, difúzní, „mantle zone“ typu nebo má vzácně folikulární obraz. Vzácně je nádorová léze omezena na vnitřní plášťovou zónu („in situ“ MCL). Cytomorfologický obraz nemoci je ovšem značně variabilní: od malých zralých lymfocytů podobných těm u CLL přes středně velké lymfocyty s jadernými nepravidelnostmi (zářezy jádra, lobulizace) až k bizarním lymfoidním elementům podobným prolymfocytům či blastům s jemnou jadernou strukturou a nukleoly u blastoidní varianty MCL. Poměrně příznačný je výskyt „buttock cells“ u klasického MCL. Infiltrace kostní dřene je přítomna u 2/3 případů, typicky je smíšená nodulární a paratrabeulární, méně často intersticiální nebo difúzní (zejména v případě blastoidní varianty). V ostatních postižených tkáních je patrný naznačeně nodulární nebo difúzní způsob infiltrace. Transformace do lymfomu vyššího stupně malignity se neobjevuje. (1, 30, 36, 37, 38)

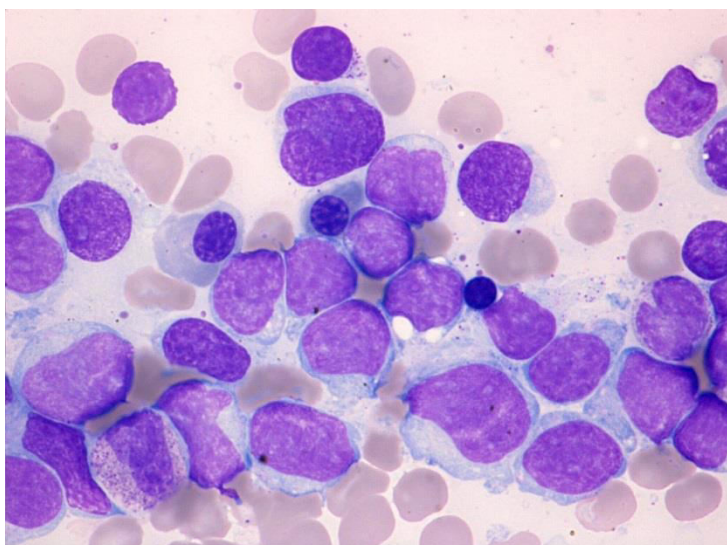
Morfologické varianty MCL definované v rámci WHO klasifikace popisuje tab. 5.

Raritně se vyskytuje také MCL s prolymfocytoidními rysy (1, 38, 39). U pleomorfní a blastoidní varianty MCL se uvádí horší prognóza nemoci (40, 41). U MCL není zcela výjimečný ani kombinovaný morfologický obraz, kdy je obtížné jednoznačné přiřazení k některé z variant (39).

Tab. 5. Morfologické varianty MCL (1)

Morfologická varianta	Morfologické rysy
<i>Malobuněčná (podobná CLL)</i>	Malé kulaté lymfocyty s hutným jaderným chromatinem; přimíšené či dominující, připomínající CLL / SLL
<i>Pleomorfní</i>	Pleomorfní lymfocyty, časté velké lymfocyty s oválným nebo nepravidelným jádrem, časté prominující nukleoly, převážně bledá cytoplazma
<i>Blastoidní</i>	Lymfocyty připomínající lymfoblasty, jemná struktura jádra, časté nukleoly, vysoká mitotická aktivita
<i>Podobná lymfomu z marginální zóny</i>	Lymfocyty s bohatou bledou cytoplazmou připomínající buňky marginální zóny či „monocytoidní“ B-lymfocyty

Obr. 7. MCL (pleomorfní varianta), kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

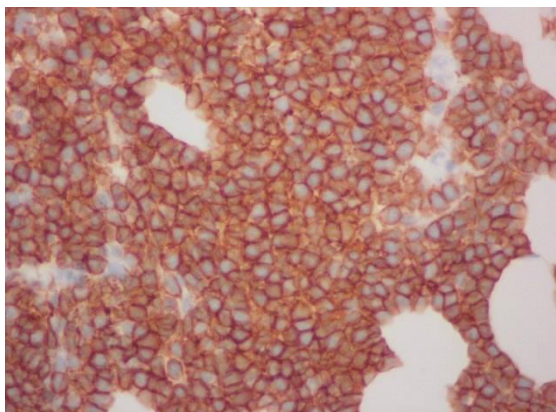


6.2.4 Imunofenotyp MCL

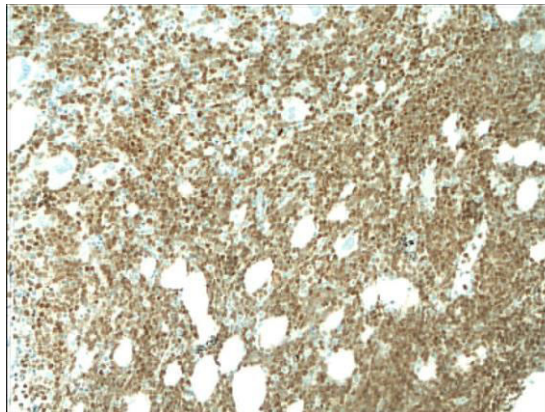
Z hlediska imunofenotypu vykazuje většina případů vysokou expresi pan-B-markerů CD19, CD20, CD22, CD24, CD79a a CD79b, povrchových imunoglobulinů IgM, IgD, jejich lehkých řetězců (převažuje lehký řetězec lambda) a znaku CD5 (obr. 8a). FMC7 je většinou pozitivní, pravidelně je pozitivní CD43, CD38 a bcl-2. Charakteristickým a zásadním diagnostickým rysem je intranukleární exprese cyklinu D1 (obr. 8b). Negativní expresi mají znaky CD10, CD11c, CD23, CD25, CD103, CD200 a bcl-6. Slabou pozitivitu mohou mít z těchto znaků CD23 a CD11c. (1, 30, 36, 37) CD5-negativní případy MCL se vyskytují velmi vzácně (38, 42, 43, 44, 45). Extrémně vzácné jsou případy CD5+CD10+ (38, 45, 46, 47). Proliferační aktivitu odráží exprese znaku Ki-67 (1, 14, 36). Poměrně specifickým markerem MCL je transkripční faktor SOX11, jehož zvýšenou expresi lze prokázat imunohistochemicky nebo molekulárně geneticky (38, 39, 48, 49, 50). Je třeba zdůraznit, že v uvedeném kontextu může být imunofenotyp MCL značně variabilní, aberantní imunofenotypy bývají popsány zejména u pleomorfní nebo blastoidní varianty MCL.

Obr. 8. MCL, membránová pozitivita CD5 (8a) a intracelulární pozitivita cyklinu D1 (8b), imunohistochemie, světelná mikroskopie, zvětšení 400x a 200x, publikováno se souhlasem doc. MUDr. Martina Tichého, CSc., Ústav klinické a molekulární patologie FNOL a LF UP v Olomouci

8a)



8b)

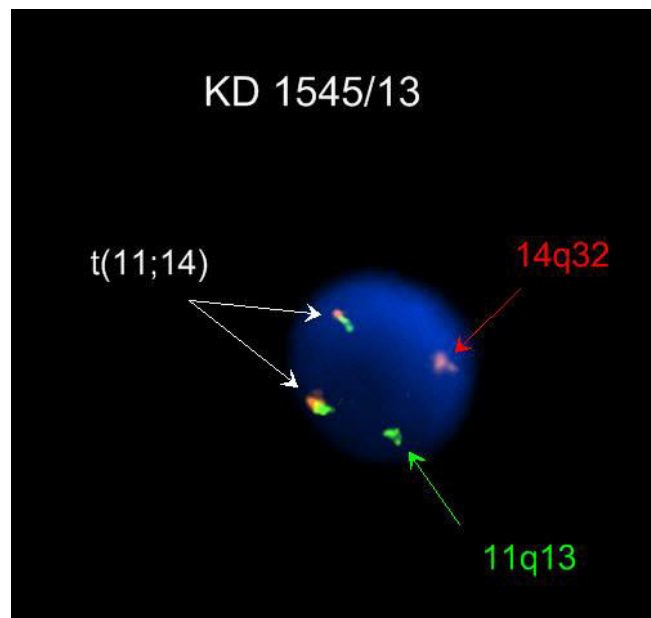


6.2.5 Genetika MCL

K diagnóze MCL významným způsobem přispívá genetická analýza. Je přítomna přestavba genu pro těžký imunoglobulinový řetězec, většinou v nemutované formě (až 80 %). Změny karyotypu jsou obvykle komplexní. Diagnostická je translokace t(11;

14)(q13; q32) mezi geny pro *IgH* a *CCND1* vedoucí k nadměrné expresi cyklinu D1 (obr. 9). Vzácně se vyskytují translokace zahrnující geny pro lehké řetězce imunoglobulinů $t(2; 11)$ a $t(11; 22)$. Časté jsou změny v oblasti 11q22-23 (40-75 %) a del 13q14 (43-51%), ostatní aberace zahrnují změny v oblasti 3q26 (31-50 %), 7p21 (16-34 %), 8q24 (16-34 %, *MYC*), 1p13-p31 (29-52 %), 6q23-q27 (23-38 %), 9p21 (18-31 %), 13q11-q13 (22-55 %), 17p13 (21-45 %) a trisomii 12 (25 %). Případy pleomorfní a blastoidní varianty MCL mají často tetraploidii se zmnožením genu *CCND1* nebo mutací genu *TP53*. Vzácné případy bez translokace $t(11; 14)$ exprimují cyklin D2 nebo D3. (1, 30, 36, 49, 51, 52, 53, 54)

Obr. 9. MCL, $t(11; 14)$, FISH (sonda Kreatech ON BCL1/IGH $t(11;14)$ Fusion), fúzní signály translokovaných chromozomů jsou vyznačeny šipkou, publikováno se souhlasem CGB laboratoře a.s.



6.3 B-prolymfocytární leukémie (B-PLL)

6.3.1 Definice B-PLL

B-prolymfocytární leukémie (B-PLL) je nádor z B-prolymfocytů postihující periferní krev, kostní dřeň a slezinu. Zastoupení prolymfocytů musí převyšovat 55 % lymfoidních buněk v periferní krvi. Musejí být vyloučeny případy transformované chronické lymfocytární leukémie (CLL), CLL se zvýšeným počtem prolymfocytů (CLL/PL) a lymfoidní proliferace s relativně podobnou morfologií, ale nesoucí translokaci $t(11;$

14)(q13; q32) a cyklin D1, které jsou dnes jednoznačně řazeny k lymfomu z plášťových buněk. (1, 30)

6.3.2 Epidemiologie B-PLL

B-PLL je extrémně vzácné onemocnění zahrnující přibližně 1 % všech lymfocytárních leukémií. Většina pacientů je starší 60 let s mediánem věku 65-69 let a podobným rozložením mezi pohlavími. (1)

6.3.3 Morfologický obraz B-PLL

6.3.3.1 Periferní krev a kostní dřeň

V periferní krvi je typicky výrazná lymfocytóza (nezřídka více než $100 \times 10^9/l$), více než 55 % lymfocytů v periferní krvi tvoří prolymfocyty. Jedná se o středně velké lymfocyty o velikosti přibližně dvojnásobku malého lymfocytu, s kulatým jádrem, méně kondenzovaným jaderným chromatinem a výrazným nukleolem, který je většinou centrálně lokalizován. Nukleolus zřetelně vystupuje v důsledku jeho obklopení hutnějším jaderným chromatinem. V některých případech má jádro nepravidelný tvar s indentacemi. Cytoplazma je bohatá a mírně bazofilní, bez granulí. Morfologie prolymfocytů v kostní dřeni je často méně charakteristická než v periferní krvi. Infiltrace kostní dřene je intersticiální, nodulární nebo (ve většině případů) masivní difúzní. Anémie a trombocytopenie se vyskytuje v 50 %. (1, 30)

Obr. 10. B-PLL, dva prolymfocyty, periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



6.4.3.2 Ostatní tkáň mimo kostní dřeň

Morfologie B-PLL ve tkáních není dobře známa, neboť předchozí histologické studie zahrnovaly případy s translokací t(11; 14), které odpovídají leukemickým variantám MCL. Slezina vykazuje rozšířené uzlíky bílé pulpy a infiltraci červené pulpy středně velkými až velkými buňkami s bohatou cytoplazmou a nepravidelnými nebo kulatými jádry s přítomností centrálního eozinofilního jádérka. Lymfatické uzliny vykazují difúzní nebo nejasně nodulární infiltráty podobných buněk. Odlišení od blastoidní varianty MCL, slezinného lymfomu z marginální zóny a CLL se zvýšeným počtem prolymfocytů na základě morfologických rysů může být někdy složité. Diferenciální diagnóza vyžaduje imunofenotypizační a genetická vyšetření, zejména vyloučení přítomnosti translokace t(11; 14) nebo nadměrné exprese cyklinu D1. (1, 30)

6.3.4 Imunofenotyp B-PLL

B-PLL je charakteristická silnou expresí pan-B-markerů CD19, CD20, CD22, CD79, sIgM a/nebo sIgD, jejich lehkých řetězců a FMC7. Dalšími často exprimovanými znaky jsou CD24, CD43 a CD37. CD5 vykazuje pozitivitu až u třetiny případů. Znak CD38 je přítomen asi u poloviny případů stejně jako ZAP-70 (oba se zdají být bez prognostické korelace). CD23 je pozitivní v 10-20 % (v těchto případech jde většinou o transformaci CLL). Negativní jsou znaky CD10, CD11c, CD25 a CD103. (1, 14, 30)

6.3.5 Genetika B-PLL

Je přítomna přestavba genu pro *IGHV*, zastoupení mutovaných a nemutovaných *IGHV* je obdobné jako u CLL. Obvykle jsou mutovány rodiny VH3 a VH4. Časté je postižení genu *TP53* a komplexní změny karyotypu, del 13q14 se vyskytuje ve 27 %. Případy s prokázanou t(11; 14) a častou expresí CD5 se dnes řadí k MCL s prolymfocytoidními rysy. (1, 30)

6.4 Lymfom z marginální zóny (marginal zone lymphoma, MZL)

6.4.1 Základní charakteristika MZL

Tento lymfom vycházející z B-lymfocytů marginální zóny se vyskytuje ve třech formách: nodální, splenické a extranodální MALT. Je podrobně uveden z důvodu relativně časté exprese CD5 u splenické formy. Následující text shrnuje rysy charakteristické pro

všechny formy MZL, podrobně jsou uvedeny údaje týkající se splenického lymfomu z marginální zóny.

6.4.2 Morfologický obraz MZL

Morfologický obraz nemoci je heterogenní od lymfocytů centrocytoidního vzhledu (sporá cytoplazma, nepravidelnosti jádra) přes středně velké „monocytoidní“ lymfocyty (kulaté či ledvinovité jádro a objemnější světle bazofilní cytoplazma) až po ojedinělé centroblastoidní lymfocyty a imunoblasty. Může se vyskytnout plazmocytoidní diferenciace. Nález u splenické formy je popsán níže. Jádro je kulaté či oválné, chromatin většinou kondenzovaný, může být patrný nukleolus. Cytoplazma je šedomodrá, v případě splenického lymfomu s vilózními lymfocyty vybíhá na pólech buňky v jemné vláskovité výběžky. V uzlině vytváří nádor infiltrát kolem reaktivních folikulů nebo má difuzní charakter růstu. Infiltrace kostní dřeně je obvykle smíšená nodulární a intrasinusoidální. (1, 30, 55, 56, 57, 58, 59, 60)

6.4.3 Imunofenotyp MZL

Imunofenotyp MZL není příliš specifický. Lymfom silně exprimuje B-lymfocytární znaky CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD27, CD79, dále FMC7, sIgM a D a často také CD11c (50 %), bcl-2 a CD35. Část literatury udává, že znak CD5 je pozitivní až u 20-25 % případů splenického lymfomu z marginální zóny, jinak je jeho exprese velmi vzácná. Některé práce zdůrazňují pozitivitu exprese znaku CD95. Negativní je CD10, CD23, CD25, CD38, CD43, CD103 a cyklin D1. (1, 14, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61)

6.4.4 Genetika MZL

Je přítomna přestavba genu pro IgH, převažuje mutovaná forma *IgHV*. Častá je del 7q, trizomie 3 a 12 a +5q. Vyskytují se translokace t(11; 18)(q21; q21), t(1; 14)(p22; q32), t(14; 18)(q32; q21), t(3; 14)(p14; q32). (1, 30, 59, 60, 62)

6.4.5 Splenický (slezinný) lymfom z marginální zóny (splenic marginal zone lymphoma, SMZL)

6.4.5.1 Definice splenického MZL

SMZL je B-buněčný nádor složený z malých lymfocytů, které obklopují a nahrazují germinální centra slezinné bílé pulpy, smazávají plášť folikulu a spojují se s periferní (marginální) zónou větších buněk zahrnujících rozptýlené transformované blasty; jak malé, tak větší buňky infiltrují červenou pulpu. Často jsou postiženy slezinné hilové lymfatické uzliny a kostní dřeň; lymfomové buňky lze nalézt v periferní krvi jako vilózní lymfocyty. (1, 30)

6.4.5.2 Epidemiologie SMZL

SMZL je vzácná porucha zahrnující méně než 2 % lymfoidních nádorů, avšak může odpovídat za většinu případů jinak neklasifikovatelných chronických lymfoidních leukémií, které jsou CD5 negativní. Většina pacientů je starší 50 let a je zde vyrovnaná incidence podle pohlaví. (1, 30)

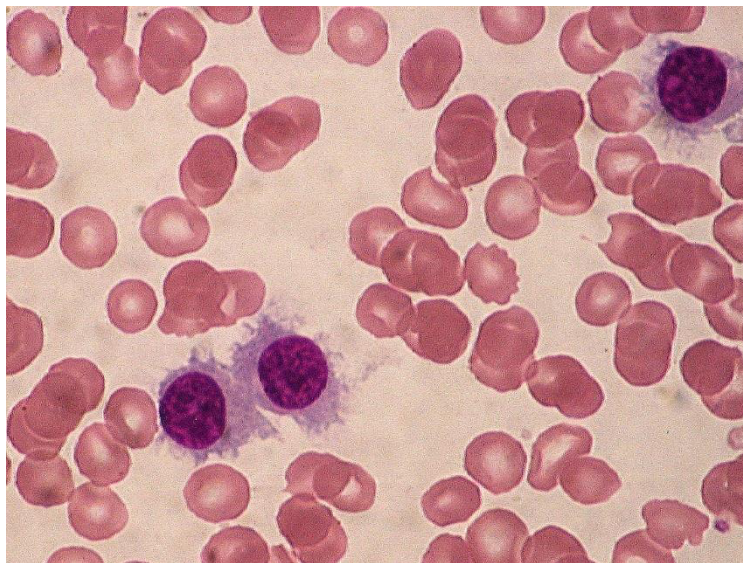
6.4.5.3 Morfologický obraz SMZL

Nádor postihuje slezinu a slezinné hilové uzliny, kostní dřeň a často periferní krev. Mohou být postižena játra. Periferní lymfatické uzliny typicky nejsou postiženy. (1, 30)

Ve slezině centrální zóna malých kulatých lymfocytů obklopuje či obvykleji nahrazuje reaktivní zárodečná centra ve slezinné bílé pulpě se smazáním normálního pláště folikulu. Tato zóna se spojuje s periferní zónou malých až středně velkých buněk s rozptýlenějším chromatinem a bohatou bledou cytoplazmou, které se podobají buňkám marginální zóny, a roztroušených transformovaných blastů. Červená pulpa je vždy infiltrována jak malými uzlíky větších buněk, tak plochami malých lymfocytů, které často pronikají do sinusů. V lymfoidních agregátech mohou být přítomny epiteloidní histiocyty. Některé případy mohou mít zřetelně převažující populaci větších buněk podobných marginální zóně. Může se objevit plazmocytární diferenciace a ve vzácných případech mohou být v centrech uzlíků bílé pulpy přítomny shluky plazmatických buněk. Ve slezinných hilových lymfatických uzlinách jsou rozšířeny sinusy a lymfom obklopuje a nahrazuje zárodečná centra, avšak zmíněné dva typy buněk (malé

lymfocyty a buňky marginální zóny) jsou často intimněji přimíseny bez tvorby zřetelné „marginální“ zóny. V kostní dřeni je nodulárně intersticiální infiltrát cytologicky podobný tomu v lymfatických uzlinách. Nádorové buňky občas obklopují reaktivní folikly. Pomocným rysem jsou intrasinusoidální lymfomové buňky, lépe odhalitelné imunohistochemickým vyšetřením zaměřeným na CD20. Jsou-li lymfomové buňky přítomny v periferní krvi, bývá mírná lymfocytóza. Neoplastické lymfocyty jsou v těchto případech středně velké s vyšším nukleocytoplazmatickým poměrem a kulatým či oválným jádrem. Chromatin je kondenzovaný, někdy může být zřetelný nukleolus. Cytoplazma bývá světle šedomodrá, méně objemná, často s přítomností krátkých polárních výběžků (splenický lymfom s vilózními lymfocyty). Některé elementy mohou vypadat plazmocytoidně. (1, 30, 57, 58, 59, 60)

Obr. 11. SMZL, vilózní lymfocyty, kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



6.4.5.4 Imunofenotyp SMZL

Nádorové buňky exprimují povrchový IgM a obvykle, ale ne vždy, IgD, jsou typicky CD20+, CD79a+, CD22+, CD24+, FMC7+, CD5-, CD10-, CD23-, CD43- a annexin A1-. Některé pečlivě provedené práce uvádějí pozitivitu CD5 až u 20-25 % případů. Znak CD11c je spíše pozitivní, naopak CD38 a CD25 jsou převážně negativní. CD103 je obvykle negativní, cyklin D1 není přítomen. Znaky CD11c a CD5 bývají častěji pozitivní u splenického lymfomu s vilózními lymfocyty. Barvení na Ki67 vykazuje typický terčovitý

vzhled založený na přítomnosti zvýšené růstové frakce jak v germinálním centru (je-li přítomno), tak v marginální zóně. (1, 30, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62)

6.4.5.5 Genetika SMZL

Geny pro těžký a lehký řetězec imunoglobulinu jsou přestavěny a přibližně polovina případů má somatickou hypermutaci. Až u 40 % případů SMZL byla popsána alelická ztráta chromozomu 7q31-32. U několika případů SLVL byla popsána dysregulace genu CDK6 umístěného na 7q21 s translokací postihující tuto oblast. Byly popsány také trisomie 3q, 12 a 18, delecce *TP53* a řada dalších cytogenetických abnormalit. Translokace t(11; 18) obvyklá u extranodálních lymfomů z marginální zóny MALT typu (lymfoidní tkáň spojená se sliznicí) nepatří mezi rysy SMZL. Ve srovnání s ostatními B-buněčnými lymfomy, zejména lymfomy z malých B-buněk, má SMZL specifický transkripční profil. Tento specifický molekulární podpis zahrnuje geny zapojené do signální kaskády dráhy AKT1 a signální dráhy B-buněčného receptoru. (1, 30, 62)

6.5 Zralé B-lymfoidní neoplázie s raritní expresí CD5

Vzhledem k okrajovému významu této problematiky v kontextu zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií zde podáváme pouze základní morfologickou a imunofenotypovou charakteristiku jednotlivých jednotek s důrazem na frekvenci výskytu CD5-pozitivních případů.

6.5.1 Difúzní velkobuněčný B-lymfom (*diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL*)

6.5.1.1 Definice DLBCL

DLBCL je zralá B-lymfoidní neoplázie charakteristická primárně nodální či extranodální difúzní proliferací velkých neoplastických buněk. (1, 30)

6.5.1.2 Morfologický obraz DLBCL

Primární postižení lymfomem je většinou nodální, méně často extranodální. Primární postižení kostní dřeně není časté, vyplavování neoplastických elementů do periferní krve je velmi vzácné. (1, 30)

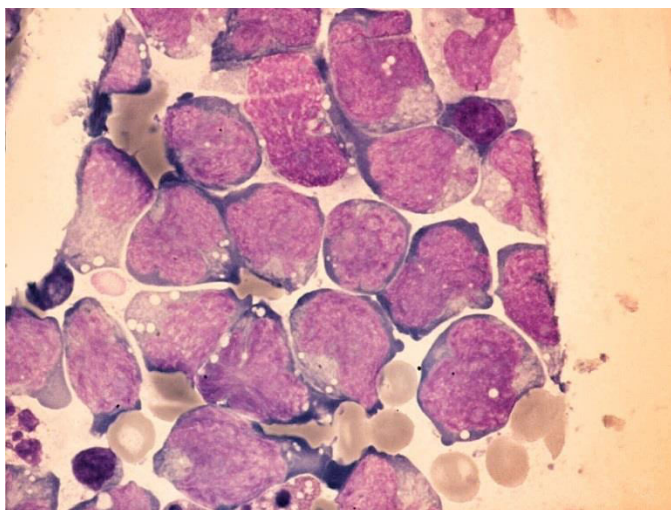
Nádor se vyskytuje v několika obvyklých morfologických variantách (dle WHO klasifikace z roku 2008 varianta centroblastická, imunoblastická a anaplastická). Existují též vzácné morfologické varianty. (1)

Nejčastější je centroblastická varianta, u které jsou neoplastické B-lymfocyty středně velké až velké, s oválným či kulatým jádrem, jemným jaderným chromatinem a 2-4 jádérky lokalizovanými většinou na periferii jádra. Cytoplazma je málo objemná a většinou mírně bazofilní. Imunoblastická varianta je charakteristická velkými nádorovými B-lymfocyty, prominující nukleolus je centrálně uložen, cytoplazma je objemná a bazofilní. Mohou se vyskytnout plazmocytoidní rysy. U varianty bohaté na T-buňky/histiocyty tvoří většinu lymfomu nenádorové T-lymfocyty, případně histiocyty. Velké neoplastické B-lymfocyty jsou zastoupeny minoritně (většinou méně než 10 %), mohou mít vzhled centroblastů, LH buněk, imunoblastů či RS buněk. Anaplastická varianta se vyznačuje obrovskými B-lymfocyty s bizarními pleomorfními jádry, které mohou připomínat RS buňky. (1, 30)

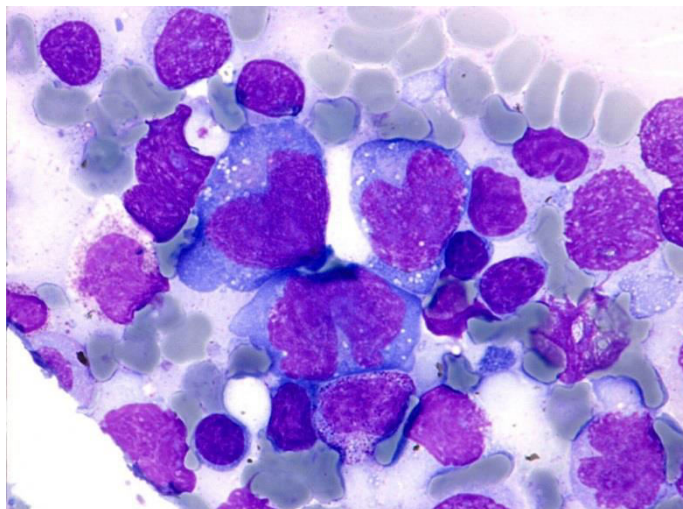
Dřívější plazmablastická varianta DLBCL je nyní v rámci WHO klasifikace vyčleněna jako samostatná diagnostická entita – plazmablastický lymfom. (1)

V případě vyplavování neoplastických elementů do periferní krve nalézáme obvykle velmi polymorfní B-lymfocyty (velikost buňky, jádra, nukleocytoplazmatický poměr, tvar jádra, počet nukleolů, objem a bazofilie cytoplazmy). (1, 30)

Obr. 12. DLBCL, centroblastická varianta, cytospin ascitické tekutiny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



Obr. 13. DLBCL, imunoblastická varianta, imprint slezinné tkáně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



6.5.1.2 *Imunofenotyp DLBCL*

Lymfom obvykle exprimuje B-lymfocytární markery CD19, CD20, CD22, CD79a, CD79b, FMC7. Pravidelně negativní bývá CD21. Povrchové či intracytoplazmatické imunoglobuliny lze prokázat u 50-75 % případů. Panleukocytární antigen CD45 bývá exprimován variabilně. CD10 je pozitivní u 25-50 % případů. Anaplastická varianta je CD30+. Vzácně jsou koexprimovány znaky CD38 a CD138. Intracelulárně se prokazuje přítomnost bcl-2, bcl-6 a silná exprese antigenu Ki-67. Pozitivní bývá MUM-1. Znak CD5 je pozitivní asi u 10 % případů. Tyto CD5-pozitivní DLBCL vznikají většinou de novo, pouze malá část představuje transformaci CLL nebo MCL a má cyklin D1. Exprese znaku CD5 je u DLBCL považována za negativní prognostický marker. (1, 30, 63, 64, 65, 66, 67, 68)

6.5.2 *Folikulární lymfom (follicular lymphoma, FL)*

6.5.2.1 *Definice FL*

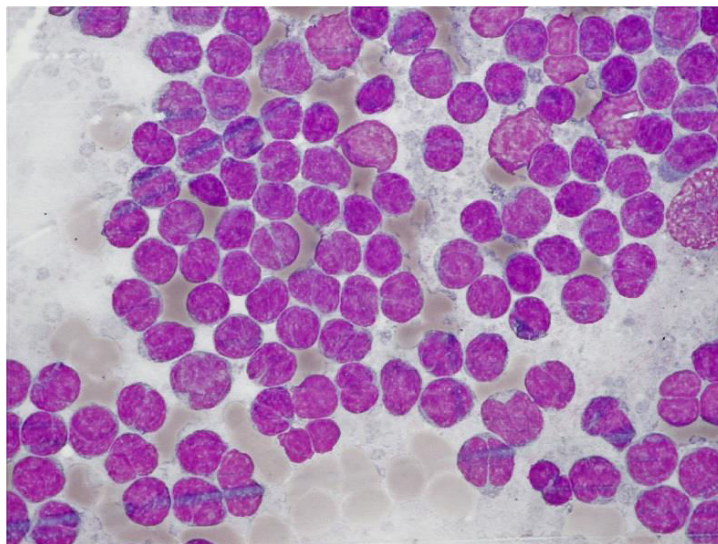
FL je lymfom vycházející z B-buněk zárodečného centra lymfatických folikulů – centrocytů a centroblastů, který má alespoň částečně folikulární strukturu. Pro nádor je charakteristická translokace t(14; 18)(q32; q21) a přestavba *BCL2* genu. (1, 30)

6.5.2.2 Morfologický obraz FL

Léze FL je ve většině případů primárně nodální. Postižení kostní dřeně a periferní krve je poměrně časté. Grading lymfomu se stanovuje na základě kvantity centroblastů v lymfatické uzlině (grade 1 až 3B). U leukemických forem je lymfocytóza většinou mírná. Typické neoplastické elementy jsou centrocyty – malé lymfocyty (většinou menší než lymfocyty u CLL/SLL, někdy dokonce menší než erytrocyty). Centrocyty mají velmi vysoký nukleocytoplazmatický poměr. Jádro je kulaté, někdy hranaté, často rozštěpené (někdy tak hluboce, že má tvar kávového zrna). Chromatin je homogenně kondenzovaný, bez zřetelných nukleolů. Cytoplazma tvoří jen úzký lem kolem jádra, nebo není vůbec patrná. Mohou být přítomny i centroblasty, nicméně i u forem s vyšším gradingem v lymfatické uzlině převládají v periferní krvi právě centrocyty. (1, 30)

Kostní dřeň bývá postižená asi u 45 % případů. Typické je paratrabekulární uspořádání nádorového infiltrátu. Častý je diskordantní obraz, což znamená, že i v případech s vyšším gradingem v lymfatické uzlině převažují v kostní dřeni centrocyty. (1, 30)

Obr. 14. Folikulární lymfom, centrocyty s jadernými zářezy, imprint lymfatické uzliny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



6.5.2.3 Imunofenotyp FL

Buňky FL exprimují B-lymfocytární znaky CD19 (spíše slabě), CD20, CD21, CD22, CD24, FMC7, CD79a, CD79b, slg. Charakteristická je exprese CD10 a CD38. Znak CD10 je často

exprimován pouze u části populace FL, a to ještě slabě. Intracelulárně je exprimován bcl-6. Negativní jsou markery CD11c, CD43, CD103, CD23 a CD25. Znak CD5 je exprimován velmi vzácně, existují údaje o jeho negativním prognostickém významu. (1, 30, 69, 70, 71, 72)

6.5.3 Lymfoplazmocytní lymfom/Waldenströmova makroglobulinemie (*lymphoplasmacytic lymphoma, LPL*)

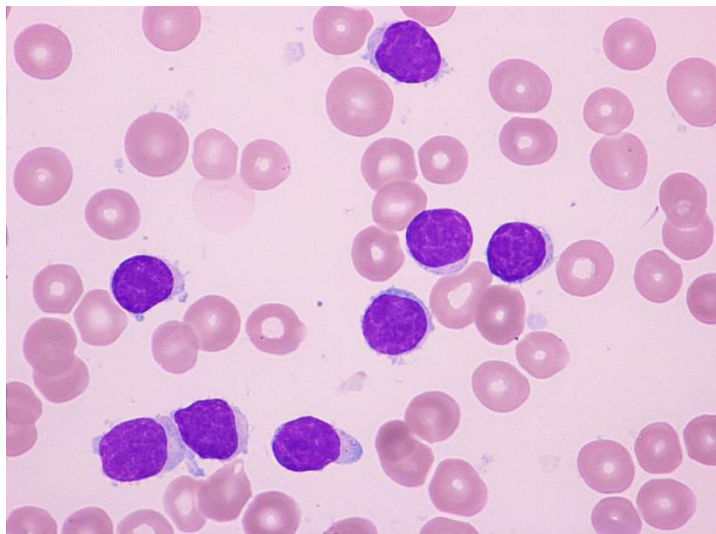
6.5.3.1 Definice LPL

LPL je neoplázie z malých B-lymfocytů, plazmocytoïdních lymfocytů a plazmocytní postihující kostní dřeň, lymfatické uzliny, slezinu a případně periferní krev. Typická je přítomnost monoklonálního imunoglobulinu s hyperviskozitou či kryoglobulinémií. Waldenströmova makroglobulinemie (WM) je definována jako LPL s infiltrací kostní dřeně patologickými buňkami a IgM monoklonální gamapatií jakékoliv koncentrace. (1, 30)

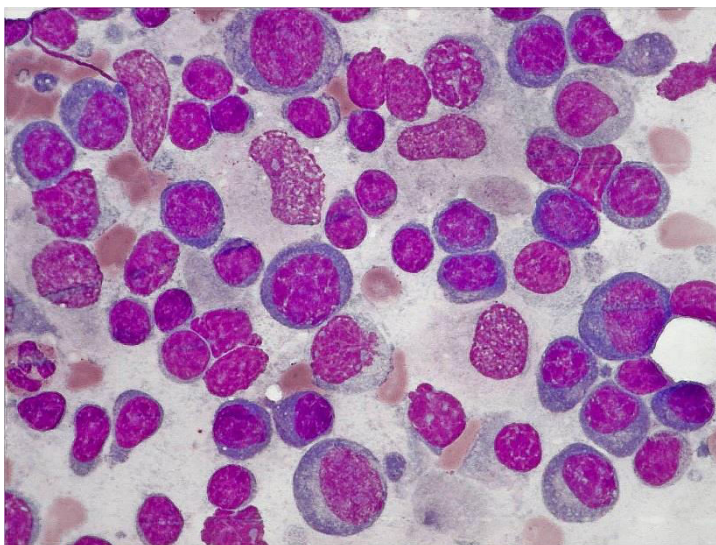
6.5.3.2 Morfologický obraz LPL

V periferní krvi může být lymfocytóza s přítomností malých lymfocytů a plazmocytoïdních lymfocytů. Plazmocytoïdní lymfocyty již mají některé rysy plazmocytní (excentricita jádra, hrubší struktura jaderného chromatinu, objemnější a bazofilní cytoplazma s naznačeným projasněním Golgiho zóny, intracytoplazmatické nebo intranukleární inkluze. Stejně elementy nalézáme v kostní dřeni, ve které bývají zmnoženy též plazmocyty a mastocyty. Nádorová infiltrace v trepanobiopsii bývá smíšená nodulární, paratrabekulární nebo intersticiální. (1, 30)

Obr. 15. Waldenströмова makroglubulinemie, lymfoplazmocytoïdní lymfocyty, kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



Obr. 16. LPL, lymfoplazmocytoïdní lymfocyty a plazmocyty, imprint lymfatické uzliny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



6.5.3.3 Imunofenotyp LPL

Elementy LPL exprimují B-lymfocytární markery CD19, CD20, CD22, CD79a a FMC7, CD38, povrchové lehké řetězce kappa či lambda a těžké řetězce, nejčastěji typu IgM. Dále mohou exprimovat markery CD43, CD27, CD79b, slabě CD11c a CD25. Znaky CD23, CD5 a CD10 jsou většinou popisovány jako negativní, nicméně literatura popisuje i formy CD23+CD5+ se slabší expresí těchto znaků a též případy CD10+.

Pozitivita znaku CD5 je v některých pracích popisována až v 9 %. (1, 30, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83)

6.5.4 Burkittův lymfom (*Burkitt lymphoma*)

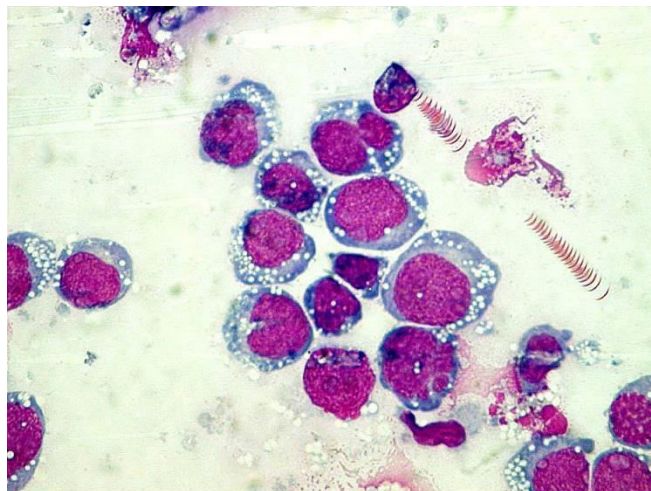
6.5.4.1 Definice BL

BL je neoplázie ze zralých B-lymfocytů tvořená středně velkými lymfocyty se silně bazofilní cytoplazmou, vysokým mitotickým indexem a translokací postihující *MYC* gen. Vyskytuje se ve třech formách. Endemická forma postihující nejčastěji děti v rovníkové Africe je typicky spojená s antigenní stimulací virem Epstein-Baarové. Sporadická varianta se vyskytuje celosvětově a postihuje většinou děti a mladé dospělé. Burkittův lymfom asociovaný s imunodeficiencí je svázán s infekcí virem HIV a často představuje jednu z prvních manifestací AIDS. Vzácný je výskyt nemoci v podobě leukémie. (1, 30)

6.5.4.2 Morfologický obraz BL

Lymfomové buňky v periferní krvi nebo kostní dřeni jsou relativně uniformní, středně velké B-lymfocyty. Jádro je většinou kulaté či oválné, s jemně granulární strukturou chromatinu a se zřetelnými nukleoly. Cytoplazma je silně bazofilní, často vakuolizovaná. Mitotická aktivita je vysoká. Infiltrace kostní dřene bývá intersticiální, nodulární nebo difúzní. V lymfatické uzlině je typický obraz „hvězdného nebe“ s disperzními makrofágy. Dvě morfologické varianty představují BL s plazmocytoidní diferenciací (pleomorfní nádorová populace s částečným plazmocytoidním vzhledem) a atypický BL (výrazná pleomorfie nádorových buněk a méně četné nápadnější nukleoly), Atypický BL se v některých případech problematicky odlišuje od DLBCL. (1, 30)

Obr. 17. Sporadický Burkittův lymfom, cytospin pleurálního punktátu, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



6.5.4.3 *Imunofenotyp BL*

Nádor exprimuje B-lymfocytární antigeny CD19, CD20, CD22, CD79a a CD79b, vykazuje klonální restrikci povrchových lehkých řetězců a nese povrchový IgM. Pozitivní bývají dále znaky CD10 a CD77, panleukocytární antigen CD45 je obvykle silně exprimován. Variabilní expresi mají některé adhezní molekuly (CD11a, CD54) a aktivační znaky (CD39, CD70), negativní je CD23. U endemické formy se vyskytuje marker CD21. Ki-67 je exprimován téměř ve 100 %. Znak CD5 je typicky negativní, ovšem velmi vzácně se vyskytují též formy CD5-pozitivní. (1, 30, 84, 85, 86)

7. Cytomorfologie a imunofenotyp souboru zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií

7.1 Základní charakteristika souboru

Soubor tvořilo celkem 197 pacientů (123 muži, 74 žen) se zralými CD5-pozitivními lymfoidními neopláziemi, u nichž byly analyzovány celkem 233 vzorky z období od července 2013 do dubna 2016. Konečná diagnóza jednotlivých případů byla stanovena v souladu s WHO klasifikací nádorů hematopoetické a lymfoidní tkáně (verze z roku 2008); soubor zahrnoval případy chronické lymfocytární leukémie a lymfomu z malých lymfocytů, lymfomu z pláštěvých buněk, lymfomu z marginální zóny, difuzního velkobuněčného B-lymfomu a dále skupinu blíže neklasifikovatelných CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií.

Konečná diagnóza byla považována za jistou a byla stanovena:

- v případech chronické lymfocytární leukémie na základě výsledku vyšetření hemogramu s diferenciálním rozpočtem leukocytů a výsledku vyšetření průtokovou cytometrií, v některých případech navíc histologickým a imunohistochemickým vyšetřením vzorků kostní dřeně nebo lymfatické uzliny,
- v případech lymfomu z malých lymfocytů na základě výsledku histologického a imunohistochemického vyšetření vzorku lymfatické uzliny,
- v případech lymfomu z pláštěvých buněk na základě výsledku histologického a imunohistochemického vyšetření vzorků kostní dřeně nebo lymfatické uzliny spolu s cytogenetickou a molekulárně cytogenetickou analýzou,
- v případech lymfomu z marginální zóny na základě výsledku histologického a imunohistochemického vyšetření vzorků kostní dřeně, lymfatické uzliny či sleziny odebrané splenektomií, nebo na základě výsledku cytomorfologického vyšetření a výsledku analýzy průtokovou cytometrií v případě splenického lymfomu s vilózními lymfocyty (u těchto případů byla diferenciálně diagnosticky vyloučena vlasatobuněčná leukémie a variantní forma vlasatobuněčné leukémie),

- v případech difuzního velkobuněčného B-lymfomu na základě výsledku histologického a imunohistochemického vyšetření vzorků lymfatické uzliny nebo kostní dřeně.

Skupina zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií blíže neklasifikovaných zahrnovala případy:

- diagnosticky nevyhraněné i přes využití všech dostupných laboratorních diagnostických metod,
- diagnosticky nedokončené z důvodů odmítnutí další diagnostiky ze strany pacienta, nebo z důvodu úmrtí pacienta, nebo z důvodu, kdy rozšiřování diagnostiky bylo považováno za neúčelné.

Početní zastoupení jednotlivých diagnostických kategorií a distribuci podle pohlaví shrnuje tab. 6.

Věk nemocných se pohyboval v rozmezí 35-89 let s mediánem 69 let. Věkovou strukturu u jednotlivých diagnostických kategorií popisuje tab. 7.

Tab. 6. Diagnostické kategorie a pohlavní distribuce

Diagnostická kategorie zralých CD5+ B-lymfoidních neoplázií	Počet pacientů	<i>Muži</i>	<i>Ženy</i>
<i>CLL</i>	157	100	57
<i>SLL</i>	3	2	1
<i>MCL</i>	20	13	7
<i>CD5+ MZL</i>	7	4	3
<i>CD5+ DLBCL</i>	4	2	2
<i>Neklasifikovatelné</i>	6	2	4

Tab. 7. Věková struktura pacientů v souboru

Diagnostická kategorie zralých CD5+ B-lymfoidních neoplázií	Věkové minimum v letech	Věkové maximum v letech	Věkový průměr v letech	Věkový medián v letech
<i>CLL</i>	35	89	69	70
<i>SLL</i>	59	83	69	65
<i>MCL</i>	49	88	69	68
<i>CD5+ MZL</i>	54	85	68	67
<i>CD5+ DLBCL</i>	57	74	66	67
<i>Neklasifikovatelné</i>	50	72	66	69

Celkem bylo analyzováno 161 vzorků periferní krve (PK), 56 vzorků kostní dřeně (KD), 12 vzorků lymfatických uzlin (LU), 2 vzorky pleurálního punktátu (PP) a 2 vzorky cerebrospinálního likvoru (CL). Většina vzorků pocházela z období při diagnóze, menší část vzorků byla odebrána při relapsu nebo progresi onemocnění. U všech vzorků bylo provedeno cytomorfoloické hodnocení a stanovení imunofenotypu průtokovou cytometrií. Zastoupení typu vzorku u jednotlivých diagnostických kategorií shrnuje tab. 8.

Tab. 8. Typy vzorků u jednotlivých diagnostických kategorií

Vzorek		PK	KD	LU	PP	CL
Diagnostická kategorie	Počet vzorků	161	56	12	2	2
<i>CLL</i>	167	134	29	2	2	0
<i>SLL</i>	6	1	2	3	0	0
<i>MCL</i>	38	15	18	4	0	1
<i>CD5+ MZL</i>	11	5	4	1	0	1
<i>CD5+ DLBCL</i>	4	1	2	2	0	0
<i>Neklasifikovatelné</i>	7	6	1	0	0	0

7.2 Metody stanovení cytomorfologické charakteristiky a imunofenotypového profilu

7.2.1 Metodika cytomorfologického hodnocení

7.2.1.1 Odběr primárního vzorku a transport do laboratoře

V případě vzorků periferní krve se prováděl odběr žilní krve do plastové zkumavky s protisrážlivým roztokem EDTA (zkumavky výrobce Sarstedt, uzavřený systém odběru). V některých případech se prováděly nátěry z kapilární krve odebrané z prstu pacienta, a to u pacientů, kteří neměli žilní odběr v den analýzy.

Vzorky kostní dřeně se odebíraly v lokální anestézii za sterilních podmínek aspirací z lopaty kostní kyčelní, pro cytologickou analýzu sloužila první frakce aspirátu v objemu cca 1-2 ml.

Vzorky lymfatických uzlin se získávaly exstirpací nebo excizí prováděnou na operačním sále; odebraná uzlina či její část byla ihned po odběru uložena do nízké skleněné nádoby na gázu zvlhčenou roztokem Cell Wash výrobce Becton Dickinson.

Pleurální punktát byl výsledkem pleurální punkce; vzorek k cytologické analýze byl odebírán jako první frakce punktátu do stříkačky a ihned přemístěn do sterilní zkumavky.

Cerebrospinální likvor se odebíral za obvyklých podmínek lumbální punkcí do sterilních plastových zkumavek, k cytologické analýze sloužila první frakce likvoru o objemu cca 3 ml.

Transport do laboratoře probíhal v transportním boxu za pokojové teploty, doba od odběru do zahájení zpracování vzorku nepřesáhla 1 hodinu. Transport a zpracování vzorků cerebrospinálního likvoru se realizovaly okamžitě po odběru.

7.2.1.2 Zpracování primárního vzorku před fixací a barvením

V případě vzorků periferní krve (žilní či kapilární) se zhotovovaly 2 nátěry na podložní sklíčko následujícím způsobem:

- na čisté podložní sklíčko se vytvořila Pasteurovou pipetou malá kapka žilní krve či kapilární krve kápnuté přímo z prstu pacienta,

- druhé podložní sklíčko se zkosenými hranami se přiložilo před kapku a pod úhlem cca 45° se provedl nátěr krve,
- nátěry byly ponechány k zaschnutí na vzduchu a chráněny před znečištěním.

Zhotovený nátěr musel být rovnoměrný, stejnorodý a přiměřeně tenký, dlouhé okraje musely být rovné a na konci přecházet do ztracena alespoň 1 cm před koncem sklíčka.

Ze vzorků kostní dřeně se připravily nátěry obdobným způsobem (primární vzorek byl před nátěrem ze stříkačky umístěn na Petriho misku).

Vzorky pleurálního punktátu a cerebrospinálního likvoru byly před barvením zpracovány cytocentrifugací, která zajistila koncentraci buněčných elementů zejména u nízké celulárních vzorků. Zpracování vzorků cerebrospinálního likvoru se realizovalo okamžitě po odběru. Cytocentrifugace se prováděla s využitím cytocentrifugy výrobce Shandon. Hemoragický či hustý punktát byl ředěn fyziologickým roztokem v poměru 1:1. Po vložení podložního skla a filtračního papíru do klipsy cytocentrifugační komůrky se do komůrky pipetoval vzorek v objemu 250 µl. Cytocentrifugace probíhala po dobu 6 minut při 1000 otáček za minutu.

Lymfatická uzlina či její část byla zpracovávána ihned po doručení do laboratoře. Vzorek byl jednorázovým skalpelem rozdělen na 2 části; z řezné strany byl proveden opakovaný otisk na podložní sklíčka. Otiskové preparáty se nechaly důkladně zaschnout.

7.2.1.3 Fixace a barvení nátěrů, cytocentrifugovaných preparátů a otiskových preparátů uzlin

Barvení nátěrů periferní krve a kostní dřeně, cytocentrifugovaných preparátů pleurálního punktátu a cerebrospinálního likvoru a otiskových preparátů lymfatických uzlin bylo prováděno klasickou metodou Pappenheimova panoptického barvení v roztocích May-Grünwald a Giemsa-Romanowski. Důkladně zaschlé nátěry a ostatní preparáty byly nejdříve fixovány v barvicí kyvetě v neředěném roztoku May-Grünwald po dobu 10 minut a po opláchnutí destilovanou vodou následně barveny po dobu 15-20 minut v barvicí kyvetě v roztoku Giemsa-Romanowski, čerstvě ředěném

destilovanou vodou v poměru 1:10. Po barvení byly nátěry a preparáty opláchnuty destilovanou vodou a ponechány v šikmé poloze volně oschnout. Pro fixaci a barvení byly použity uvedené roztoky výrobce PENTA.

7.2.1.4 Cytologické hodnocení nátěrů, cytocentrifugovaných preparátů a otiskových preparátů uzlin

Cytomorfologické hodnocení probíhalo s využitím mikroskopu Nikon Eclipse Ni výrobce Nikon. Nátěry, cytocentrifugované a otiskové preparáty byly nejdříve prohlédnuty při menším zvětšení (objektiv Nikon Plan 20x/0.40). Detailní cytomorfologické pozorování se provádělo s využitím imerzního objektivu Nikon Plan Apo 100x/1.40 Oil CNG, který je určen speciálně pro pozorování nátěrů a preparátů bez krycího skla. Použitá imerze byla od dodavatele Mediopta Brzica.

V případě nátěrů periferní krve a kostní dřeně byl stanoven rozpočet na 300-500 hodnocených buněk.

Cytomorfologická analýza při 1000 násobném zvětšení zahrnovala hodnocení velikosti buněk, poměru cytoplazmy a jádra, tvaru a lokalizace jádra, charakteru jaderného chromatinu, přítomnosti a lokalizace nukleolů, barvitelnosti cytoplazmy, přítomnost intracytoplazmatických vakuol, granulí nebo inkluzí.

Na základě detailního cytomorfologického posouzení byly případy řazeny k jednotlivým cytomorfologickým typům, formám či variantám. U CLL byly případy řazeny k typické formě CLL či atypické formě CLL (CLL/PL, pleomorfní varianta CLL); u SLL byly případy řazeny k malobuněčnému či jinému typu nemoci; u MCL byly případy řazeny ke klasické formě nebo jednotlivým variantám (malobuněčná, pleomorfní, blastoidní, MZL-like); u CD5+ MZL byly případy řazeny k malobuněčnému typu včetně plazmocytoidní diferenciace, typu se středními/velkými lymfocyty, pleomorfnímu typu a typu s vilózními lymfocyty; u CD5+ DLBCL byly případy řazeny k centroblastické, imunoblastické a anaplastické variantě, u skupiny neklasifikovatelných CD5+ B-lymfoidních neoplázií byly případy řazeny k malobuněčnému typu včetně plazmocelulární diferenciace, typu se středními/velkými lymfocyty a pleomorfnímu typu.

U některých případů se prováděla obrazová dokumentace s využitím digitální kamery značky Jenoptic ProgRes C3.

Cytomorfologické hodnocení prováděl jeden pracovník (autor práce).

7.2.2 Metodika stanovení imunofenotypového profilu

7.2.2.1 Odběr primárního vzorku a transport do laboratoře

V případě vzorků periferní krve se prováděl odběr žilní krve do plastové zkumavky s protisrážlivým roztokem EDTA (zkumavky výrobce Sarstedt, uzavřený systém odběru).

Vzorky kostní dřeně se odebíraly v lokální anestézii za sterilních podmínek aspirací z lopaty kostní kyčelní, pro flow-cytometrickou analýzu sloužila druhá frakce aspirátu v objemu cca 3-4 ml.

Vzorky lymfatických uzlin se získávaly exstirpací nebo excizí prováděnou na operačním sále; odebraná uzlina či její část byla ihned po odběru uložena do nízké skleněné nádoby na gázu zvlhčenou roztokem Cell Wash výrobce Becton Dickinson.

Vzorek pleurálního punktátu k flow-cytometrické analýze byl odebírán pleurální punkcí jako první frakce punktátu do stříkačky a ihned přemístěn do sterilní zkumavky.

Cerebrospinální likvor se odebíral lumbální punkcí do sterilních plastových zkumavek, k flow-cytometrické analýze sloužila druhá frakce punktátu o objemu cca 3 ml.

Transport do laboratoře probíhal identickým způsobem popsaným v části 7.2.1.1, doba od odběru do zahájení zpracování vzorku nepřesáhla 1 hodinu. Transport a zpracování vzorků cerebrospinálního likvoru se realizovaly okamžitě po odběru.

7.2.2.2 Příprava buněčné suspenze

U vzorků periferní krve byl stanoven počet leukocytů vyšetřením analyzátozem Sysmex XT 2000i. V případě počtu leukocytů nad $20 \times 10^9/l$ byl vzorek periferní krve ředěn roztokem Cell Wash výrobce Becton Dickinson tak, aby výsledný počet leukocytů ve vzorku byl pod $20 \times 10^9/l$.

Vzorky kostní dřeně byly ponechány stát po dobu 30 minut. Následně proběhla filtrace s využitím mikrofiltru 100 μm výrobce Sysmex. Po filtraci byl ve vzorcích stanoven

počet leukocytů vyšetřením analyzátozem Sysmex XT 2000i. V případě počtu leukocytů nad $20 \times 10^9/l$ byl vzorek periferní krve ředěn roztokem Cell Wash výrobce Becton Dickinson tak, aby výsledný počet leukocytů ve vzorku byl pod $20 \times 10^9/l$.

Vzorky pleurálního výpotku byly filtrovány s využitím mikrofiltru 100 μm výrobce Sysmex. Po filtraci byl ve vzorcích stanoven počet leukocytů vyšetřením analyzátozem Sysmex XT 2000i. V případě počtu leukocytů nad $20 \times 10^9/l$ byl vzorek periferní krve ředěn roztokem Cell Wash výrobce Becton Dickinson tak, aby výsledný počet leukocytů ve vzorku byl pod $20 \times 10^9/l$. Pokud byl stanovený počet leukocytů ve vzorku pod $2 \times 10^9/l$, prováděla se koncentrace vzorku odstraněním supernatantu po centrifugaci vzorku po dobu 5 minut při 1000 otáček za minutu a event. následnou úpravou celularity vzorku roztokem Cell Wash.

Vzorky lymfatických uzlin byly rozstříhány ostrými sterilními nůžkami na drobné fragmenty. Po přidání roztoku Cell Wash výrobce Becton Dickinson v množství 3 ml byla provedena mechanická dezintegrace nastříhaného vzorku s využitím mechanického dezintegrátoru výrobce Simax (pomalými, jemnými pohyby pístu byla tkáň rozrušena na buněčnou suspenzi v roztoku Cell Wash výrobce Becton Dickinson). Následně proběhla filtrace s využitím mikrofiltru 100 μm výrobce Sysmex. Po filtraci byl ve vzorcích stanoven počet leukocytů vyšetřením analyzátozem Sysmex XT 2000i. V případě počtu leukocytů nad $20 \times 10^9/l$ byl vzorek periferní krve ředěn roztokem Cell Wash výrobce Becton Dickinson tak, aby výsledný počet leukocytů ve vzorku byl pod $20 \times 10^9/l$.

Vzorky cerebrospinálního likvoru nebyly před pipetováním upravovány.

7.2.2.3 Zpracování vzorku (buněčné suspenze) k analýze průtokovou cytometrií

Vzorek byl pipetován do pěti jednorázových polystyrénových testovacích zkumavky výrobce Becton Dickinson o rozměrech 12 x 75 mm (čísla zkumavek 1-5). K pipetování se využívala pipeta značky Biohit m10 s nastavovacím objemem 10–100 μl . Pipetovaný objem vzorku činil 25 μl v případě zkumavek 1, 3, 4 a 5 a 50 μl v případě zkumavky č. 2.

Ke vzorku ve zkumavkách 1, 3, 4 a 5 se pipetovaly pipetami značky Biohit m10 o pipetovacím objemu 0,5 – 10 μl a Biohit Proline o pipetovacím objemu 2–20 μl

monoklonální protilátky výrobce Becton Dickinson and Company, BD Biosciences, San José, CA, USA:

- do zkumavky číslo 1 protilátka BD Multitest™ 6-Color TBNK, katalogové číslo 644611; pipetovaný objem protilátky 5 µl,
- do zkumavky číslo 3 protilátka BD Oncomark™ FMC7/CD23/CD19, katalogové číslo 331359; pipetovaný objem protilátky 5 µl,
- do zkumavky číslo 3 protilátka CD79b (klon SN8) APC, katalogové číslo 335834; pipetovaný objem protilátky 3 µl,
- do zkumavky číslo 3 protilátka CD5 (klon L17F12) PE-Cy™7, katalogové číslo 348810; pipetovaný objem protilátky 3 µl,
- do zkumavky číslo 4 protilátka CD20 (klon L27) APC-Cy™7, katalogové číslo 335829; pipetovaný objem protilátky 3 µl,
- do zkumavky číslo 4 protilátka CD10 (klon HI10A) PE, katalogové číslo 332776; pipetovaný objem protilátky 3 µl,
- do zkumavky číslo 4 protilátka CD43 (klon 1G10) APC, katalogové číslo 560198; pipetovaný objem protilátky 3 µl,
- do zkumavky číslo 4 protilátka CD35 FITC (klon E11), katalogové číslo 555452; pipetovaný objem protilátky 3 µl,
- do zkumavky číslo 4 protilátka CD38 (klon HB-7) PE-Cy™7, katalogové číslo 335825; pipetovaný objem protilátky 3 µl,
- do zkumavky číslo 5 protilátka BD Oncomark™ CD103/CD22/CD20, katalogové číslo 333174; pipetovaný objem protilátky 5 µl,
- do zkumavky číslo 5 protilátka CD25 (klon 2A3) PE-Cy™7, katalogové číslo 335824; pipetovaný objem protilátky 3 µl,
- do zkumavky číslo 5 protilátka CD11c-APC (klon B-ly6), katalogové číslo 559877; pipetovaný objem protilátky 3 µl.

Po označení monoklonálními protilátkami probíhala inkubace zkumavek v temnu při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Po inkubaci se prováděla lýza erytrocytů a promývání vzorku automatickým způsobem v zařízení BD FACS Lyse/Wash Assistant výrobce Becton Dickinson. K lýze vzorku se využívalo činidlo BD Pharm Lyse Buffer výrobce Becton Dickinson (katalogové číslo 555899), k promývání vzorku roztok Cell

Wash výrobce Becton Dickinson (katalogové číslo 349524) a k fixaci vzorku po lýze a promytí roztok Cell FIX výrobce Becton Dickinson (katalogové číslo 340181). Při automatické lýze, promývání a fixaci vzorku se postupovalo v souladu s manuálem výrobce. U vzorků lymfatických uzlin a pleurálního punktátu a cerebrospinálního likvoru byly vzorky lyzovány pouze v případě kontaminace buněčné suspenze erytrocyty, vzorky cerebrospinálního likvoru nebyly lyzovány.

V případě zkumavky číslo 2 se prováděla automatická lýza erytrocytů a promytí vzorku v zařízení BD FACS Lyse/Wash Assistant výrobce Becton Dickinson před pipetováním monoklonální protilátky. Následně se ke vzorku ve zkumavce 2 pipetovaly pipetami značky Biohit o pipetovacím objemu 0,5–10 µl, 2–20 µl monoklonální protilátky výrobce Becton Dickinson and Company, BD Biosciences, San José, CA, USA:

- protilátka BD Oncomark™Kappa/Lambda/CD19, katalogové číslo 331355; pipetovaný objem protilátky 10 µl,
- protilátka CD95-APC (klon C3H), katalogové číslo 340481; pipetovaný objem 5 µl,
- protilátka CD200 PE-Cy™7 (klon MRC OX-104), katalogové číslo 562125; pipetovaný objem 5 µl.

Po označení vzorku ve zkumavce číslo 2 monoklonálními protilátkami probíhala inkubace zkumavky v temnu při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Po inkubaci se provádělo promytí a fixace vzorku automatickým způsobem v zařízení BD FACS Lyse/Wash Assistant výrobce Becton Dickinson.

Panel k imunofenotypizaci byl sestaven na základě:

- literárních údajů o imunofenotypizaci lymfoproliferativních onemocnění,
- výběru kvalitních monoklonálních protilátek a jejich konjugátů,
- technických parametrů použitého průtokového cytometru,
- klinické potřeby širší diferenciální diagnostiky lymfoproliferativních onemocnění ve vyšetřovaných vzorcích.

Výsledná sestava zkumavek připravených k analýze průtokovou cytometrií je popsána v tab. 9.

Tab. 9. Sestava zkumavek k analýze průtokovou cytometrií

Zkumavka	Směs protilátek
Zkumavka číslo 1	TBNK konjugát (CD45-PerCP-Cy5.5/CD3-FITC/CD4-PE-Cy7/CD8-APC-Cy7/CD19-APC/CD16+56-PE)
Zkumavka číslo 2	CD19-PerCp-Cy5.5/kappa-FITC/lambda-PE + CD200-PE-Cy7 + CD95-APC
Zkumavka číslo 3	CD 19-PerCp-Cy5.5/CD23-PE/FMC7-FITC + CD79b-APC + CD5-PE-Cy7
Zkumavka číslo 4	CD20-APC-Cy7 + CD10-PE + CD43-APC + CD35-FITC + CD38-PE-Cy7
Zkumavka číslo 5	CD20-PerCp-Cy5.5/CD22-PE/CD103-FITC + CD25-PE-Cy7 + CD11c-APC

7.2.2.4 Analýza průtokovou cytometrií

Analýza vzorků průtokovou cytometrií se realizovala s využitím průtokového cytometru Becton Dickinson FACS Canto II vybaveného 2 lasery (laser s vlnovou délkou emitovaného světla 488 nm, laser s vlnovou délkou emitovaného světla 633 nm).

Jako nosný roztok využíval průtokový cytometr roztok BD FACS Flow výrobce Becton Dickinson.

Cílový počet analyzovaných B-lymfocytů činil 5000.

Nastavení technických parametrů analýzy průtokovou cytometrií (napětí, kompenzace spektrálního přesvitu) probíhalo automaticky s využitím kalibračních kuliček BD Cytometer Setup and Tracking Beads (viz část 7.2.2.5).

Příklad nastavení technických parametrů průtokového cytometru a nastavení kompenzací ukazují tab. 10 a tab. 11.

Tab. 10. Příklad nastavení voltáží pro FSC, SSC a jednotlivé fluorochromy

Parametr/fluorochrom	Napětí (mV)
<i>FSC</i>	313
<i>SSC</i>	393
<i>FITC</i>	444
<i>PE</i>	478
<i>PerCp-Cy5.5</i>	583
<i>PE-Cy7</i>	597
<i>APC</i>	548
<i>APC-Cy7</i>	518

Tab. 11. Příklad nastavení kompenzací jednotlivých fluorochromů

Fluorochrom	Fluorochrom	Parametr kompenzace
<i>PE</i>	<i>FITC</i>	6,499999735
<i>PerCP</i>	<i>FITC</i>	1,208645083
<i>PE-Cy7</i>	<i>FITC</i>	0,350356313
<i>APC</i>	<i>FITC</i>	0,043423843
<i>APC-Cy7</i>	<i>FITC</i>	0
<i>FITC</i>	<i>PE</i>	2,199999964
<i>PerCP</i>	<i>PE</i>	15,4800001
<i>PE-Cy7</i>	<i>PE</i>	4,43691581
<i>APC</i>	<i>PE</i>	0,035255467
<i>APC-Cy7</i>	<i>PE</i>	0
<i>FITC</i>	<i>PerCP</i>	0,149884953
<i>PE</i>	<i>PerCP</i>	0,199983414
<i>PE-Cy7</i>	<i>PerCP</i>	60,00000024
<i>APC</i>	<i>PerCP</i>	2,40000199
<i>APC-Cy7</i>	<i>PerCP</i>	3,600000225
<i>FITC</i>	<i>PE-Cy7</i>	0,084234932
<i>PE</i>	<i>PE-Cy7</i>	0,649999718
<i>PerCP</i>	<i>PE-Cy7</i>	1,479999572
<i>APC</i>	<i>PE-Cy7</i>	0,014041252
<i>APC-Cy7</i>	<i>PE-Cy7</i>	1,399999632
<i>FITC</i>	<i>APC</i>	1,299999863
<i>PE</i>	<i>APC</i>	0
<i>PerCP</i>	<i>APC</i>	0
<i>PE-Cy7</i>	<i>APC</i>	0

<i>APC-Cy7</i>	<i>APC</i>	11,00000047
<i>FITC</i>	<i>APC-Cy7</i>	0
<i>PE</i>	<i>APC-Cy7</i>	0
<i>PerCP</i>	<i>APC-Cy7</i>	0,50000005
<i>PE-Cy7</i>	<i>APC-Cy7</i>	11,99999525
<i>APC</i>	<i>APC-Cy7</i>	13,99999964

K záznamu dat získaných analýzou pomocí průtokové cytometrie sloužil software Becton Dickinson FACS Diva, který byl aplikován v souladu s manuálem výrobce. U jednotlivých analyzovaných znaků byla sledována jejich povrchová exprese na populaci B-lymfocytů. K výběru této populace sloužil u zkumavky číslo 1, 2 a 3 konvenční gating s využitím FSC, SSC a CD19, u zkumavek číslo 4 a 5 gating s využitím FSC, SSC a CD20. Expres byla hodnocena semikvantitativně v kategoriích negativní/pozitivní (cut off 30%), dále jako nízká/střední/vysoká na expertní bázi a zejména pak kvantitativně pomocí průměrné fluorescenční intenzity (MFI). Hranice positivity znaku byla obvykle stanovena podle populace s negativní expresí vyšetřovaného znaku. Izotypové kontroly nebyly použity. Výběr analyzované populace, hodnocení positivity/negativity znaku a záznam hodnot MFI prováděl jeden pracovník (autor práce).

7.2.2.5 Kalibrace průtokového cytometru, kontrola kvality a verifikace

Pro nastavení průtokového cytometru v software BD FACS Diva byly použity kalibrační kuličky BD Cytometer Setup and Tracking Beads, které představují mezinárodní systém pro optimalizaci a kontrolu všech testů na průtokovém cytometru FACS Canto II a standardizaci měření mezi laboratořemi. Kalibrace se prováděla třikrát týdně, cílové hodnoty kalibrace se lišily mezi šaržemi.

Interní kontrola kvality se realizovala denně měřením kontrolního materiálu IMMUNO-TROL Cells výrobce Beckmann Coulter a porovnáním s deklaroványi hodnotami. Pomocí tohoto kontrolního materiálu s deklaroványi cílovými hodnotami byla prováděna také verifikace metody.

Externí kontrola kvality byla zajištěna účastí v systému externí kontroly kvality SEKK a mezilaboratorního porovnání organizovaného Ústavem hematologie a krevní transfúze v Praze.

7.2.3 Metodika statistického zpracování dat

Statistické analýzy (průměr, medián, Mann-Whitney-Wilcoxon, průměrný lineární ddCq) byly provedeny s využitím R statistického softwarového balíčku (<http://www.r-project.org/>).

Pro detekci nejlepších kombinací dvojic a trojic atributů klasifikujících skupiny zkoumaných vzorků (jednotlivé diagnostické entity) byla použita multilineární diskriminační analýza (87). Pro každou kombinaci atributů byla zjištěna chyba klasifikace a kombinace s nejmenší chybou byly vybrány pro vizualizaci oddělení tříd.

Nejlepší kombinace trojic atributů schopné oddělit třídy (diagnostické entity) s přesností menší než 0,01 byly použity pro identifikaci klíčových atributů. Prostřednictvím převodu na síť byly atributy z těchto kombinací převedeny na vrcholy a společné výskyty v kombinacích na hrany sítě. Pro převod na síť byl použit algoritmus využívající analýzu nejbližších sousedů (87). Velikost vrcholů a váha hran vyjadřuje jejich důležitost zohledňující jejich společný výskyt v nejlepších kombinacích tří atributů.

Pro vizualizaci datové sady byla použita transformace dat na síť (graf). Vrchol sítě reprezentuje vzorek a hrana mezi vrcholy reprezentuje podobnost vzorků. Hrany byly zvoleny tak, aby propojovaly nejbližší sousedy (vrcholy, které jsou si navzájem nejbližší, tedy mají největší podobnost). Pro výpočet podobnosti byla použita Gaussova funkce. Počet nejbližších sousedů byl pro každý vrchol vybrán tak, aby odpovídal tzv. reprezentativnosti vrcholů sítě (88). Barevně jsou v síti odlišeny zkoumané skupiny pacientů (jednotlivé diagnostické entity).

7.3 Výsledky

7.3.1 Výsledky cytomorfologické analýzy zralých CD5+ B-lymfoidních neoplázií

7.3.1.1 Cytomorfologie chronické lymfocytární leukémie a lymfomu z malých lymfocytů

U CLL bylo vyšetřeno celkem 167 vzorků od 157 pacientů (100 mužů a 57 žen): 134 vzorky periferní krve, 29 vzorků kostní dřeně, 2 vzorky lymfatické uzliny a 2 vzorky pleurálního punktátu. Rozdělení na cytomorfologické typy CLL bylo realizováno u vzorků periferní krve.

U SLL bylo vyšetřeno celkem 6 vzorků od 3 pacientů (2 muži a 1 žena): 1 vzorek periferní krve, 2 vzorky kostní dřeně a 3 vzorky lymfatické uzliny.

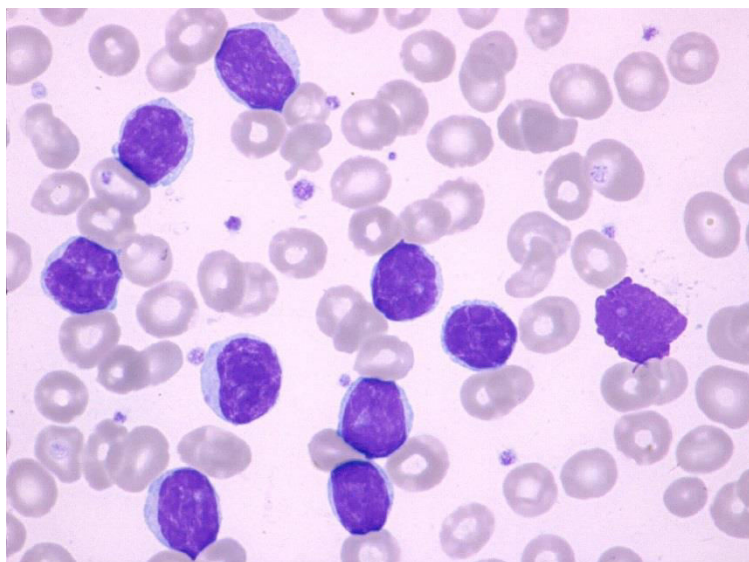
Cytomorfologické nálezy dokumentují tab. 12 a obr. 18 - 27.

Tab. 12. Cytomorfologie CLL/SLL

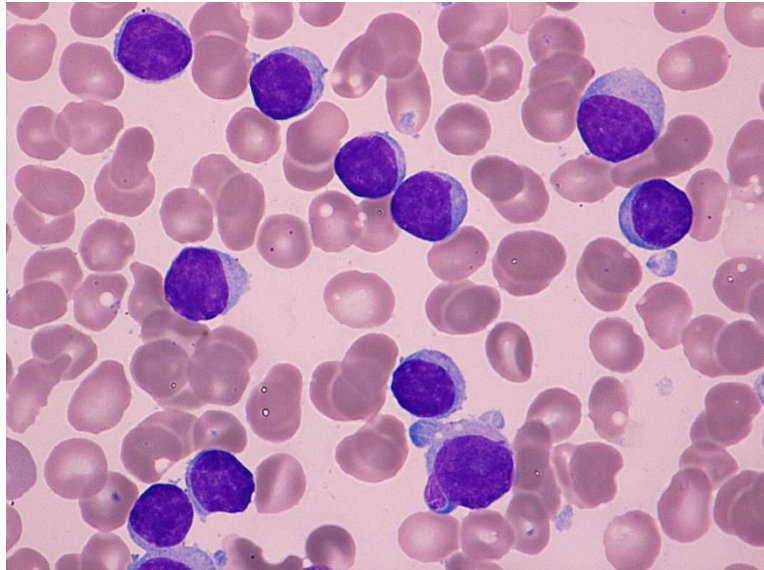
Cytomorfologický typ/forma	CLL – počet vzorků	SLL – počet vzorků
<i>Typická forma CLL/SLL (malobuněčný typ)</i>	107 (79.9 %)	6 (100 %)
<i>Atypická forma CLL</i>	27 (20.1 %)	0
<i>Varianta CLL/PL</i>	16 (11.9 %)	0
<i>Pleomorfní varianta CLL</i>	11 (8.2 %)	0

Vzácné byly případy s plazmocelulární diferenciací (celkem 4 vzorky) nebo s přítomností intracytoplazmatických vakuol (1 vzorek).

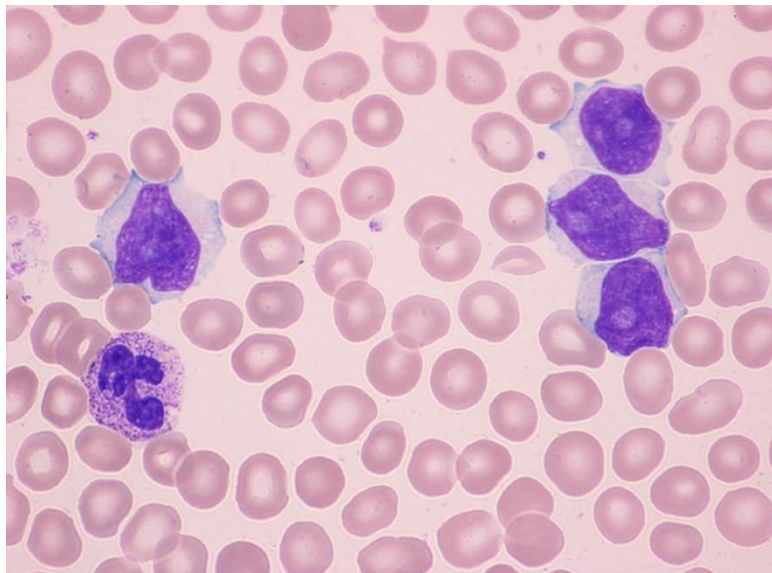
Obr. 18. CLL, typický cytomorfologický nález, periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



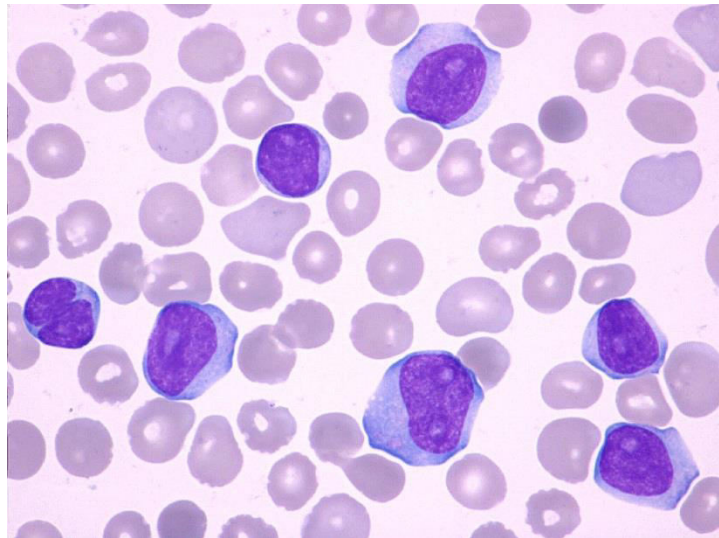
Obr. 19. Typická CLL, plazmocelulární diferenciace, periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



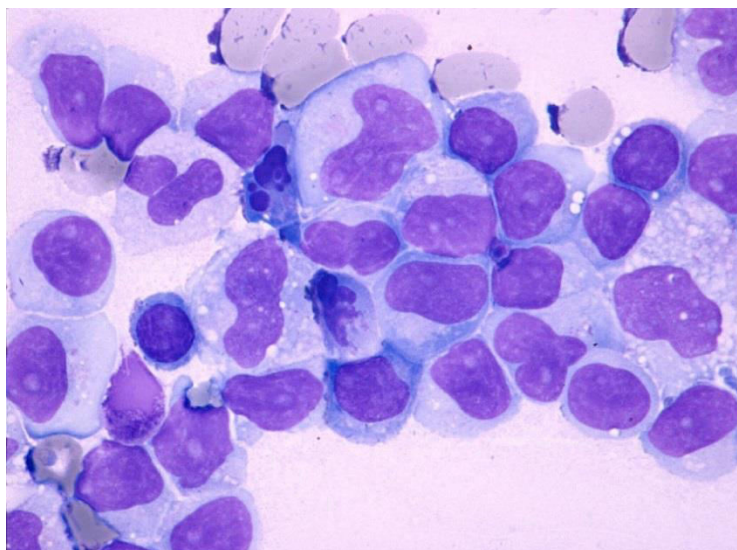
Obr. 20. Atypická CLL, varianta CLL/PL (skupina prolymfocytů), periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



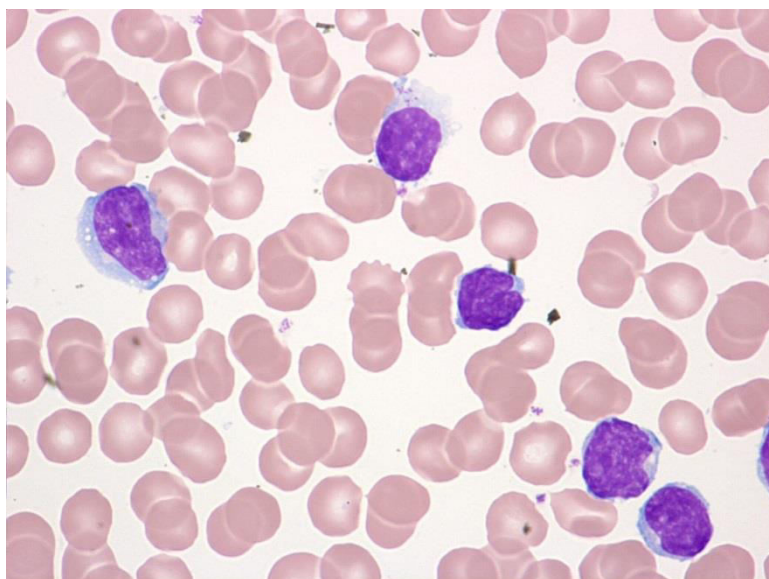
Obr. 21. Atypická CLL – varianta CLL/PL, periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



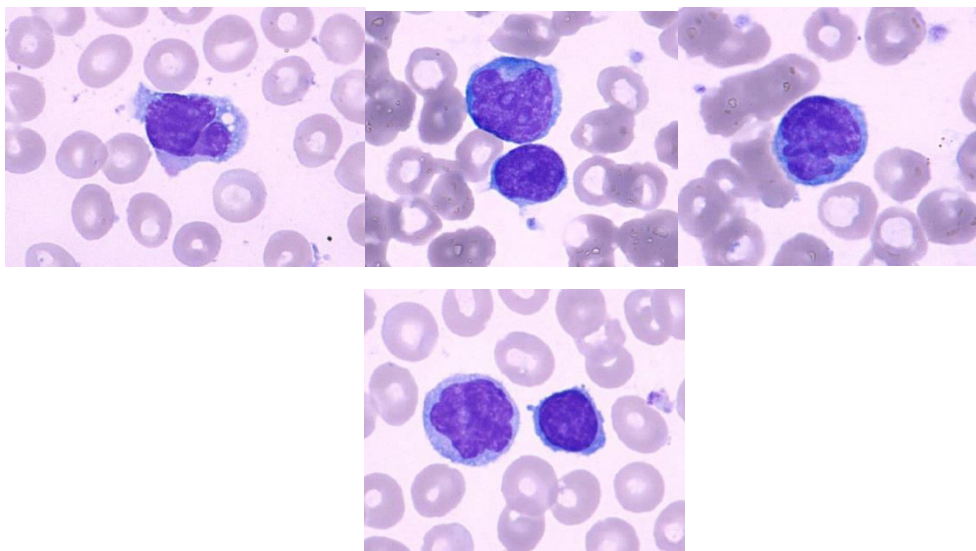
Obr. 22. CLL, cytomorfológický nález na hranici CLL/PL a pleomorfní varianty, pleurální punktát, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



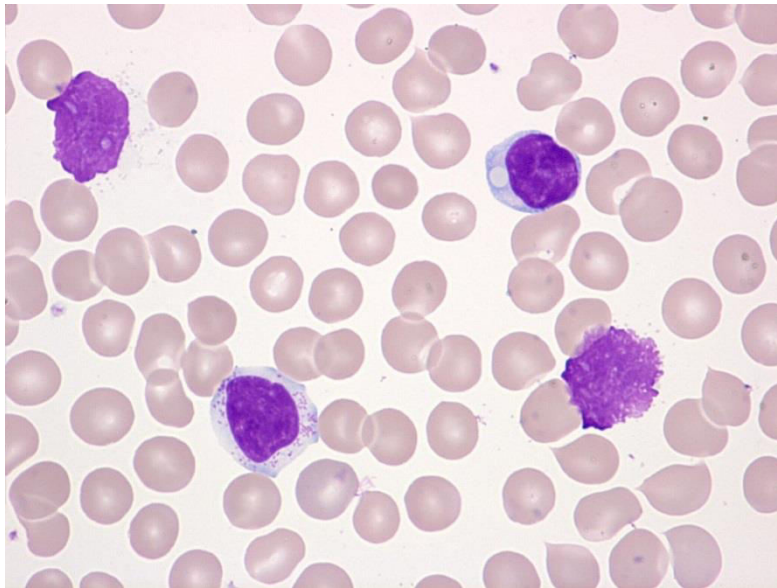
Obr. 23. Atypická CLL, pleomorfní varianta, (lymfocyty s jadernými atypiami a atypiami cytoplazmy), periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



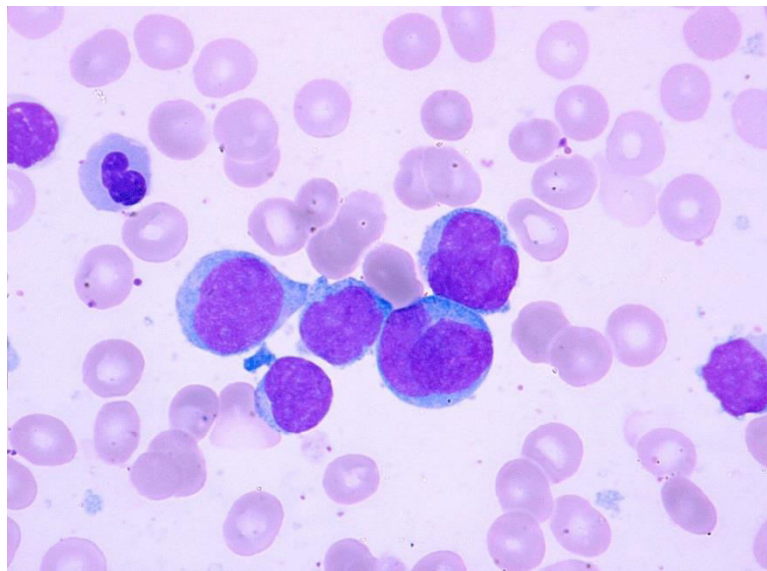
Obr. 24. Atypická CLL – pleomorfní varianta (jaderné atypie, bazofilie cytoplazmy, vakuolizace cytoplazmy), periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



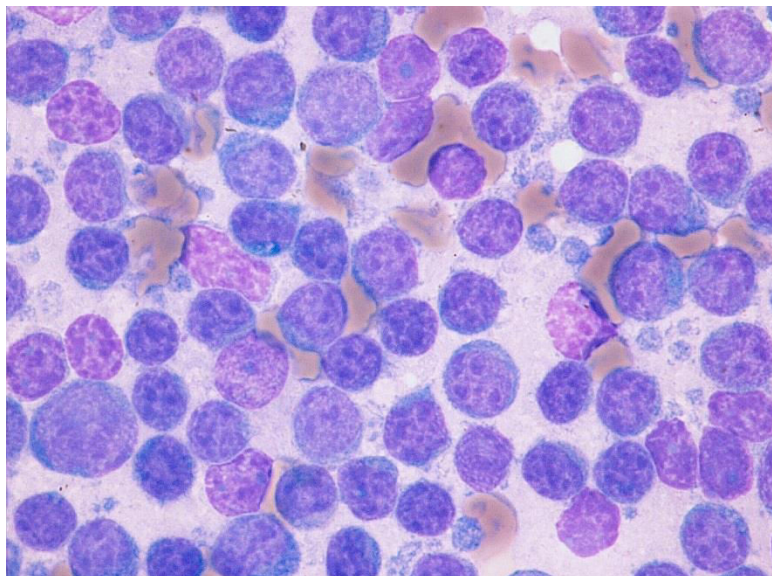
Obr. 25. Atypická CLL, pleomorfní varianta (lymfocyty s cytoplazmatickými vakuolami), periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



Obr. 26. Atypická CLL, pleomorfní varianta (středně velké lymfocyty s jadernými atypiami, silně bazofilní cytoplazma), kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



Obr. 27. SLL, infiltrace lymfatické uzliny malými zralými lymfocyty, imprint lymfatické uzliny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



7.3.1.2 Cytomorfologie lymfomu z pláštových buněk

U MCL bylo vyšetřeno celkem 38 vzorků od 20 pacientů (13 mužů a 7 žen): 15 vzorků periferní krve, 18 vzorků kostní dřeně, 4 vzorky lymfatické uzliny a 1 vzorek cerebrospinálního likvoru.

Cytomorfologické nálezy dokumentuje tab. 13 a obr. 28 – 38.

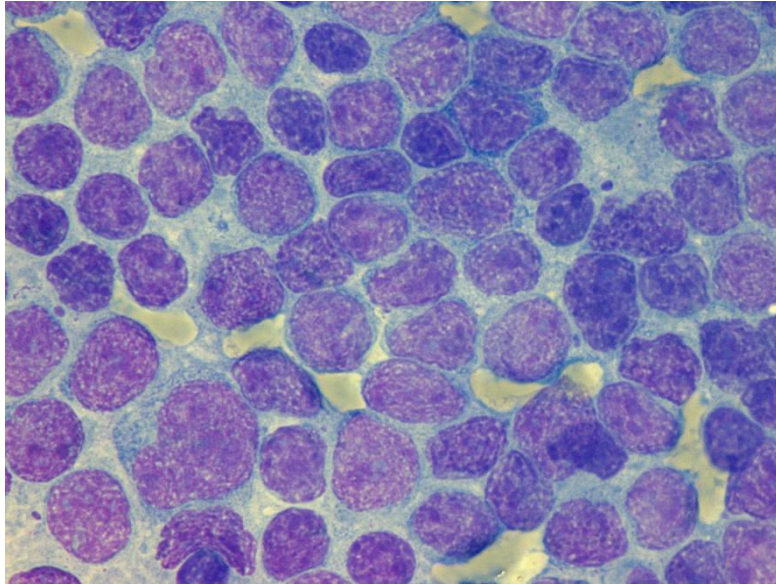
Tab. 13. Cytomorfologie MCL

Cytomorfologický typ	Počet vzorků
<i>Klasický MCL</i>	18 (47.4 %)
<i>Varianty MCL</i>	20 (52.6 %)
<i>Malobuněčná varianta</i>	9 (23.6 %)
<i>Pleomorfní varianta</i>	8 (21.1 %)
<i>Blastoidní varianta</i>	2 (5.3 %)
<i>Varianta podobná MZL</i>	1 (2.6 %)

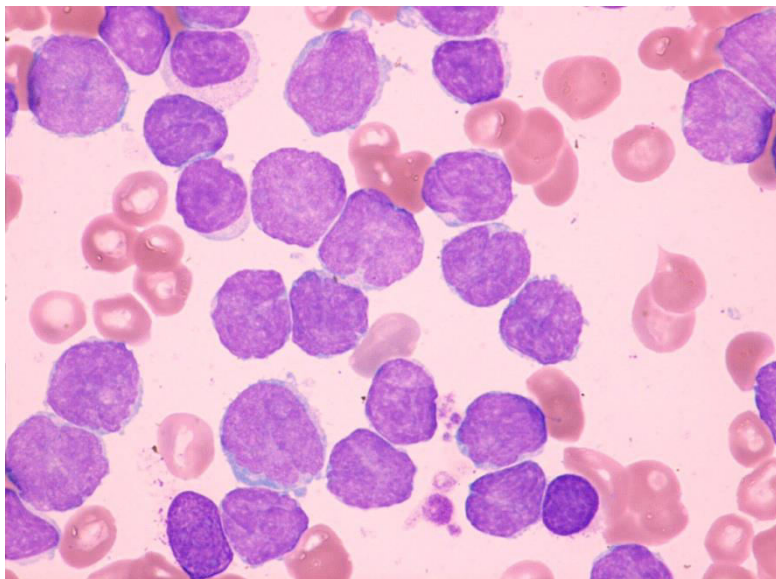
Dva případy vykazovaly přítomnost neoplastických elementů podobných prolymfocytům (obr. 33, 34). Jeden z případů pleomorfní varianty byl charakteristický výskytem bilobárních jader (obr. 35). Ve dvou případech jsme pozorovali cytomorfologickou diskordanci mezi nálezem v periferní krvi a kostní dřeni (klasický

MCL v periferní krvi versus pleomorfní varianta v kostní dřeni a malobuněčná varianta v periferní krvi versus pleomorfní obraz v kostní dřeni).

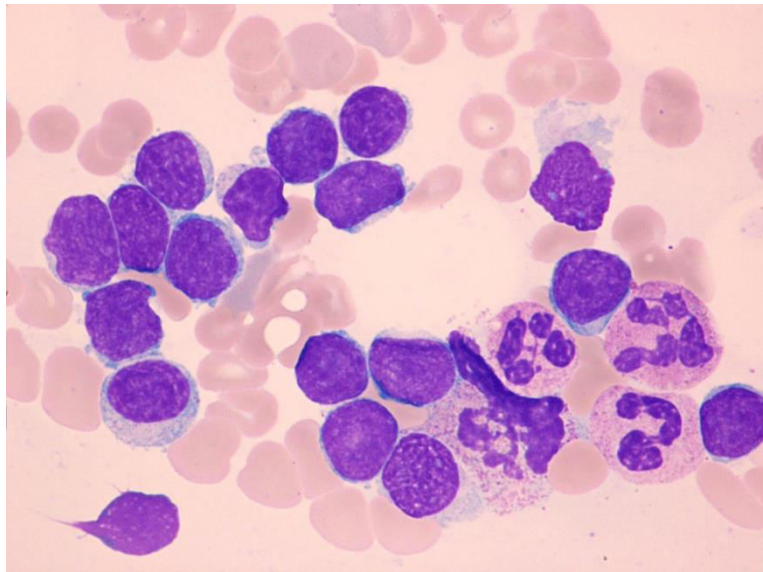
Obr. 28. MCL, klasická morfologie s převažujícími centrocyty, imprint lymfatické uzliny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



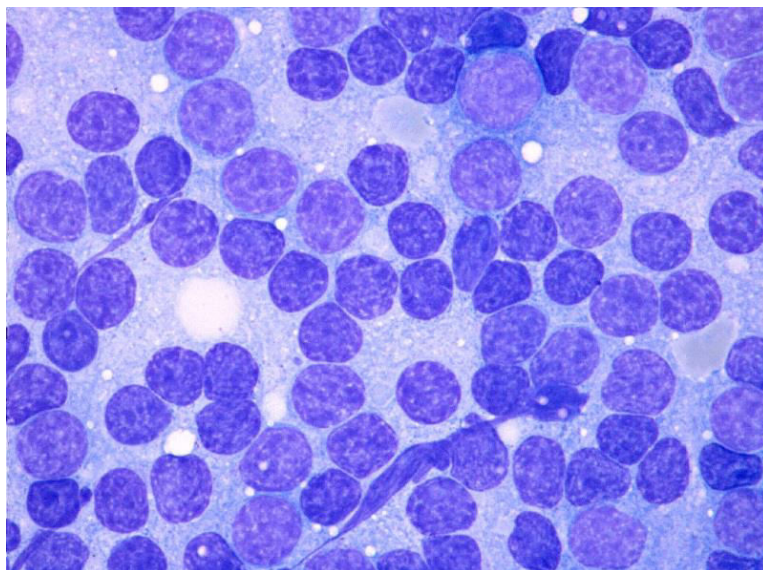
Obr. 29. MCL, klasická morfologie s převažujícími centrocyty a přítomností „buttock cells“, nátěr kostní dřene, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



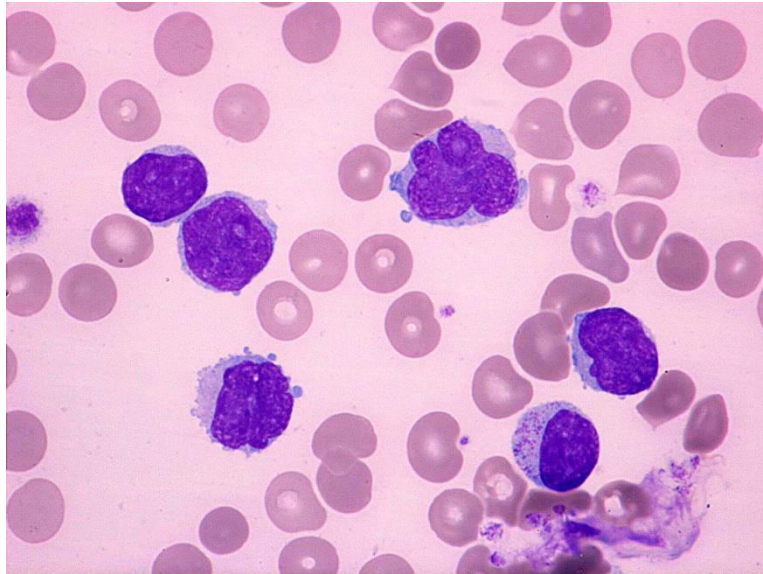
Obr. 30. MCL, malobuněčná („CLL-like“) varianta, převaha malých zralých lymfocytů, nátěr kostní dřeně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



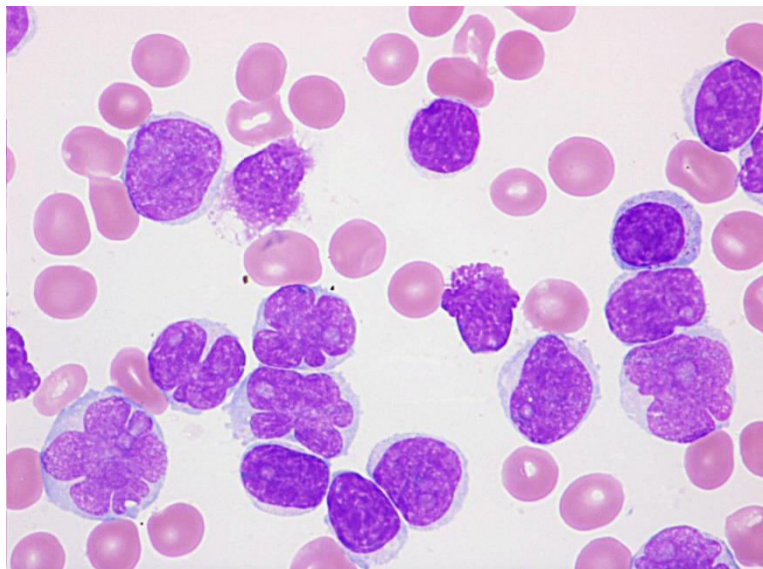
Obr. 31. MCL, malobuněčná varianta, imprint lymfatické uzliny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



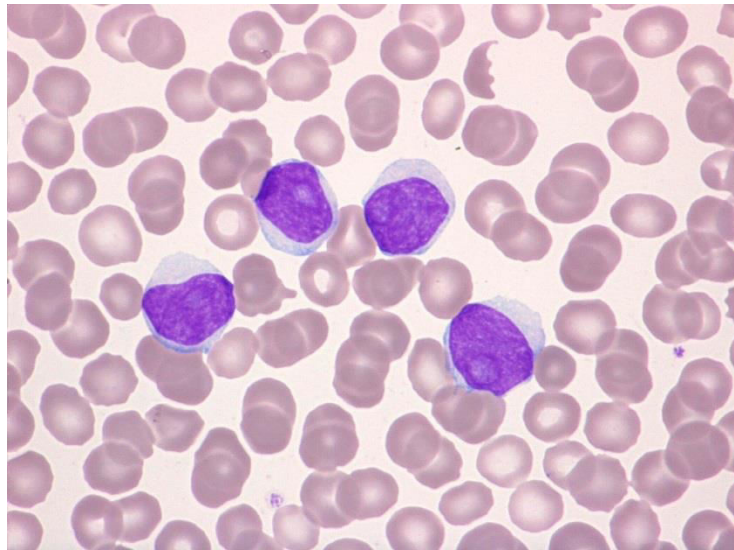
Obr. 32. MCL, pleomorfní varianta (anizocytóza, anizomorfie, jaderné atypie a přítomnost nukleolů), nátěr kostní dřeně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



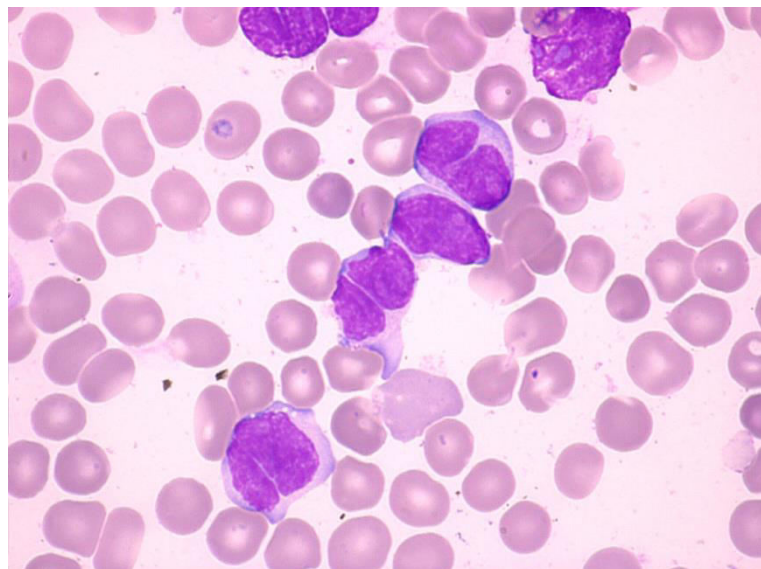
Obr. 33. MCL, pleomorfní varianta s prolymfocytoidními rysy (v popředí jaderné atypie), nátěr kostní dřeně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



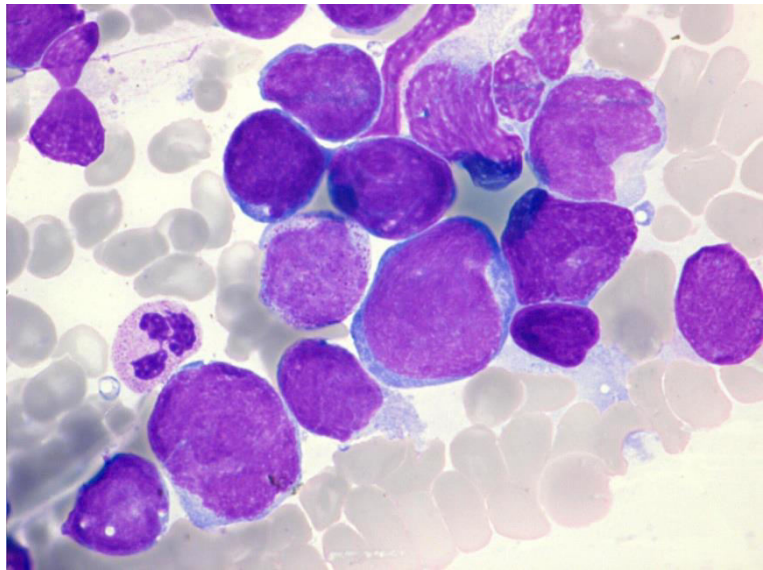
Obr. 34. MCL, pleomorfní varianta, lymfocyty s výraznými nukleoly podobné prolymfocytům, nátěr kostní dřeně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



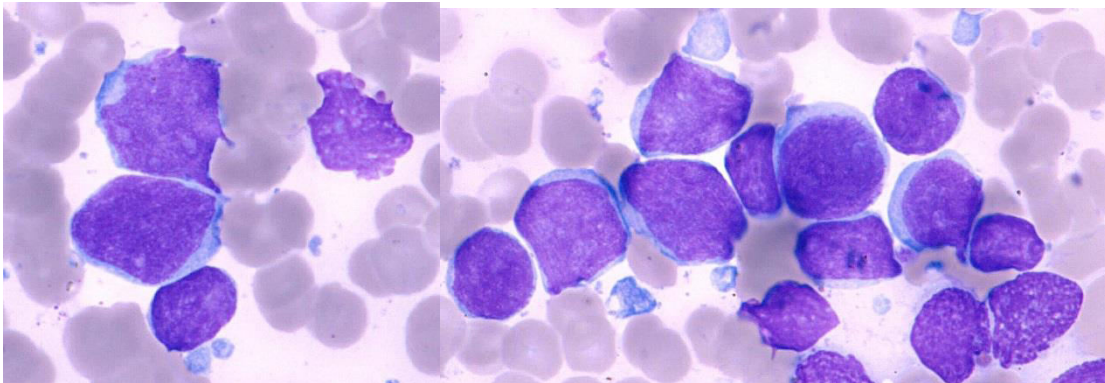
Obr. 35. MCL, pleomorfní varianta s bilobárními jádry, nátěr kostní dřeně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



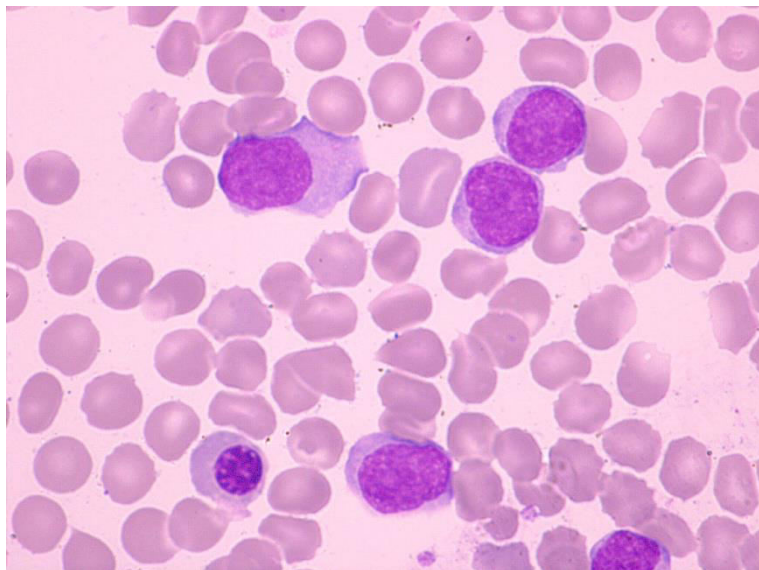
Obr. 36. MCL, blastoidní varianta, nátěr kostní dřeně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv autora, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



Obr. 37. MCL, blastoidní varianta, kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



Obr. 38. MCL, varianta podobná lymfomu z marginální zóny, nátěr kostní dřeně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



7.3.1.3 Cytomorfologie CD5+ lymfomu z marginální zóny

U CD5+ MZL bylo vyšetřeno celkem 11 vzorků od 7 pacientů (4 muži a 3 ženy): 5 vzorků periferní krve, 4 vzorky kostní dřeně, 1 vzorek lymfatické uzliny a 1 vzorek cerebrospinálního likvoru.

Cytomorfologické nálezy dokumentuje tab. 14 a obr. 39 – 48.

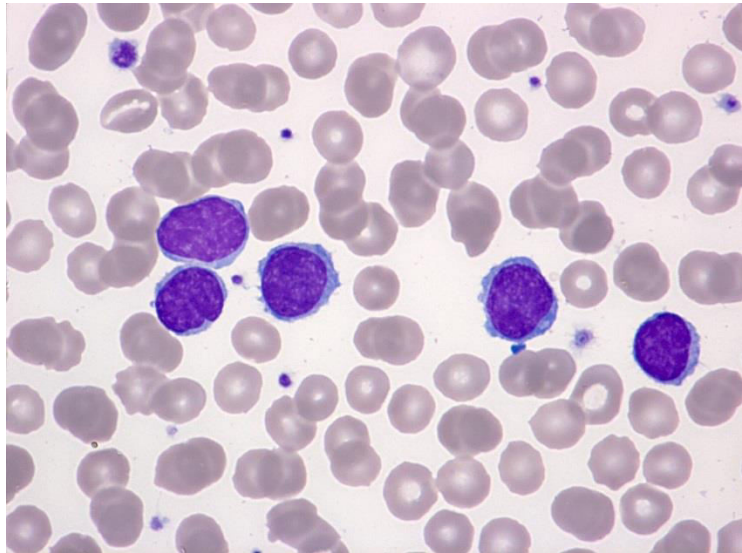
Tab. 14. Cytomorfologie CD5+ MZL

Cytomorfologický typ	Počet vzorků
<i>Malobuněčný</i>	3 (27.2 %)
<i>Malobuněčný s plazmocelulární diferenciací</i>	2 (18.2 %)
<i>Středně velké či velké lymfocyty</i>	2 (18.2 %)
<i>Pleomorfní</i>	2 (18.2 %)
<i>Splenický lymfom s vilózními lymfocyty</i>	2 (18.2 %)

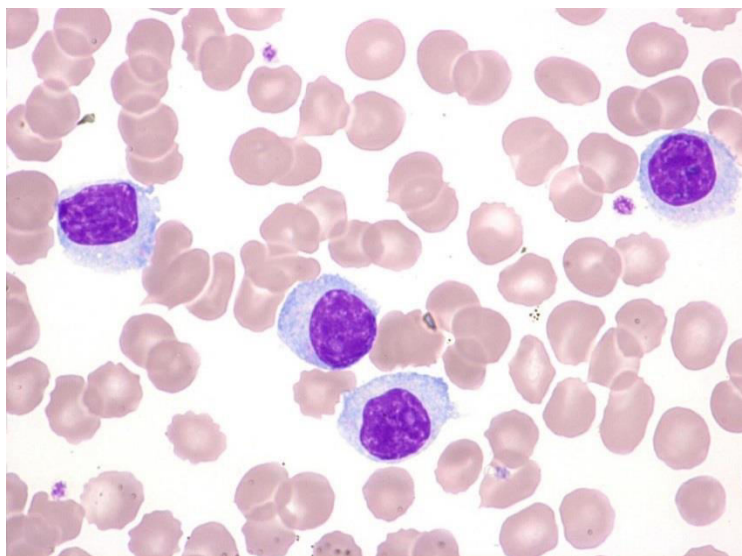
Velmi vzácný byl pleomorfní obraz u nemocné s pokročilým onemocněním a raritně excesivní hladinou monoklonálního imunoglobulinu G o kvantitě 81 g/l (obr. 46). U této pacientky došlo v průběhu onemocnění k transformaci lymfomu z marginální zóny do plazmablastického lymfomu (obr. 48). Zajímavý byl též pleomorfní obraz z likvoru u

nemocného s relapsem primárně nodálního CD5+ lymfomu z marginální zóny v CNS (obr. 47).

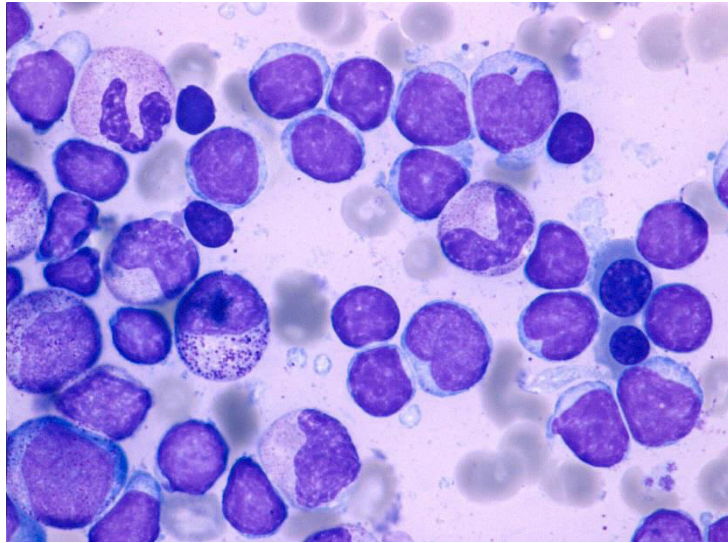
Obr. 39. CD5+ MZL, zralé lymfocyty, diskrétní nepravidelnosti cytoplazmy, periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



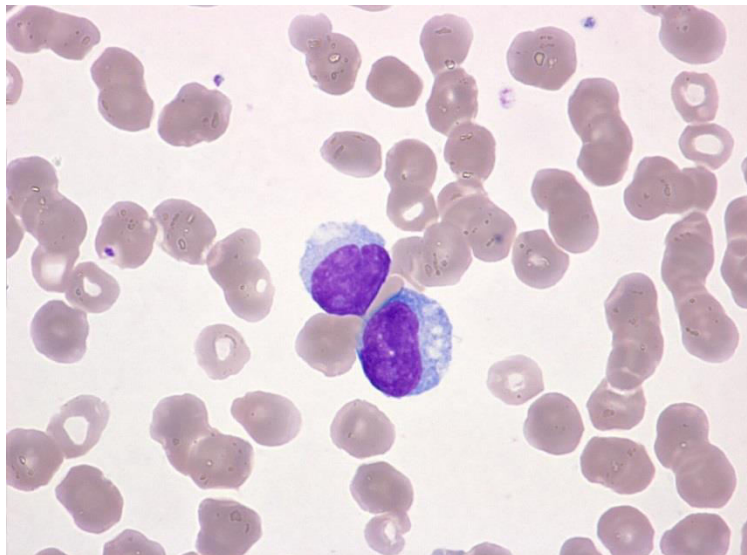
Obr. 40. CD5+ MZL, zralé lymfocyty s plazmocytoïdní diferenciací, periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



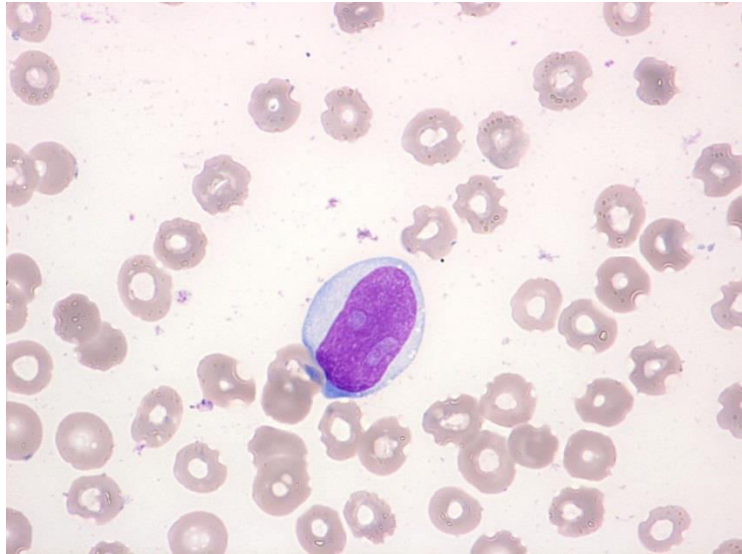
Obr. 41. CD5+ MZL, převážně malobuněčný obraz, zčásti s plazmocelulární diferenciací, kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



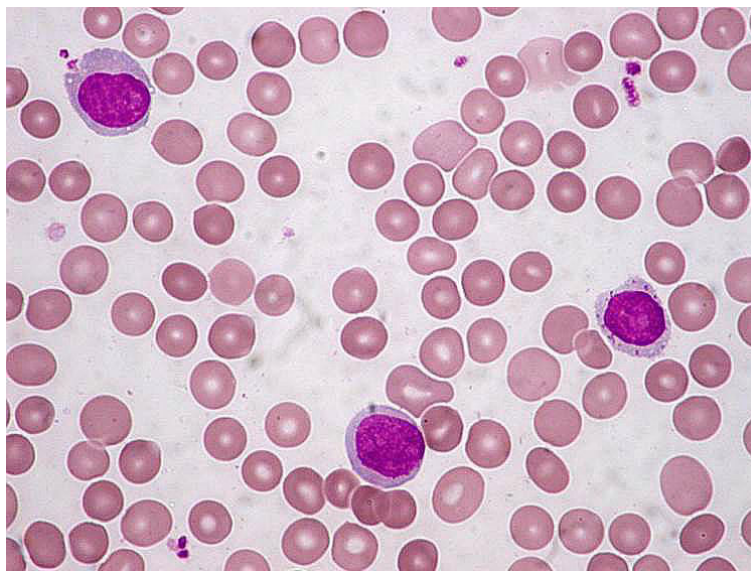
Obr. 42. CD5+ MZL, středně velké lymfocyty s naznačenou plazmocytoïdní diferenciací, s jadérky a vakuolizací cytoplazmy, kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



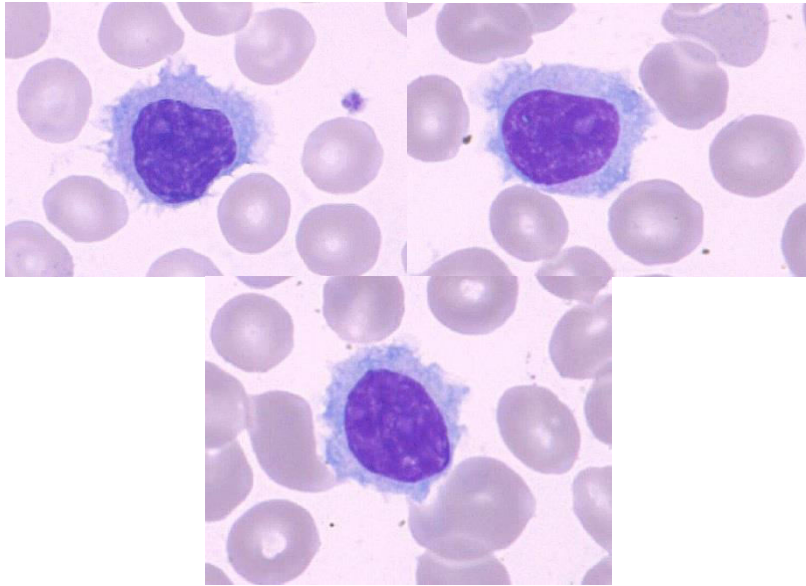
Obr. 43. CD5+ MZL, velký lymfocyt se dvěma jádérky blízky prolymfocytu, kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



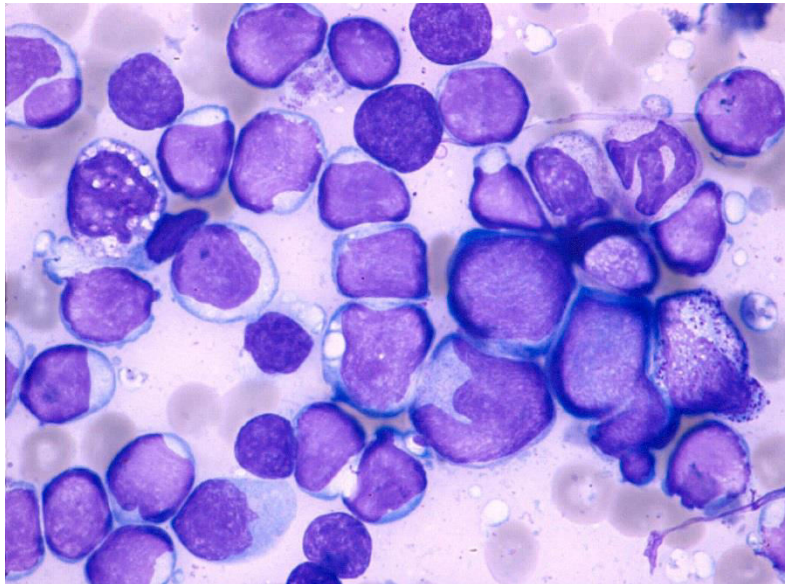
Obr. 44. CD5+ MZL, středně velké lymfocyty „monocytoidního vzhledu“, periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



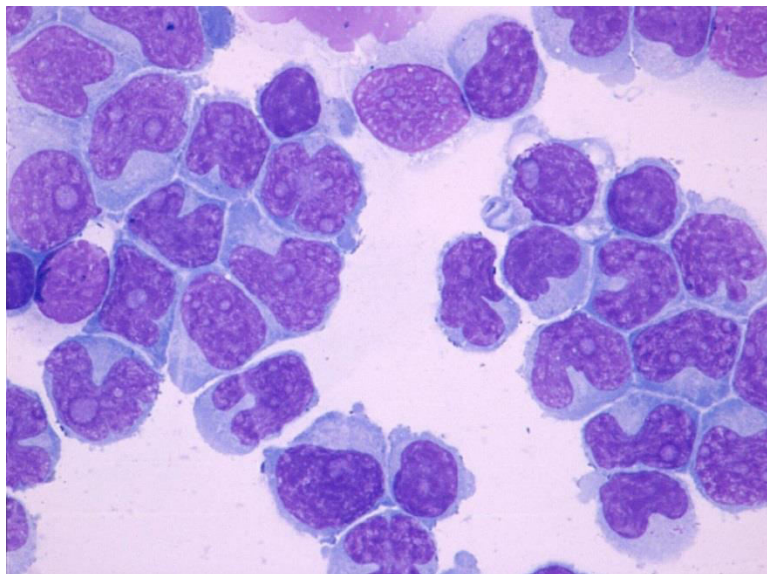
Obr. 45. CD5+ SMZL (SLVL), vilózní lymfocyty, kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



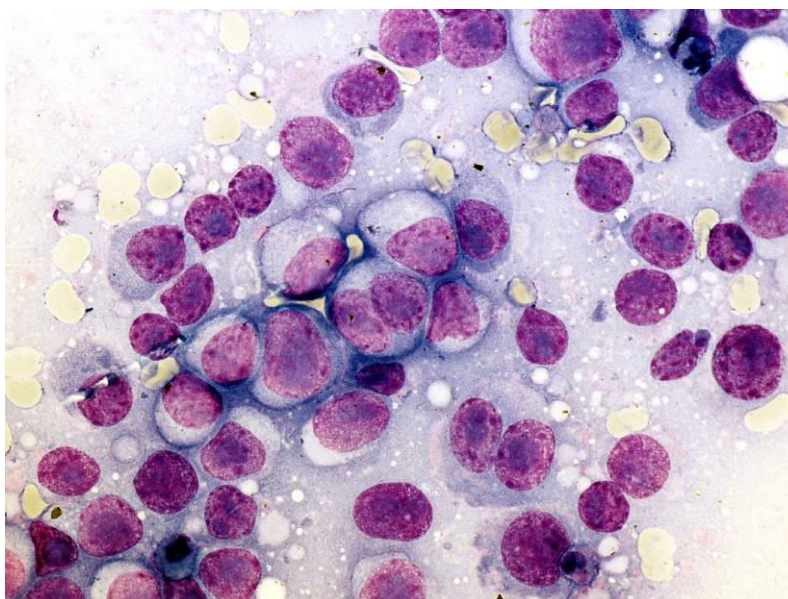
Obr. 46. CD5+ MZL, pleomorfní obraz, kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



Obr. 47. CD5+ MZL, pleomorfní obraz, cytospin cerebrospinálního likvoru, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



Obr. 48. Plazmablastický lymfom jakožto transformace CD5+ MZL, imprint lymfatické uzliny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



7.3.1.4 Cytomorfologie difuzního velkobuněčného B-lymfomu

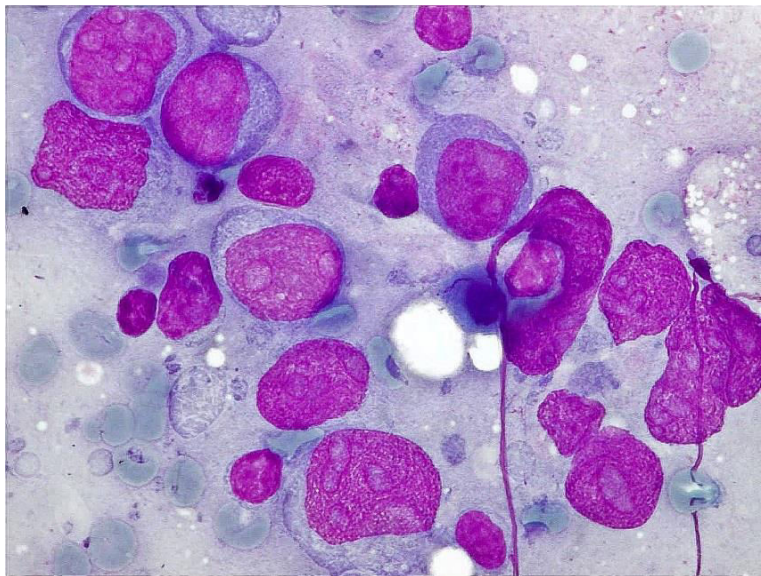
U DLBCL byly vyšetřeny celkem 4 vzorky od 4 pacientů (2 muži a 2 ženy): 1 vzorek periferní krve, 2 vzorky kostní dřeně a 2 vzorky lymfatické uzliny.

Cytomorfologické nálezy dokumentuje tab. 15 a obr. 49 – 53.

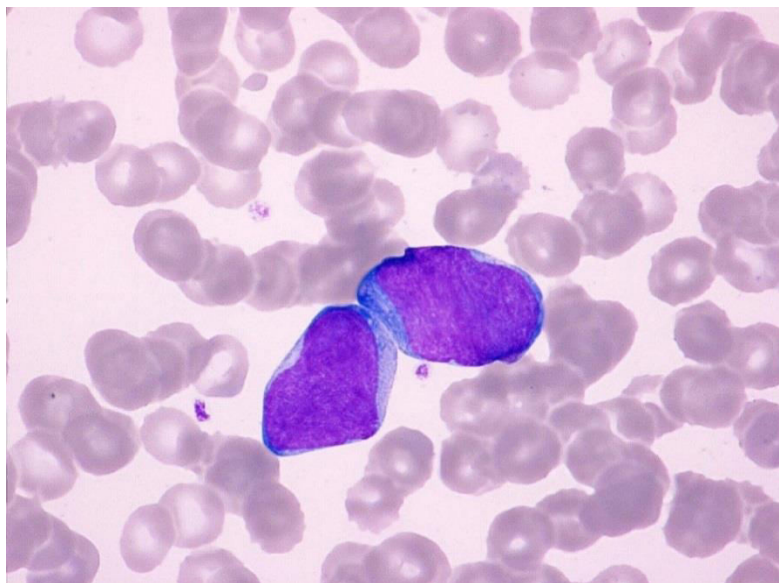
Tab. 15. Cytomorfologie DLBCL

Cytomorfologický typ	Počet vzorků
<i>Centroblastická varianta</i>	2 (50 %)
<i>Imunoblastická varianta</i>	1 (25 %)
<i>Anaplastická varianta</i>	1 (25 %)

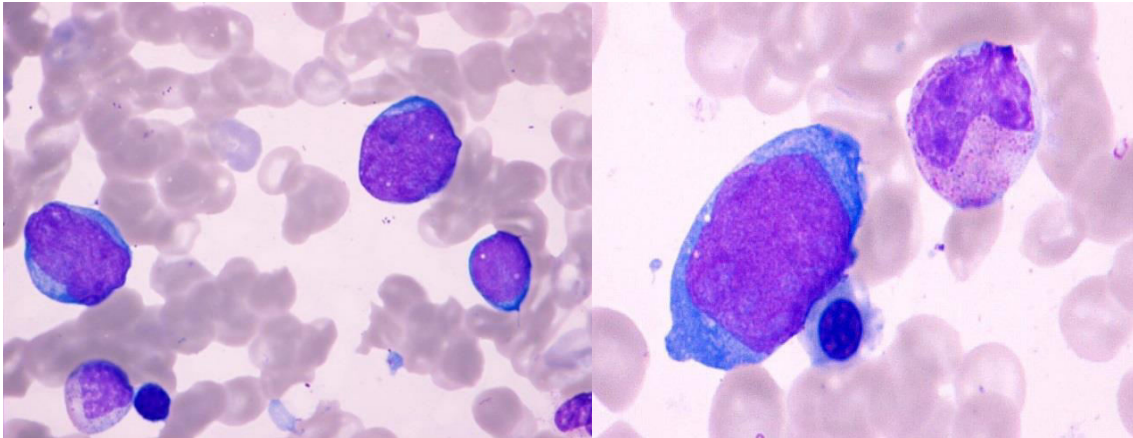
Obr. 49. CD5+ DLBCL, infiltrace lymfatické uzliny převažujícími centroblasty s výraznými jadérky, imprint lymfatické uzliny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



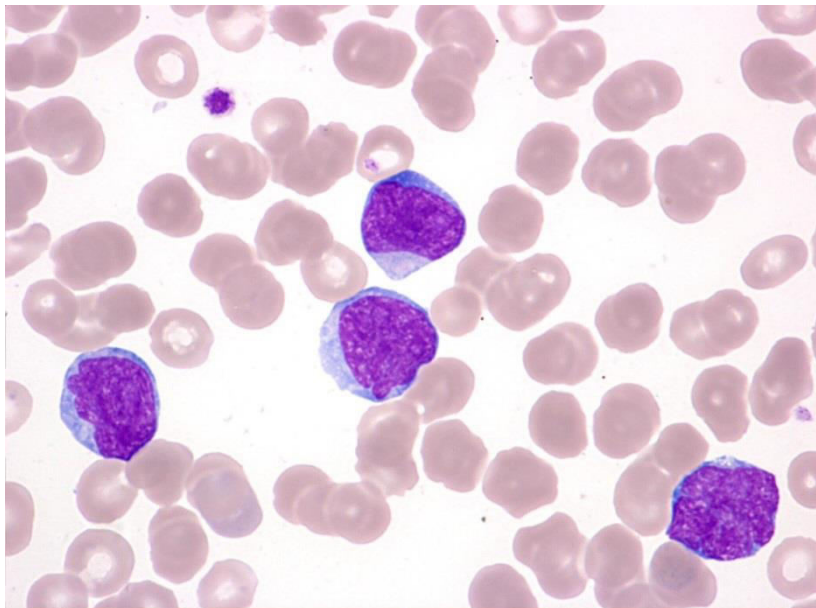
Obr. 50. CD5+ DLBCL, infiltrace imunoblasty, kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



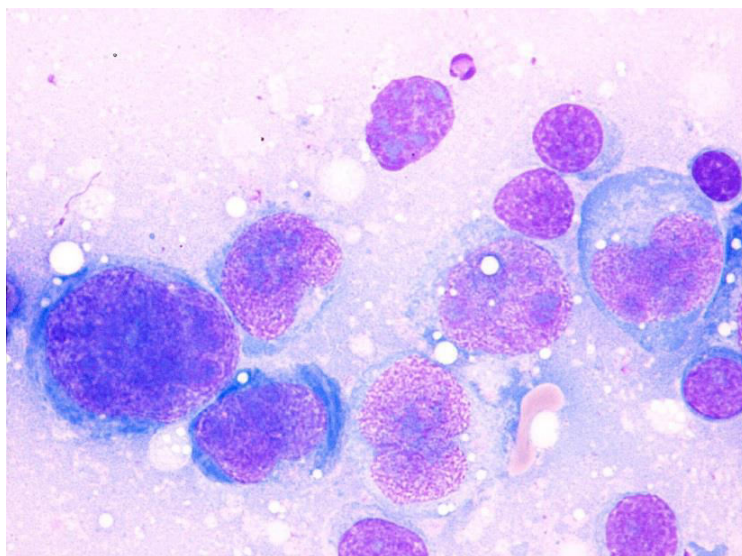
Obr. 51. CD5+ DLBCL, imunoblastická varianta, kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



Obr. 52. CD5+ DLBCL, leukemizace centroblastů, periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



Obr. 53. CD5+ DLBCL, anaplastická varianta, imprint lymfatické uzliny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora



7.3.1.5 Cytomorfologie neklasifikovatelných CD5+ B-lymfoidních neoplázií

V této skupině bylo vyšetřeno celkem 7 vzorků od 7 pacientů (2 muži a 5 žen): 6 vzorků periferní krve, 1 vzorek kostní dřeně.

Cytomorfologické nálezy dokumentuje tab. 16.

Tab. 16. Cytomorfologie ve skupině neklasifikovatelných zralých CD5+ B-lymfoidních neoplázií

Cytomorfologický typ	Počet vzorků
<i>Malobuněčný</i>	4 (57.1 %)
<i>Malobuněčný s plazmocelulární diferenciací</i>	1 (14.3 %)
<i>Středně velké či velké lymfocyty</i>	1 (14.3 %)
<i>Pleomorfní</i>	1 (14.3 %)

7.3.1.6 Výskyt morfologických typů zralých CD5-pozitivních neoplázií

Údaje o výskytu jednotlivých cytomorfologických typů v analyzovaném souboru jsou shrnuty v tab. 17.

Tab. 17. Cytomorfologické typy u zralých CD5+ B-lymfoidních neoplázií (%)

Cytomorfologický typ	CLL	SLL	MCL	CD5+ MZL	CD5+ DLBCL	Neklasifikovatelné CD5+ B-lymfomy
<i>Malobuněčný</i>	53.7	3.0	4.5	2.5	0	2.5
<i>Malobuněčný s prolymfocyty</i>	8.0	0	0	0	0	0
<i>Centrocytoidní</i>	0	0	9.0	0	0	0
<i>Pleomorfní</i>	5.5	0	4.0	1.0	0	0.5
<i>Blastoidní</i>	0	0	2.0	0	1.5	0
<i>Střední/velké lymfocyty</i>	0	0	0.5	1.0	0	0
<i>Vilózní lymfocyty</i>	0	0	0	1.0	0	0
<i>Anaplastický</i>	0	0	0	0	0.5	0

Nejčastějším cytomorfologickým typem v souboru byl typ malobuněčný následovaným typem pleomorfním. Ostatní cytomorfologické typy se vyskytly vzácněji. Malobuněčný typ se vyskytl u všech diagnostických skupin. Pleomorfní typ se vyskytl u všech diagnostických skupin s výjimkou SLL a CD5+ DLBCL. Výskyt ostatních cytomorfologických typů byl limitován – malobuněčný typ s prolymfocyty se vyskytl pouze u CLL, centrocytoidní typ pouze u MCL, blastoidní typ pouze u MCL a CD5+ DLBCL, typ se středními/velkými lymfocyty pouze u MCL a CD5+ MZL, typ s vilózními lymfocyty pouze u CD5+ MZL a anaplastický typ pouze CD5+ DLBCL.

7.3.2 Výsledky analýzy průtokovou cytometrií

7.3.2.1 Imunofenotyp chronické lymfocytární leukémie a lymfomu z malých lymfocytů

U CLL bylo vyšetřeno celkem 167 vzorků od 157 pacientů (100 mužů a 57 žen): 134 vzorky periferní krve, 29 vzorků kostní dřeně, 2 vzorky lymfatické uzliny a 2 vzorky pleurálního punktátu.

Zastoupení CD19+ elementů ve vzorcích CLL bylo následující: minimum 20.4 %, maximum 98.6 %, průměr 71.0 %, medián 76.9 %.

U SLL bylo vyšetřeno celkem 6 vzorků od 3 pacientů (2 muži a 1 žena): 1 vzorek periferní krve, 2 vzorky kostní dřeně a 3 vzorky lymfatické uzliny.

Zastoupení CD19+ elementů ve vzorcích SLL bylo následující: minimum 6.7 %, maximum 85.4 %, průměr 55.4 %, medián 66.5 %.

Údaje o pozitivitě a průměrné intenzitě fluorescence (MFI) jednotlivých diagnostických znaků jsou uvedeny v tab. 18.

Tab. 18. Pozitivita a hodnoty MFI diagnostických markerů u CLL/SLL

Diagnostický znak	Pozitivita - počet vzorků (%)	Minimum MFI	Maximum MFI	Průměr MFI	Medián MFI
CD19	172 (99.4)	459	7151	2373	2096
CD20 (APC-Cy7)	172 (99.4)	109	7178	957	627
CD20 (PerCp-Cy5.5)	172 (99.4)	129	15338	1789	1256
Kappa	80 (50.0)	141	2965	510	390
Lambda	63 (39.4)	141	3085	808	614
Null slg	17 (10.6)	NA	NA	NA	NA
CD22	128 (74.0)	-29	5732	1285	1032
CD79b	76 (43.9)	42	4952	757	576
CD23	142 (82.1)	111	5815	1587	1304
FMC7	5 (2.9)	59	4280	383	267
CD5	173 (100)	480	27322	8548	7476
CD10	0 (0)	-8	673	32	20
CD25	68 (39.3)	51	3570	862	740
CD35	21 (12.1)	79	2680	448	265
CD38	66 (38.2)	1	9060	1167	445
CD43	157 (90.8)	27	5844	2237	2063
CD11c	22 (12.7)	13	1093	240	185
CD95	0 (0)	-27	786	68	43
CD103	0 (0)	99	262	166	159
CD200	170 (98.3)	3	19672	5275	4582

Pozitivita povrchové exprese pan-B markerů CD19 a CD20 byla konstantním rysem téměř všech analyzovaných případů CLL a SLL, intenzita exprese CD20 byla většinou

nízká, medián MFI u CD19 byl cca 2x vyšší než u CD20. Intenzita exprese CD20 se lišila podle použitého fluorochromu. Znak CD22 byl pozitivní u 74.0 % vzorků (většinově nízká úroveň exprese), CD79b se vyskytl u 43.9 % vzorků (většinově nízká úroveň exprese). Při vyšetření exprese povrchových lehkých řetězců imunoglobulinů lehce převažovaly kappa+ případy (50 : 39.4 %), intenzita exprese lehkých řetězců lambda byla vyšší než u lehkých řetězců kappa. U 10.6 % případů nebylo možné vzhledem k extrémně nízké úrovni exprese obou typů lehkých řetězců imunoglobulinů s jistotou rozhodnout, který z nich převažuje (null typ). Znak CD5 měl většinou vysokou úroveň exprese, v souboru se nevyskytl CD5-negativní případ CLL ani SLL. Pozitivita znaku CD23 byla v souboru typická (82.1 % vzorků), negativita tohoto znaku byla na druhou stranu nejčastějším důvodem snížení bodového skóre dle Matutes. FMC7 byl pozitivní pouze u 2.9 % vyšetřených vzorků, podobně nízký výskyt měl znak CD11c (12.7 %). Marker CD43 byl většinově pozitivní (90.8 % vzorků) se střední úrovní exprese. Znak CD10 se nevyskytl u žádného pacienta, stejně tak tomu bylo i u znaků CD95 a CD103. Exprese CD25 byla variabilní (pozitivita u cca 1/3 vzorků, střední intenzita exprese), pozitivita markeru CD35 byla okrajovým jevem. CD38 byl pozitivní u 39.3 % vzorků, zčásti i s vysokou intenzitou exprese. Vysoká úroveň exprese markeru CD200 byla charakteristickým rysem téměř všech vyšetřených případů. Z hodnocení exprese jednotlivých markerů vyplývá, že určitá variabilita intenzity exprese byla obecným rysem i u silně exprimovaných znaků, pro příklad tuto skutečnost dokumentujeme u exprese lehkých řetězců kappa, CD5 a CD200 (obr. 54-56).

CLL skóre bylo následující: hodnota 3 – 9x, hodnota 4 - 38x, hodnota 5 – 120x (podrobně viz tab. 19). Při hodnocení CLL skóre vykazalo 71.9 % případů CLL skóre 5, 22.8 % případů skóre 4 a 5.3 % případů se skóre 3. Tab. 18 podává též přehled o frekvenci atypických imunofenotypů. Ve skupinách s CLL skóre 3, 4 a 5 jsme se zaměřili na expresi znaků CD20, CD22, CD38, CD43 a CD200. Pozorovali jsme zřetelné rozdíly v expresi znaků CD20, CD22 a CD43 ve skupinách s CLL skóre 5, 4 a 3. Vysoká intenzita exprese CD20 a CD22 a negativita CD43 byly podstatně častější u CLL3 než u CLL4 a CLL5. Negativita CD200 se vyskytla pouze u ojedinělých případů se skóre 5, všechny případy se skóre 4 a 3 byly CD200-pozitivní. Výskyt atypií imunofenotypu (CLL skóre 3 a

4 a/nebo vysoká exprese CD20 a/nebo CD22) u CLL byl častější u CLL s atypickou cytomorfolgií (tab. 20).

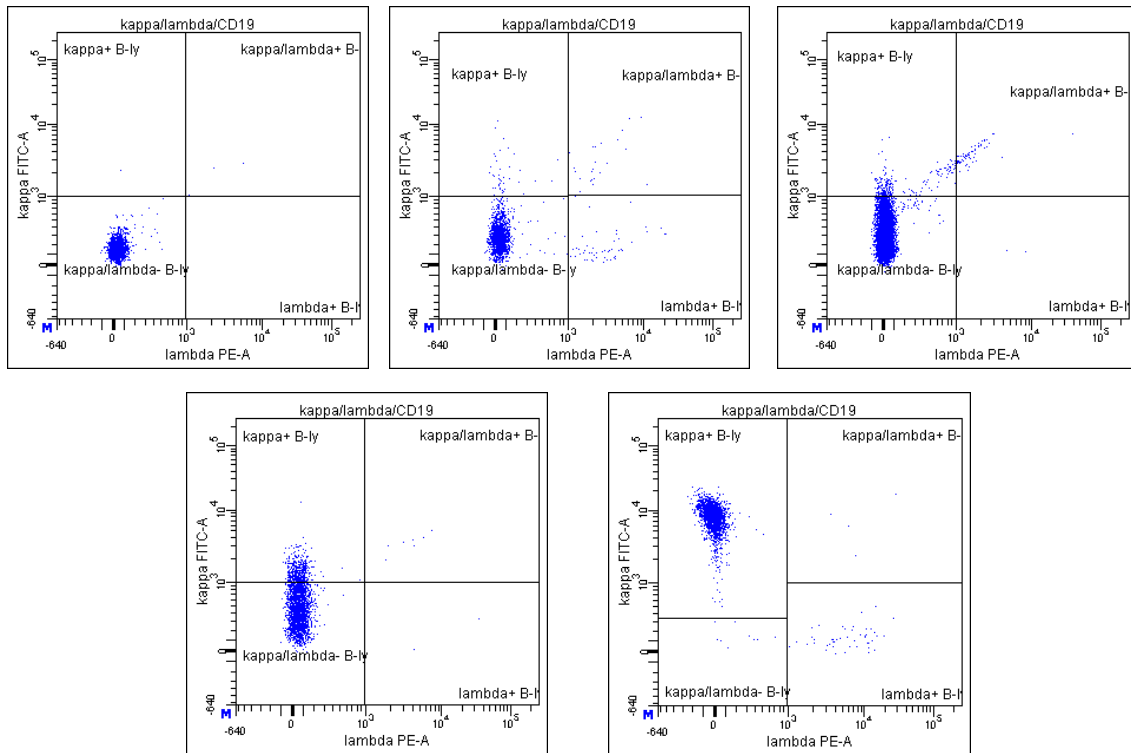
Tab. 19. CLL skóre dle Matutes, frekvence atypických imunofenotypů a exprese CD20, CD43, CD38 a CD200 u CLL

Hodnota CLL skóre	Počet případů (%)	Atypický imunofenotyp	Počet případů (%)	Vysoká exprese CD20 (%)	Vysoká exprese CD22 (%)	Pozitivita CD38 (%)	Negativita CD43 (%)	Negativita CD200 (%)
		Počet případů (%)						
5	71.9		0	5.2	6.7	34.8	1.7	4.3
4	22.8	CD23-	16.7	7.9	15.7	42.2	13.2	0
		Vysoká exprese lambda	5.6					
		FMC7+	1.2					
3	5.3	23- a FMC7+	1.9	77.8	44.4	33.3	66.7	0
		Vysoká exprese CD79b a kappa	1.9					
		CD23- a vysoká exprese lambda	1.2					
		CD23- a vysoká exprese kappa	0.6					

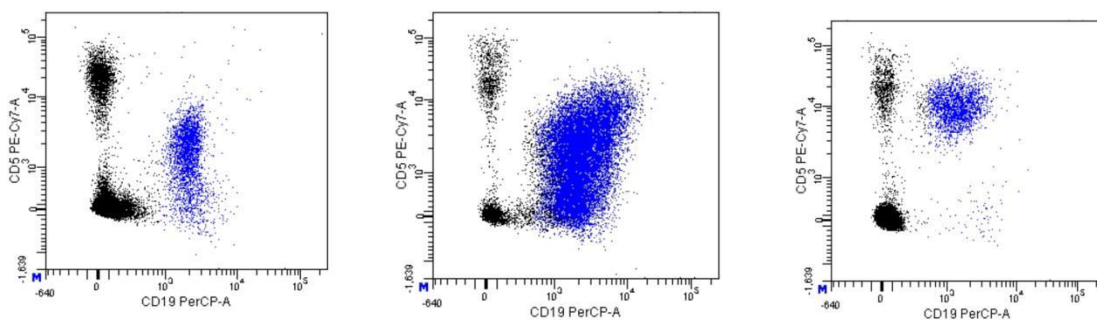
Tab. 20. Souvislost cytomorfolgie CLL s atypii imunofenotypu CLL

Cytomorfolgie CLL	Výskyt (%)	Atypie imunofenotypu (%)
Typická CLL	79.9	31.8
Atypická CLL	20.1	74.1
- CLL/PL	11.9	87.5
- Pleomorfní CLL	8.2	54.5

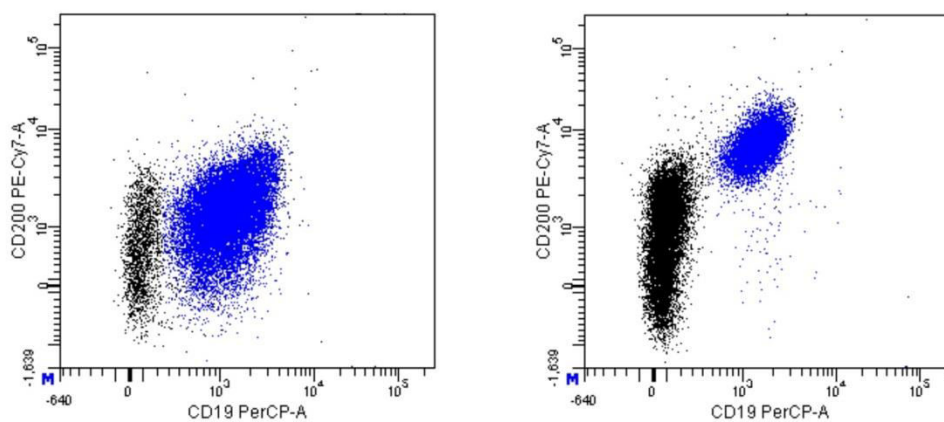
Obr. 54. Variabilita exprese lehkých řetězců kappa u CLL (5 případů CLL, dvouparametrové dot-plot diagramy, exprese lehkých řetězců kappa na svislé ose, gating z B-lymfocytů, logaritmická škála exprese na obou osách), archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.



Obr. 55. Variabilita exprese znaku CD5 u CLL (3 případy CLL, dvouparametrové dot-plot diagramy CD19/CD5, exprese CD5 na svislé ose, gating z lymfocytů, logaritmická škála exprese na obou osách), archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.



Obr. 56. Variabilita exprese znaku CD200 u CLL (2 případy CLL, dvouparametrové dot-plot diagramy CD19/CD200, exprese CD200 na svislé ose, gating z lymfocytů, logaritmičká škála exprese na obou osách), archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.



7.3.2.2 Imunofenotyp lymfomu z plášťových buněk

U MCL bylo vyšetřeno celkem 38 vzorků od 20 pacientů (13 mužů a 7 žen): 15 vzorků periferní krve, 18 vzorků kostní dřeně, 4 vzorky lymfatické uzliny a 1 vzorek cerebrospinálního likvoru.

Zastoupení CD19+ elementů ve vzorcích MCL bylo následující: minimum 5.6 %, maximum 97.9 %, průměr 68.4 %, medián 80.1 %.

Údaje o pozitivitě a průměrné intenzitě fluorescence jednotlivých diagnostických znaků jsou uvedeny v tab. 21.

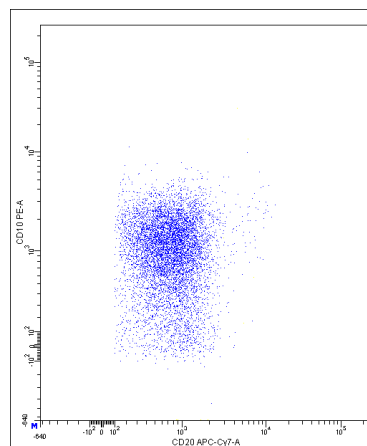
Tab. 21. Pozitivita a hodnoty MFI diagnostických markerů u MCL

Diagnostický znak	Pozitivita - počet vzorků (%)	Minimum MFI	Maximum MFI	Průměr MFI	Medián MFI
CD19	38 (100.0)	767	5563	1997	1589
CD20 (APC-Cy7)	38 (100.0)	866	16894	6194	12922
CD20 (PerCp-Cy5.5)	38 (100.0)	2158	30941	12922	11672
Kappa	11 (55.0)	251	8309	2421	1925
Lambda	9 (45.0)	602	30499	6816	3711
CD22	36 (94.7)	210	32090	3266	2125
CD79b	37 (97.4)	658	12120	3270	2617
CD23	0 (0)	-38	517	129	89
FMC7	32 (84.2)	174	13454	3596	2368
CD5	32 (84.2)	214	17658	5128	5369
CD10	1 (2.6)	-118	1116	47	19
CD25	25 (65.8)	17	3980	1165	946
CD35	20 (52.6)	157	6336	1390	1067
CD38	31 (81.6)	84	30759	7593	5598
CD43	10 (26.3)	0	5106	973	579
CD11c	3 (7.9)	-51	868	99	46
CD95	0 (0)	10	264	82	71
CD103	0 (0)	98	785	218	183
CD200	3 (7.9)	109	3118	696	530

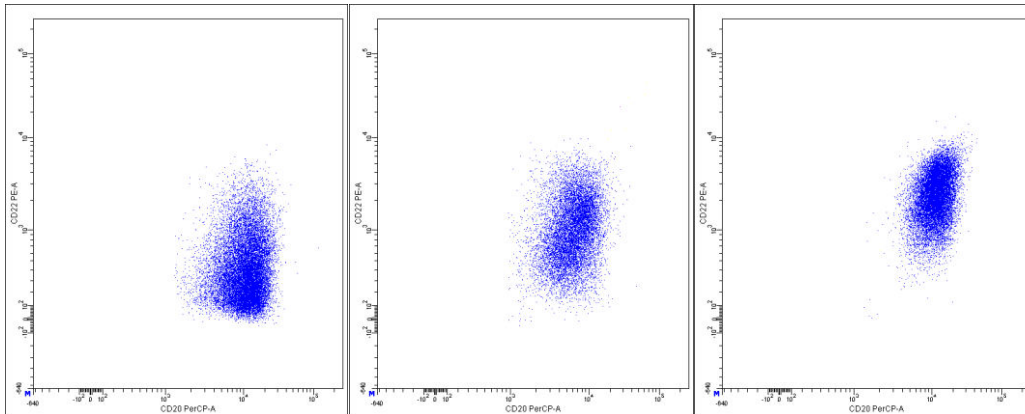
Pozitivita povrchové exprese pan-B markerů CD19, CD20, CD22 a CD79b s vysokou intenzitou byla konstantním rysem u 94.7 – 100 % analyzovaných vzorků MCL. Nejvyšší intenzitu exprese z nich vykazoval znak CD20 (medián MFI více než 4x vyšší než u CD22 a CD79b a 8x vyšší než u CD19). Intenzita exprese CD20 se lišila podle použitého fluorochromu. Při vyšetření exprese povrchových lehkých řetězců imunoglobulinů lehce převažovaly kappa+ případy (55 : 45 %), intenzita exprese lehkých řetězců lambda byla zřetelně vyšší než u lehkých řetězců kappa (2x vyšší medián MFI). V jednom ze vzorků periferní krve nebylo možné určit dominující lehký řetězec (null typ), ve vzorku kostní dřeně téhož pacienta však byla prokázána dominance lehkých řetězců lambda (případ zařazen jako typ lambda). Znak CD5 měl většinou vysokou

úroveň exprese, ovšem i v našem souboru jsme pozorovali tři CD5-negativní případy (6 vzorků) MCL. FMC7 byl pozitivní u většiny případů a vykazoval velmi variabilní úroveň exprese. Marker CD43 byl většinou negativní. Pozitivita znaku CD23 se nevyskytla u žádného pacienta, stejně tak tomu bylo i u znaků CD11c, CD95 a CD103. Exprese CD25 byla variabilní (pozitivita u 2/3 vzorků), marker CD35 byl pozitivní u poloviny vzorků (většinou nižší úroveň exprese). CD38 byl většinou pozitivní s vysokou intenzitou exprese. Vzácná byla pozitivita CD10 s nízkou úrovní exprese u jediného z případů (obr. 57). S pozitivitou CD200 jsme se setkali pouze u 2 případů (3 vzorků) (jeden případ s vysokou a jeden případ s nižší úrovní exprese, viz níže). CLL skóre bylo následující: hodnota 0 - 5x, hodnota 1 - 20x, hodnota 2 - 9x, hodnota 3 - 3x, hodnota 4 - 1x. Z hodnocení exprese jednotlivých markerů vyplývá, že variabilita intenzity exprese byla obecným rysem i u silně exprimovaných znaků (obr. 58-60). Pozoruhodné bylo, že jeden z případů MCL vykazoval imunofenotyp příznačný pro CLL (CD19+CD5+CD23-CD79b-dimFMC7-CD200+lambda-dim, skóre 4 dle Matutes), v jiném z případů byl imunofenotyp velmi blízký CD5-negativnímu lymfomu z marginální zóny. Oba tyto případy se vyznačovaly přítomností znaku CD200.

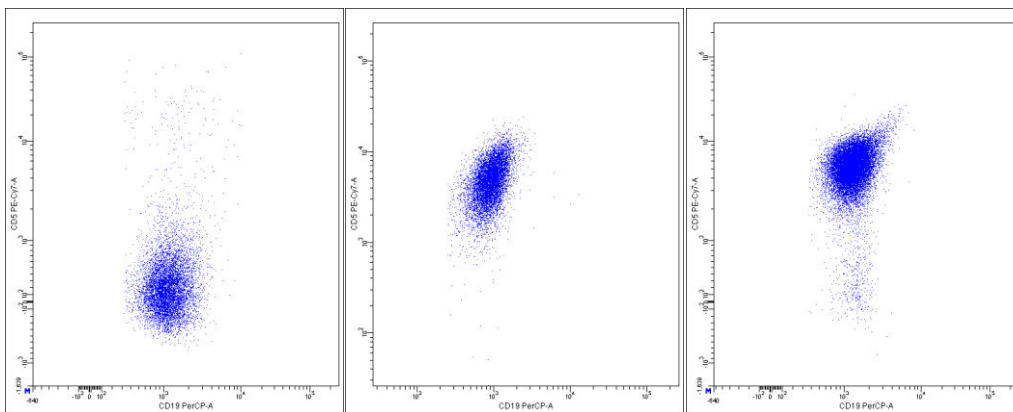
Obr. 57. Pozitivita CD10 u MCL (dvouparametrové dot plot diagramy, CD20 na vodorovné a CD10 na svislé ose, gating z B-lymfocytů, logaritmická škála exprese na obou osách), archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.



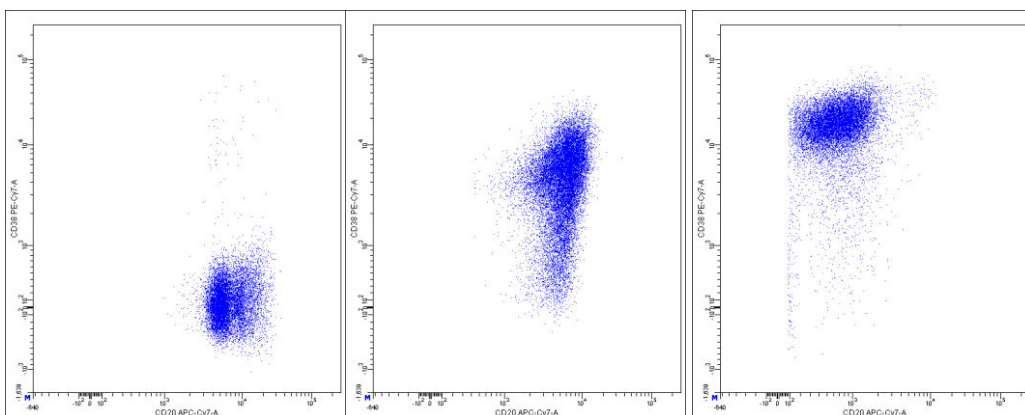
Obr. 58. Variabilita exprese znaků CD20 a CD22 (dvouparmetrové dot plot diagramy, CD20 na vodorovné a CD22 na svislé ose, gating z B-lymfocytů, logaritmická škála exprese na obou osách), archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.



Obr. 59. Variabilita exprese znaku CD5 (dvouparmetrové dot plot diagramy, CD19 na vodorovné a CD5 na svislé ose, gating z B-lymfocytů, logaritmická škála exprese na obou osách), archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.



Obr. 60. Variabilita exprese znaků CD20 a CD38 (dvouparmetrové dot plot diagramy, CD20 na vodorovné a CD38 na svislé ose, gating z B-lymfocytů, logaritmická škála exprese na obou osách), archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.



7.3.2.3 Imunofenotyp CD5+ lymfomu z marginální zóny

U CD5+ MZL bylo vyšetřeno celkem 11 vzorků od 7 pacientů (4 muži a 3 ženy): 5 vzorků periferní krve, 4 vzorky kostní dřeně, 1 vzorek lymfatické uzliny a 1 vzorek cerebrospinálního likvoru.

Zastoupení CD19+ elementů ve vzorcích CD4+ MZL bylo následující: minimum 17.3 %, maximum 88.2 %, průměr 48.9 %, medián 46.2 %.

Údaje o pozitivitě a průměrné intenzitě fluorescence jednotlivých diagnostických znaků jsou uvedeny v tab. 22.

Tab. 22. Pozitivita a hodnoty MFI diagnostických markerů u CD5+ MZL

Diagnostický znak	Pozitivita - počet vzorků (%)	Minimum MFI	Maximum MFI	Průměr MFI	Medián MFI
CD19	11 (100.0)	1300	5698	2775	2619
CD20 (APC-Cy7)	11 (100.0)	252	13046	5758	4912
CD20 (PerCp-Cy5.5)	11 (100.0)	446	15318	10197	11225
Kappa	6 (85.7)	544	22142	4792	1626
Lambda	1 (14.3)	3140	3140	3140	3140
CD22	10 (90.9)	460	7243	2597	1651
CD79b	11 (100.0)	1453	28441	8425	4304
CD23	0 (0)	56	261	121	99
FMC7	7 (63.6)	379	6517	2697	1993
CD5	10 (90.9)	464	18036	5027	1720
CD10	0 (0)	4	52	30	29
CD25	6 (54.5)	671	4912	1515	826
CD35	2 (18.2)	153	3819	868	566
CD38	4 (36.3)	-62	9665	1580	506
CD43	1 (9.1)	7	1212	324	175
CD11c	5 (45.4)	121	1453	312	163
CD95	2 (18.2)	7	2836	602	118
CD103	0 (0)	121	388	226	210
CD200	7 (63.6)	192	7198	3327	2037

Pozitivita povrchové exprese pan-B markerů CD19, CD20, CD22 a CD79b byla konstantním rysem téměř všech analyzovaných případů CD5+ MZL. Intenzita exprese CD20 byla vysoká, násobně převyšující expresi ostatních pan-B znaků. Intenzita exprese CD20 se lišila podle použitého fluorochromu. Při vyšetření exprese povrchových lehkých řetězců imunoglobulinů výrazně převažovaly kappa+ případy (86 : 14 %), intenzita exprese lehkých řetězců lambda byla o něco vyšší než u lehkých řetězců kappa. Null typ exprese povrchových lehkých řetězců imunoglobulinů nebyl pozorován. Znak CD5 měl většinou střední úroveň exprese, do souboru nebyly zařazeny CD5-negativní případy MZL s výjimkou vzorku periferní krve nemocné s pozitivitou znaku CD5 na neoplastických buňkách kostní dřeně a lymfatické uzliny. Znak CD23 se nevyskytl u žádného z vyšetřených vzorků stejně jako markery CD10 a CD103. FMC7 byl pozitivní u 63.6 % vzorků převážně se střední úrovní exprese. Marker CD38 byl pozitivní u 36.3 % vzorků s poměrně variabilní intenzitou exprese. Podobně tomu bylo u znaku CD25, který byl ovšem exprimován u 54.5 %. CD11c byl přítomen u 45.4 % vzorků, úroveň exprese byla nízká. Vzácně se vyskytla pozitivita CD95, CD35 a CD43. Marker CD200 byl přítomen u 63.6 % vzorků s většinou střední úrovní exprese. CLL skóre u kategorie CD5+ MZL bylo následující: hodnota 1 – 5x, hodnota 2 - 6x.

7.3.2.4 Imunofenotyp CD5+ difuzního velkobuněčného B-lymfomu

U CD5+ DLBCL byly vyšetřeny celkem 4 vzorky od 4 pacientů (2 muži a 2 ženy): 1 vzorek periferní krve, 2 vzorky kostní dřeně a 2 vzorky lymfatické uzliny.

Zastoupení CD19+ elementů ve vzorcích CD5+ DLBCL bylo následující: minimum 12.7 %, maximum 79.4 %, průměr 38.1 %, medián 30.2 %.

Údaje o pozitivitě a průměrné intenzitě fluorescence jednotlivých diagnostických znaků jsou uvedeny v tab. 23.

Tab. 23. Pozitivita a hodnoty MFI diagnostických markerů u CD5+ DLBCL

Diagnostický znak	Pozitivita - počet vzorků (%)	Minimum MFI	Maximum MFI	Průměr MFI	Medián MFI
CD19	4 (100.0)	1663	5702	3174	2666
CD20 (APC-Cy7)	3 (75.0)	-102	6587	4152	4235
CD20 (PerCp-Cy5.5)	4 (100.0)	658	14279	7654	7839
Kappa	4 (100.0)	1771	6348	5049	5624
Lambda	0 (0)				
CD22	4 (100.0)	2502	7411	4501	4045
CD79b	4 (100.0)	3963	12055	7995	7980
CD23	0 (0)	130	318	205	188
FMC7	3 (75.0)	747	4763	1974	1193
CD5	4 (100.0)	895	14069	7530	7578
CD10	1 (25.0)	-78	1011	358	250
CD25	3 (75.0)	335	2718	1232	937
CD35	1 (25.0)	375	1399	740	593
CD38	3 (75.0)	981	26915	12178	10407
CD43	1 (25.0)	0	9740	2531	192
CD11c	0 (0)	347	649	536	574
CD95	2 (50.0)	230	1189	785	861
CD103	0 (0)	102	800	295	139
CD200	3 (75.0)	889	6198	2582	1621

Pozitivita povrchové exprese pan-B markerů CD19, CD20, CD22 a CD79b byla konstantním rysem téměř všech analyzovaných případů CD5+ DLBCL, nejintenzivnější byla exprese u CD20 a CD79b, nejnižší u CD19. Intenzita exprese CD20 se lišila podle použitého fluorochromu. Všechny případy byly kappa+. Znak CD5 měl většinou vysokou úroveň exprese. Znak CD23 se nevyskytl u žádného z vyšetřených vzorků stejně jako markery CD11c a CD103. 75 % vzorků bylo pozitivní na FMC7 (převážně střední úroveň exprese), CD38 (vysoká intenzita exprese), CD25 (nízká úroveň exprese) a CD200 (většinou střední úroveň exprese). U 50 % vzorků byla pozorována exprese CD95 (nízká úroveň exprese). Znak CD43 se vyskytl vzácně stejně jako CD10 a CD35. CLL skóre u kategorie DLBCL bylo následující: hodnota 1 – 3x, hodnota 2 - 1x.

Výpovědní hodnota analýzy byla limitována malým počtem případů CD5+ DLBCL v souboru.

7.3.2.5 Imunofenotyp neklasifikovatelných CD5+ B-lymfoidních neoplázií

V této skupině bylo vyšetřeno celkem 7 vzorků od 7 pacientů (2 muži a 5 žen): 6 vzorků periferní krve, 1 vzorek kostní dřeně.

Zastoupení CD19+ elementů ve vzorcích neklasifikovatelných zralých CD5+ lymfoidních neoplázií bylo následující: minimum 11.1 %, maximum 54.0 %, průměr 45.6 %, medián 50.8 %.

Údaje o pozitivitě a průměrné intenzitě fluorescence jednotlivých diagnostických znaků jsou uvedeny v tab. 24.

Tab. 24. Pozitivita a hodnoty MFI diagnostických markerů u neklasifikovatelných případů

Diagnostický znak	Pozitivita - počet vzorků (%)	Minimum MFI	Maximum MFI	Průměr MFI	Medián MFI
CD19	7 (100.0)	881	6340	3088	2038
CD20 (APC-Cy7)	7 (100.0)	1031	9786	4700	4961
CD20 (PerCp-Cy5.5)	7 (100.0)	4939	18237	9936	8612
Kappa	6 (85.7)	635	5271	2297	2150
Lambda	1 (14.3)	8690	8690	8690	8690
CD22	7 (100.0)	1671	7240	3651	2617
CD79b	7 (100.0)	2001	9194	4929	4026
CD23	1 (14.3)	0	1003	279	104
FMC7	5 (71.4)	280	8545	2341	1324
CD5	7 (100.0)	1760	12384	6805	5334
CD10	0 (0)	13	31	21	23
CD25	5 (71.4)	629	2087	1271	1245
CD35	3 (42.9)	305	2172	1041	716
CD38	1 (14.3)	73	3405	766	339
CD43	0 (0)	0	921	335	321
CD11c	0 (0)	90	324	216	218
CD95	0 (0)	4	163	85	96
CD103	0 (0)	111	380	218	166
CD200	5 (71.4)	532	5283	2531	2101

Interpretace nálezů analýzy imunofenotypu průtokovou cytometrií v této skupině byla komplikována faktem, že šlo s největší pravděpodobností o směs různých diagnostických entit. Do této skupiny mohly být zařazeny případy atypické CLL, leukemizovaného MCL, CD5+ MZL, CD5+ LPL či spíše zcela teoreticky CD5+CD10- FL. Z tohoto důvodu zde není podán popis charakteristických rysů imunofenotypu v této skupině.

7.3.2.6 Hodnoty CLL skóre u jednotlivých diagnostických skupin

Přehled hodnot CLL skóre u jednotlivých diagnostických skupin podává tab. 25.

Tab. 25. CLL skóre u diagnostických skupin

CLL skóre	0	1	2	3	4	5
Diagnostická kategorie zralých CD5+ B-lymfoidních neoplázií	Počet vzorků	Počet vzorků	Počet vzorků	Počet vzorků	Počet vzorků	Počet vzorků
<i>CLL</i>	0	0	0	9	38	120
<i>SLL</i>	0	0	0	0	2	4
<i>MCL</i>	5	20	9	3	1	0
<i>CD5+ MZL</i>	0	5	6	0	0	0
<i>CD5+ DLBCL</i>	0	3	1	0	0	0
<i>Neklasifikovatelné</i>	0	4	2	1	0	0

U vzorků CLL a SLL drtivě převažovaly hodnoty CLL skóre 4 a 5, pouze 5 % vzorků vykázalo skóre 3.

U vzorků MCL, CD5+ MZL, CD5+ DLBCL a neklasifikovatelných zralých CD5+ B-lymfoidních neoplázií výrazně převažovaly hodnoty CLL skóre 0-2, u MCL se výjimečně vyskytlo CLL skóre 3 a 4, ve skupině neklasifikovatelných případů pak skóre 3.

7.3.2.7 Srovnání imunofenotypových rysů mezi jednotlivými diagnostickými entitami na základě MFI

7.3.2.7.1 Selekcce případů pro komparaci

Imunofenotypové rysy jednotlivých diagnostických skupin byly porovnány na základě povrchové exprese analyzovaných markerů hodnocené pomocí MFI. Po předchozím

vyhodnocení rozdílů MFI analyzovaných znaků mezi jednotlivými kompartmenty u CLL (periferní krev, kostní dřeň, lymfatická uzlina), které neprokázalo statisticky významné rozdíly v jejich expresi, byl pro srovnání vybrán vždy jeden vzorek od každého nemocného, většinou šlo o vzorky periferní krve. Komparace se týkala diagnostických skupin CLL + SLL (včetně rozdílů mezi podskupinami s CLL skóre 4+5 a 3), MCL a CD5+ MZL. Případy CD5+ DLBCL nebyly do srovnání zařazeny vzhledem k jejich nízkému počtu stejně jako případy neklasifikovatelné z důvodu neznámé konečné diagnózy.

7.3.2.7.2 Srovnání CLL/SLL a MCL

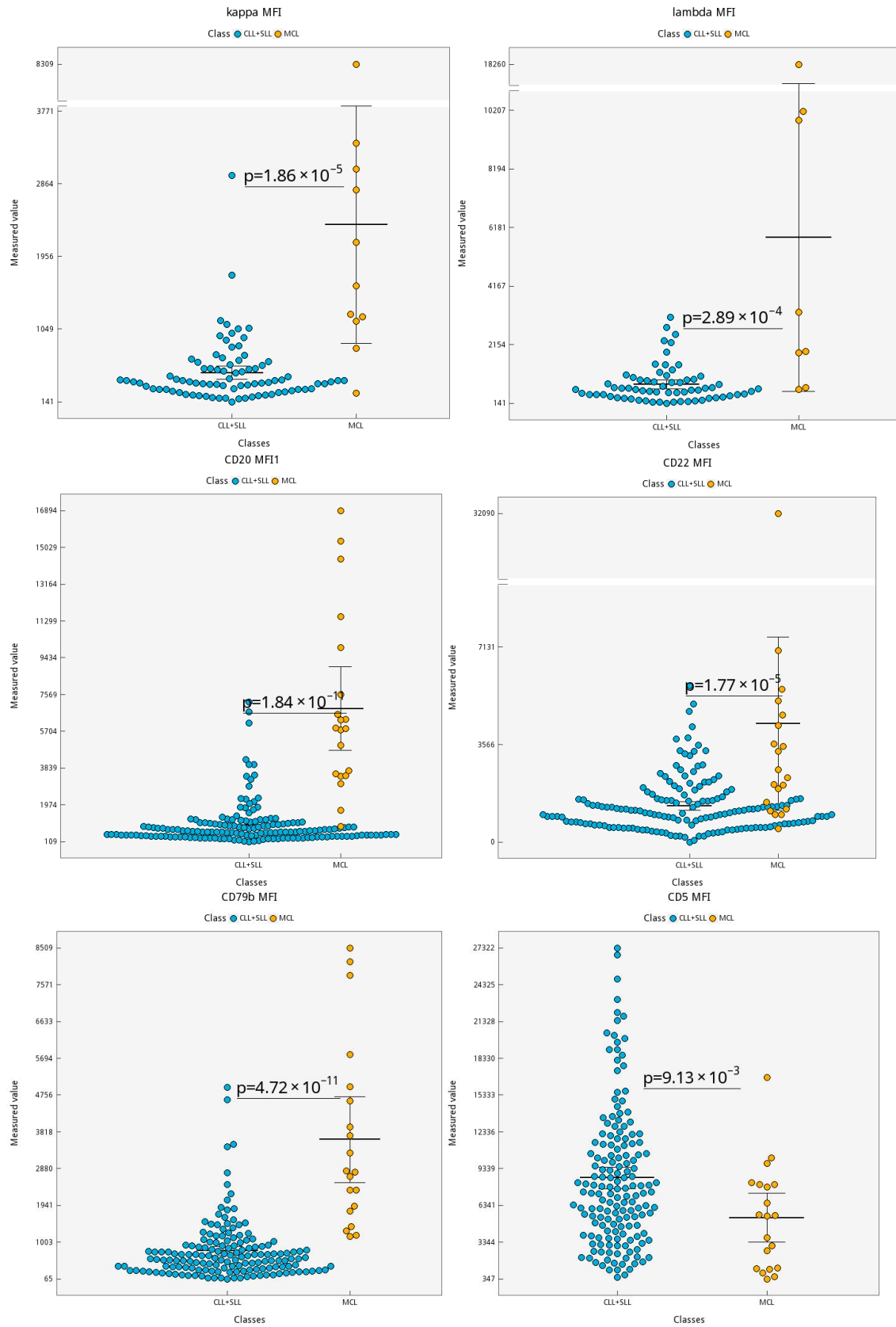
Při srovnání intenzity exprese analyzovaných markerů mezi CLL/SLL a MCL byla u CLL/SLL prokázána vyšší intenzita exprese znaků CD23, CD200, CD43, CD11c a CD5 a nižší intenzita exprese znaků CD20, CD79b, FMC7, CD35, CD38, CD22 a lehkých řetězců kappa než u MCL (tab. 26). Rozdíly v intenzitě exprese ostatních vyšetřovaných markerů nebyly statisticky významné.

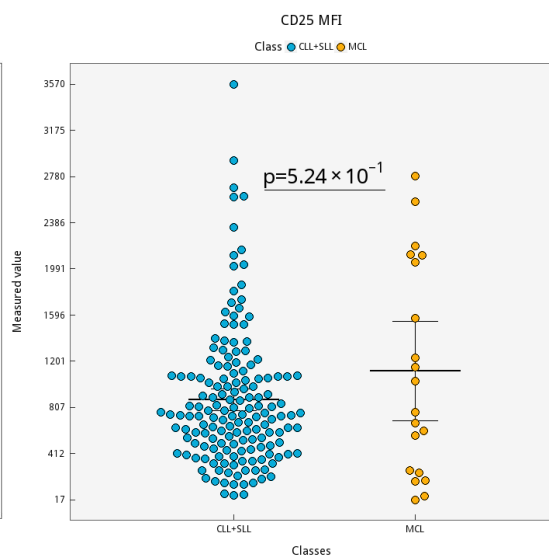
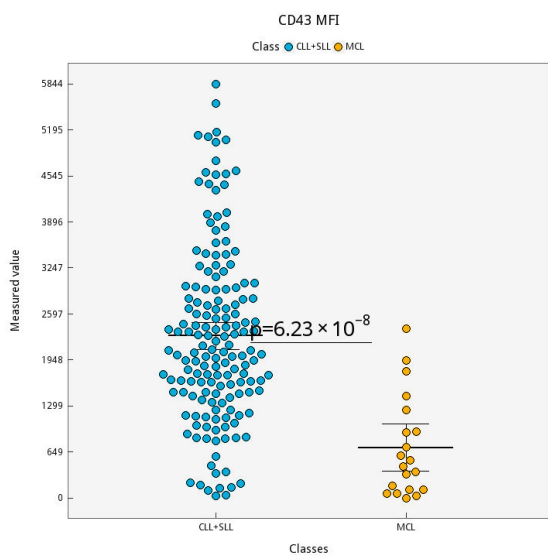
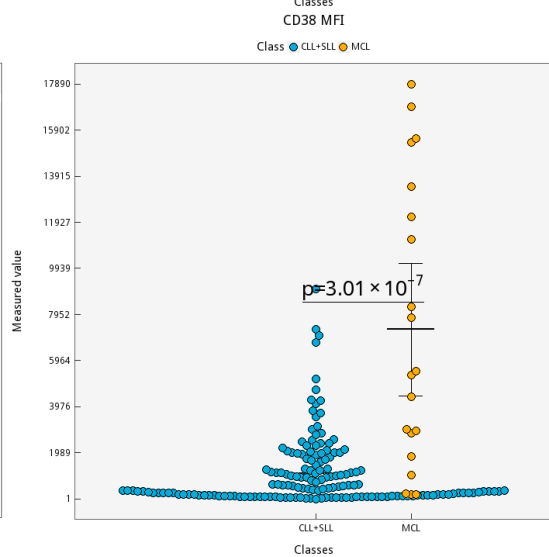
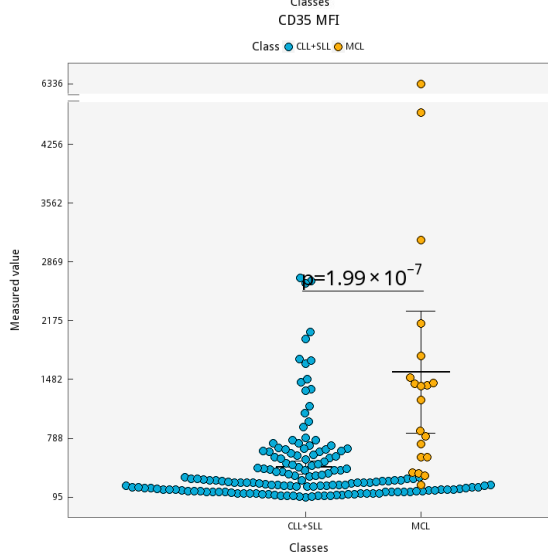
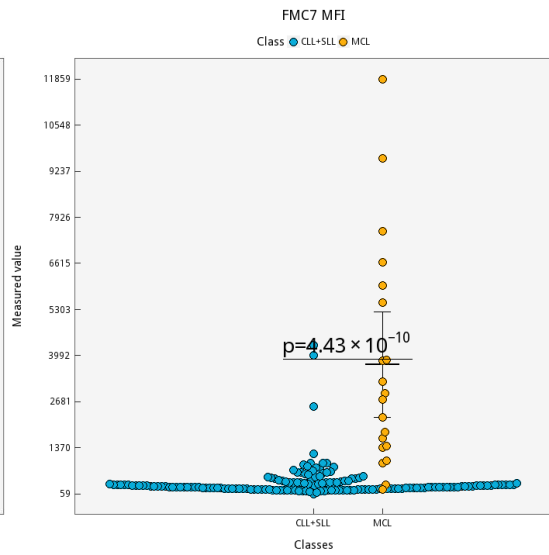
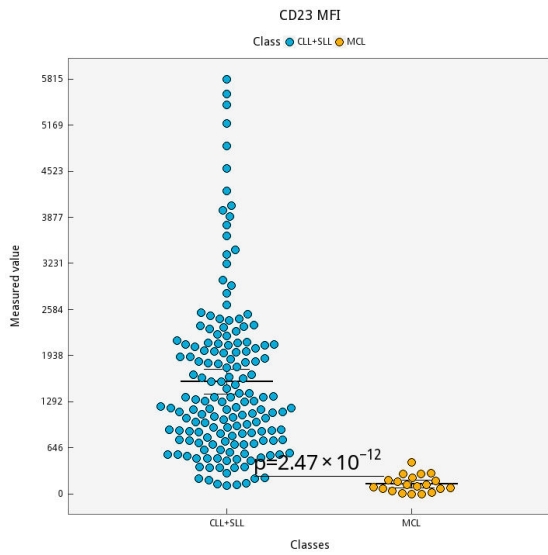
Tab. 26. Markery se statisticky významnými rozdíly MFI mezi CLL/SLL a MCL

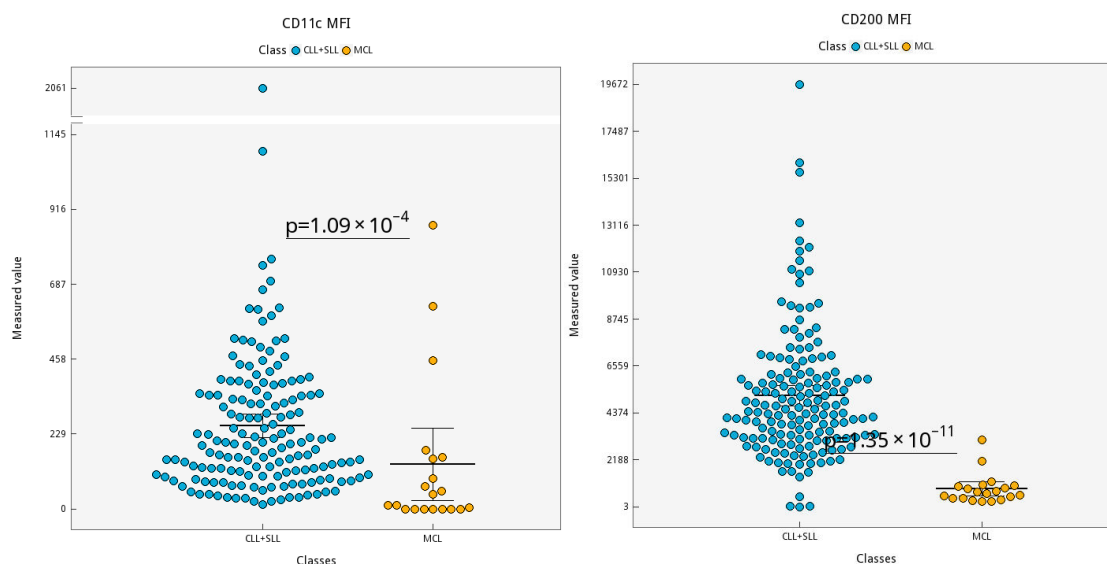
Wilcoxonův test			Lineární ddCq (95 % interval spolehlivosti - CI)					
Znak	p-hodnota	B-Hochberg	CLL/SLL			MCL		
			Průměr	CI _{dolní}	CI _{horní}	Průměr	CI _{dolní}	CI _{horní}
CD23	2.55x10 ⁻¹²	3.57x10 ⁻¹¹	1574	1396.28	1751.72	138.1	86.57	189.63
CD200	1.41x10 ⁻¹¹	8.94x10 ⁻¹¹	5150	4680.36	5619.64	822.3	518.83	1125.77
CD20	1.91x10 ⁻¹¹	8.94x10 ⁻¹¹	955.1	784.51	1125.69	6852	4865.05	8838.95
CD79b	4.72x10 ⁻¹¹	1.65x10 ⁻¹⁰	777.7	661.81	893.59	3622	2597.71	4646.29
FMC7	4.69x10 ⁻¹⁰	1.31x10 ⁻⁹	390	312.77	467.23	3730	2328.35	5131.65
CD43	6.73x10 ⁻⁸	1.57x10 ⁻⁷	2283	2088.24	2477.76	709	397.85	1020.15
CD35	2.16x10 ⁻⁷	4.31x10 ⁻⁷	445.3	370.35	520.25	1565	890.87	2239.13
CD38	2.96x10 ⁻⁷	5.18x10 ⁻⁷	1089	854.4	1323.6	7301	4621.92	9980.08
CD22	1.75x10 ⁻⁵	2.72x10 ⁻⁵	1320	1164.37	1475.63	4329	1363.27	7294.73
CD11c	1.05x10 ⁻⁴	1.47x10 ⁻⁴	254.5	218.06	290.94	136	31.93	240.07
CD5	9.87x10 ⁻³	1.26x10 ⁻²	8562	7680.31	9443.69	5332	3478.36	7185.64
Kappa	4x10 ⁻²	4.67x10 ⁻²	258.1	199.48	316.72	1294	417.15	2170.85

Obr. 61 ukazuje distribuci hodnot MFI analyzovaných markerů u porovnávaných diagnostických skupin.

Obr. 61. Distribuce hodnot MFI u lehkých řetězců kappa a lambda, znaků CD20, CD22, CD79b, CD5, CD23, FMC7, CD35, CD38, CD43, CD25, CD11c a CD200; diagramy typu box-plot, diagnostická kategorie na ose x, hodnoty MFI na ose y (CLL/SLL vs. MCL)







7.3.2.7.3 Srovnání CLL/SLL a CD5+ MZL

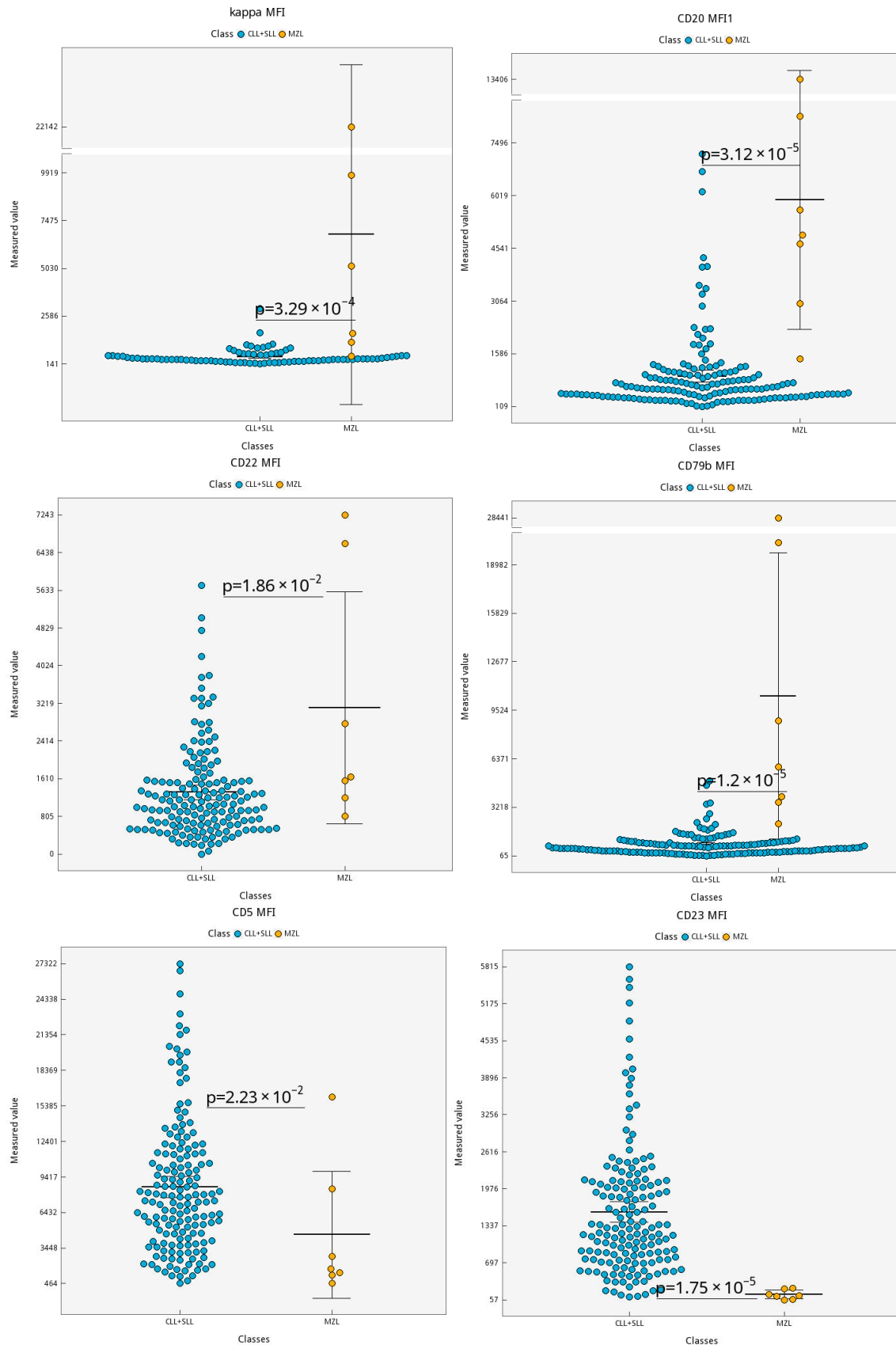
Při srovnání intenzity exprese analyzovaných markerů mezi CLL/SLL a CD5+ MZL byla u CLL/SLL prokázána vyšší intenzita exprese znaků CD23, CD43 a CD5 a nižší intenzita exprese znaků CD20, CD79b, FMC7, CD22, CD35 a lehkých řetězců kappa než u CD5+ MZL (tab. 27). Rozdíly v intenzitě exprese ostatních vyšetřovaných markerů nebyly statisticky významné.

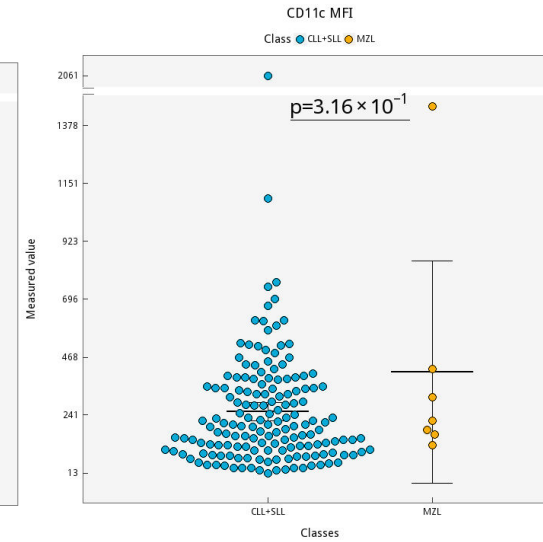
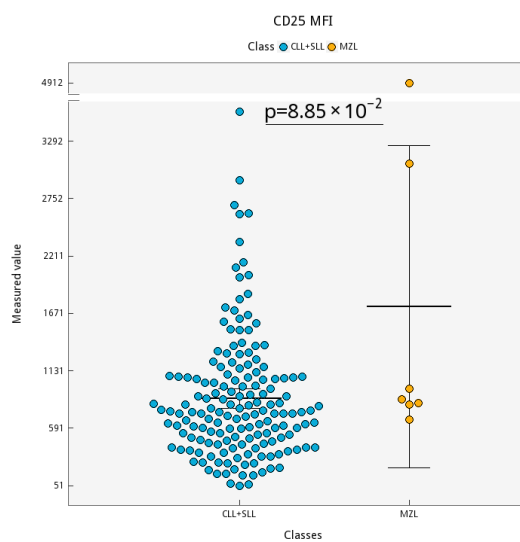
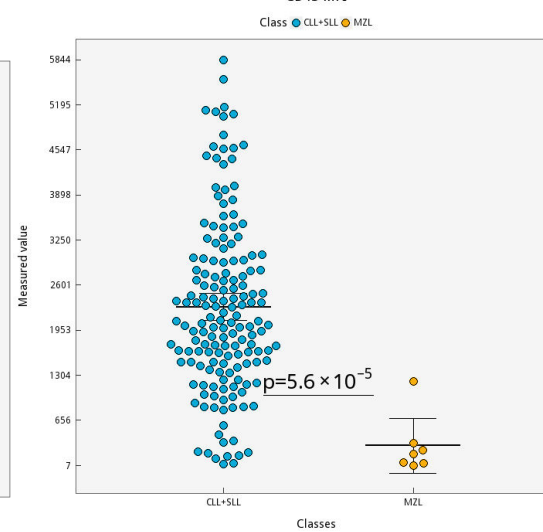
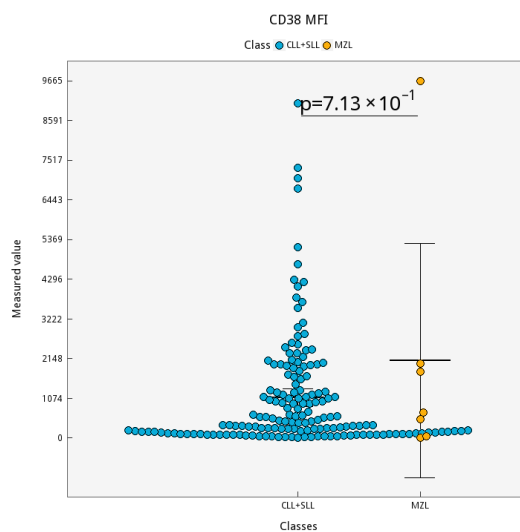
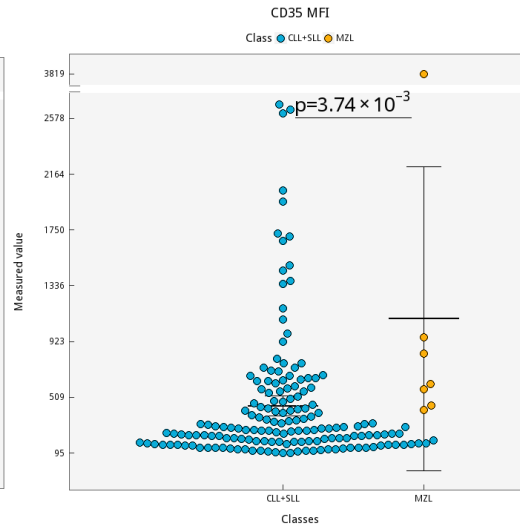
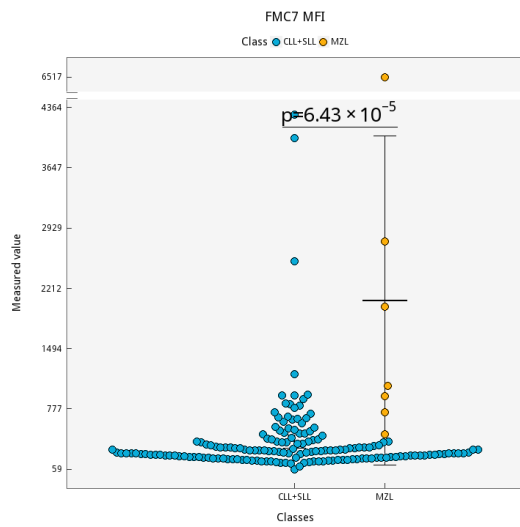
Tab. 27. Markery se statisticky významnými rozdíly MFI mezi CLL/SLL a CD5+ MZL

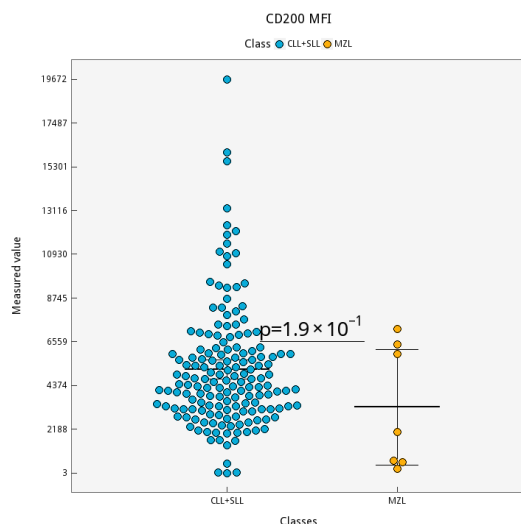
Wilcoxonův test			Lineární ddCq (95 % interval spolehlivosti - CI)					
Znak	p-hodnota	B-Hochberg	CLL/SLL			CD5+ MZL		
			Průměr	CI _{dolní}	CI _{horní}	Průměr	CI _{dolní}	CI _{horní}
CD79b	1.2×10^{-5}	1.24×10^{-4}	777.7	661.81	893.59	10440	2988.89	17891.11
CD23	1.77×10^{-5}	1.24×10^{-4}	1574	1396.28	1751.72	144.9	84.02	205.78
CD20	3.15×10^{-5}	1.47×10^{-4}	955.1	784.51	1125.69	5899	2987.04	8810.96
CD43	5.68×10^{-5}	1.83×10^{-4}	2283	2088.24	2477.76	289.9	-23.68	603.48
FMC7	6.52×10^{-5}	1.83×10^{-4}	390	312.77	467.23	2067	496.93	3637.07
Kappa	5.19×10^{-4}	1.21×10^{-3}	258.1	199.48	316.72	5798	-115.2	11711.2
CD35	3.87×10^{-3}	7.74×10^{-3}	445.3	370.35	520.25	1092	189.7	1994.3
CD22	1.84×10^{-2}	3.23×10^{-2}	1320	1164.37	1475.63	3127	1141.88	5112.12
CD5	2.28×10^{-2}	3.54×10^{-2}	8562	7680.31	9443.69	4571	310.07	8831.93

Obr. 62 ukazuje distribuci hodnot MFI analyzovaných markerů u porovnávaných diagnostických skupin.

Obr. 62. Distribuce hodnot MFI u lehkých řetězců kappa, znaků CD20, CD22, CD79b, CD5, CD23, FMC7, CD35, CD38, CD43, CD25, CD11c a CD200; diagramy typu box-plot, diagnostické kategorie na ose x, hodnoty MFI na ose y (CLL/SLL vs. CD5+ MZL)







7.3.2.7.4 Srovnání MCL a CD5+ MZL

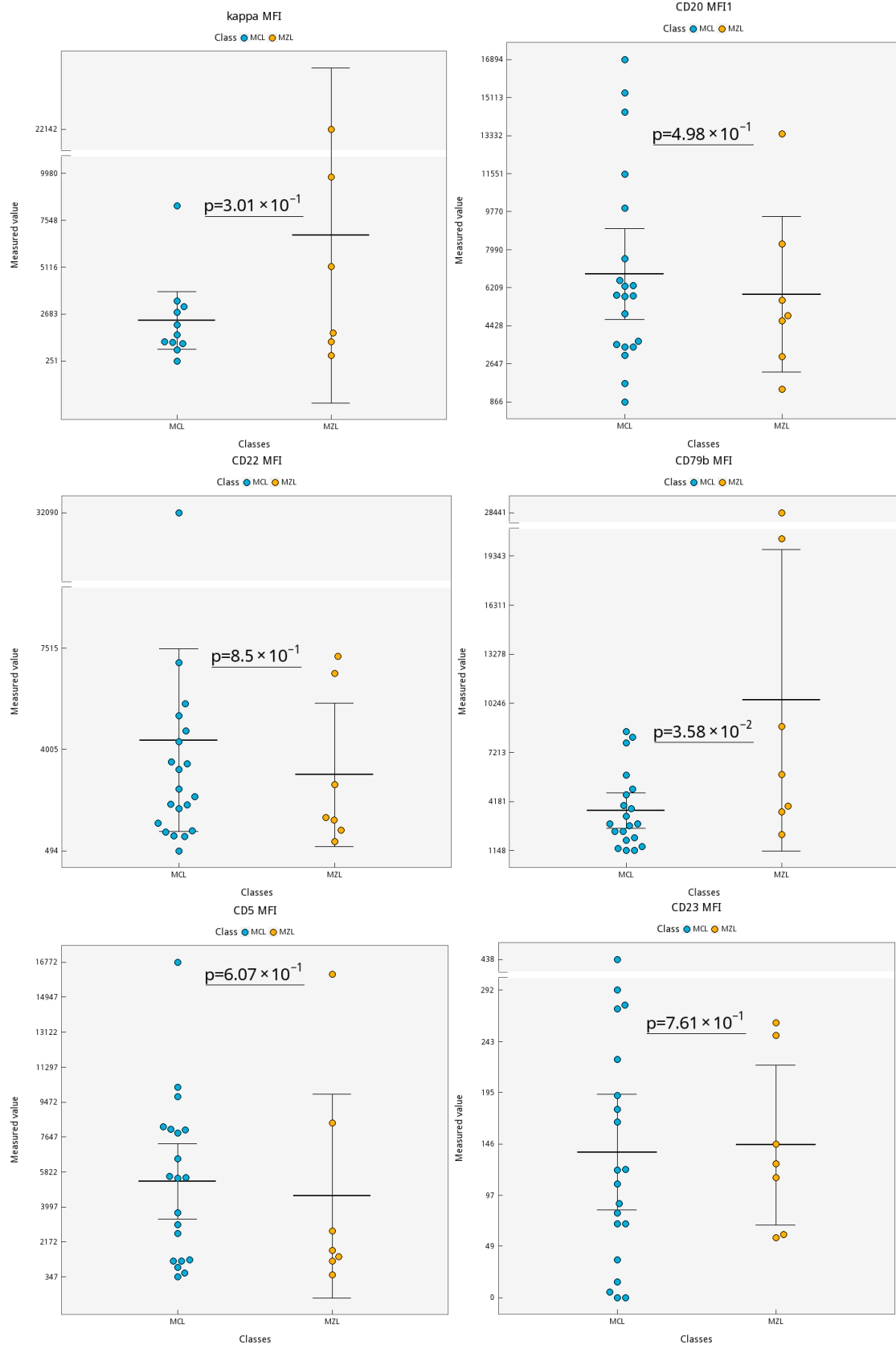
Při srovnání intenzity exprese analyzovaných markerů mezi MCL a CD5+ MZL byla u MCL prokázána vyšší exprese znaku CD38 a nižší exprese znaků CD11c a CD79b než u CD5+ MZL (tab. 28). Rozdíly v intenzitě exprese ostatních vyšetřovaných markerů nebyly statisticky významné.

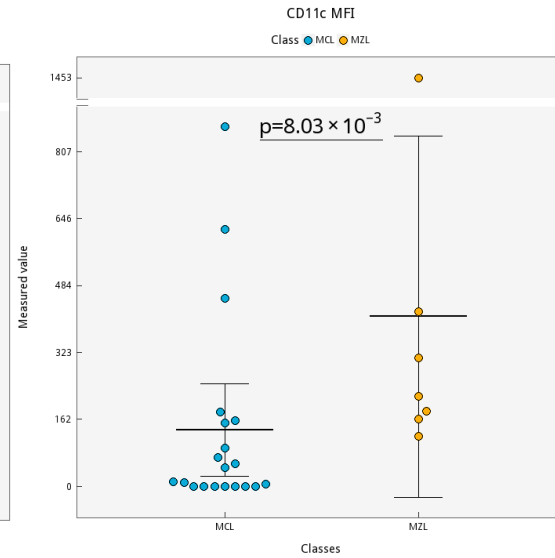
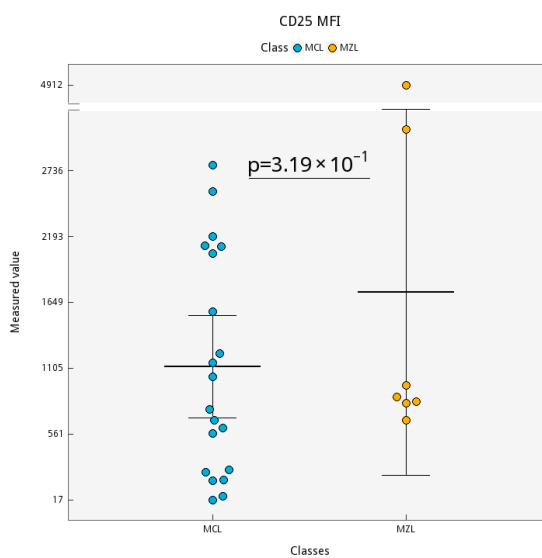
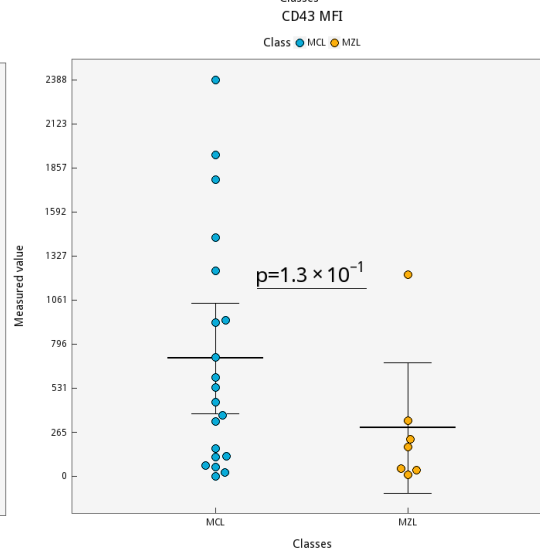
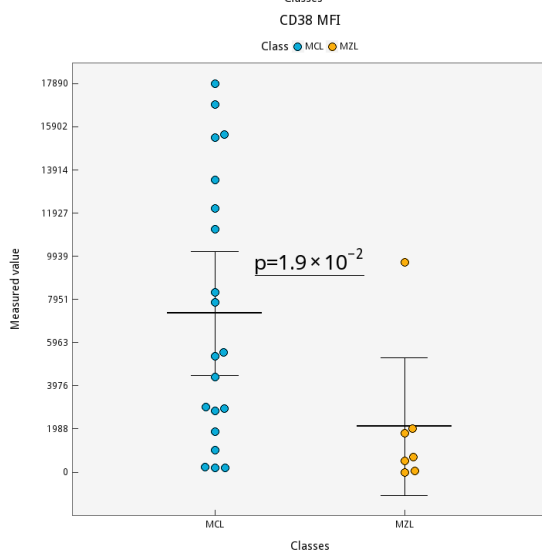
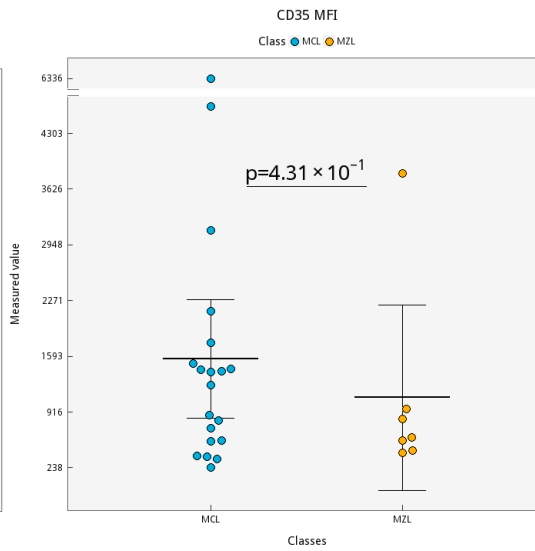
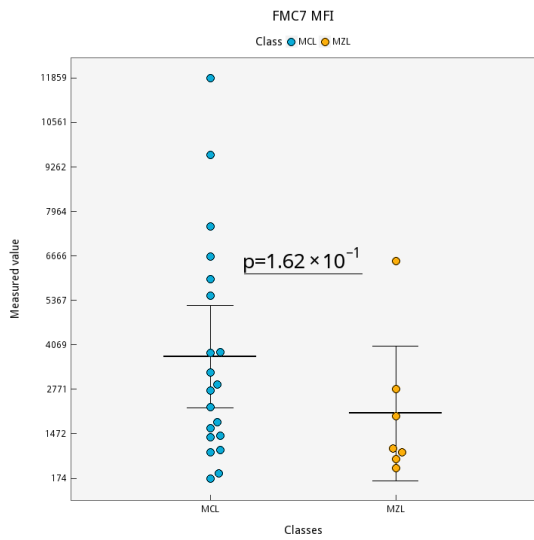
Tab. 28. Markery se statisticky významnými rozdíly MFI mezi MCL a CD5+ MZL

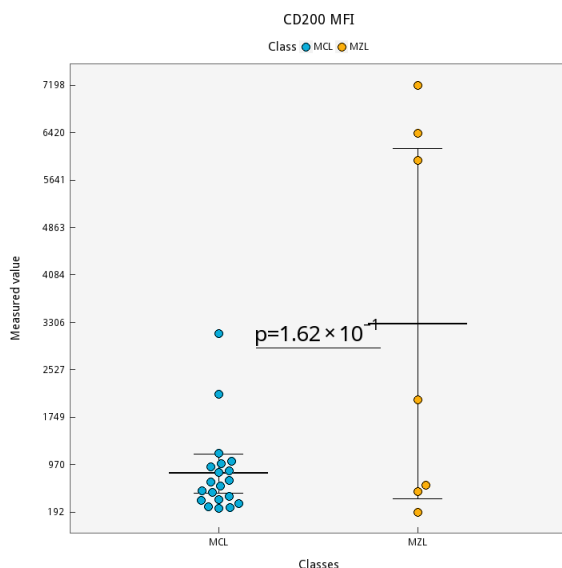
Wilcoxonův test			Lineární ddCq (95 % interval spolehlivosti - CI)					
Znak	p-hodnota	B-Hochberg	MCL			CD5+ MZL		
			Průměr	CI _{dolní}	CI _{horní}	Průměr	CI _{dolní}	CI _{horní}
CD11c	8.03×10^{-3}	0.11	136	31.93	240.07	409.7	60.75	758.65
CD38	1.9×10^{-2}	0.13	7301	4621.92	9980.08	2103	-435.43	4641.43
CD79b	3.58×10^{-2}	0.17	3622	2597.71	4646.29	10440	2988.89	17891.11

Obr. 63 ukazuje distribuci hodnot MFI analyzovaných markerů u porovnávaných diagnostických skupin.

Obr. 63. Distribuce hodnot MFI u lehkých řetězců kappa, znaků CD20, CD22, CD79b, CD5, CD23, FMC7, CD35, CD38, CD43, CD25, CD11c a CD200; diagramy typu box-plot, diagnostická kategorie na ose x, hodnoty MFI na ose y (MCL vs. CD5+ MZL)







7.3.2.7.5 Srovnání podskupin CLL (podskupina s CLL skóre 4+5 a podskupina s CLL skóre 3)

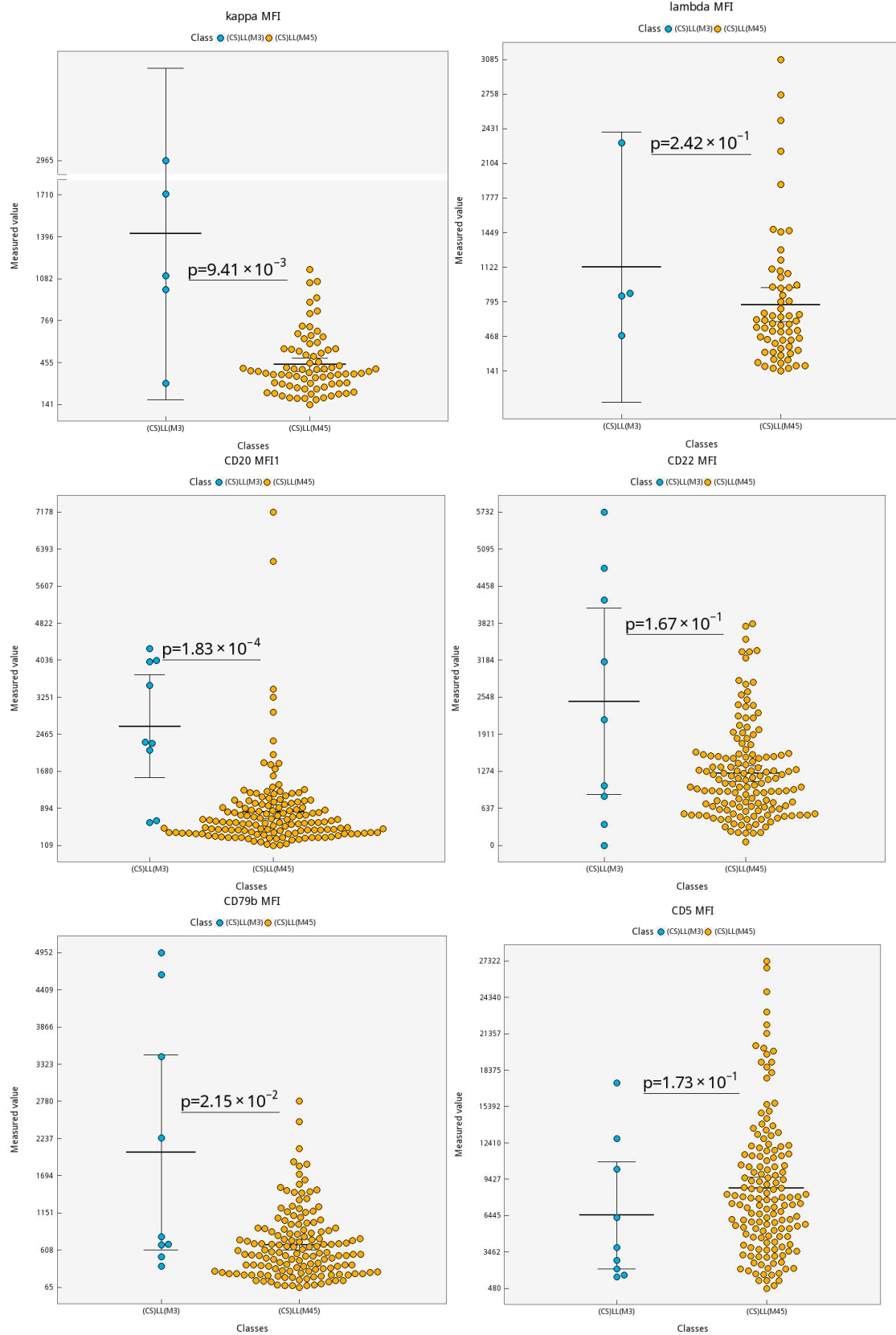
Při srovnání intenzity exprese analyzovaných markerů mezi CLL4+5 a CLL3 byla u CLL4+5 prokázána vyšší intenzita znaků CD23 a CD43 a nižší intenzita exprese znaků CD20, CD79b a FMC7 než u CLL3 (tab. 29). Rozdíly v intenzitě exprese ostatních vyšetřovaných markerů nebyly statisticky významné.

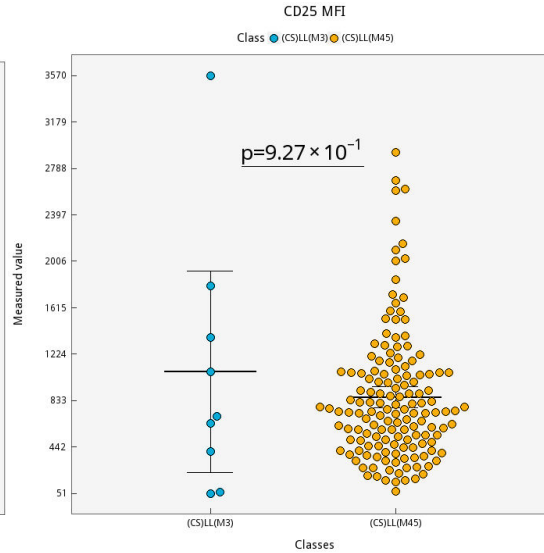
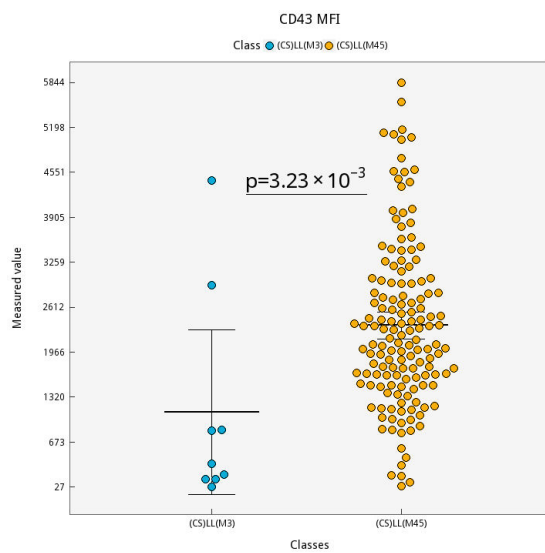
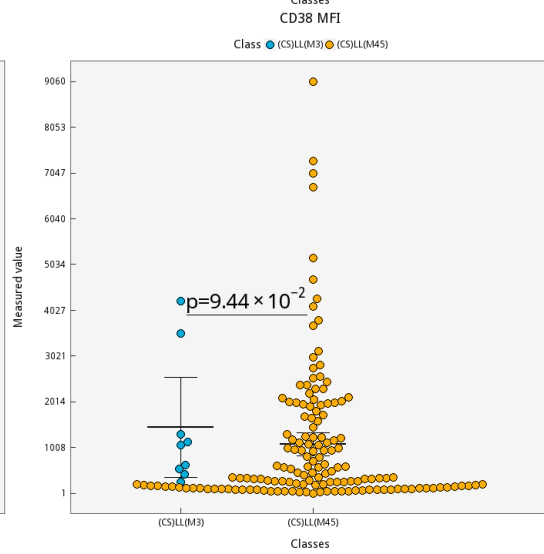
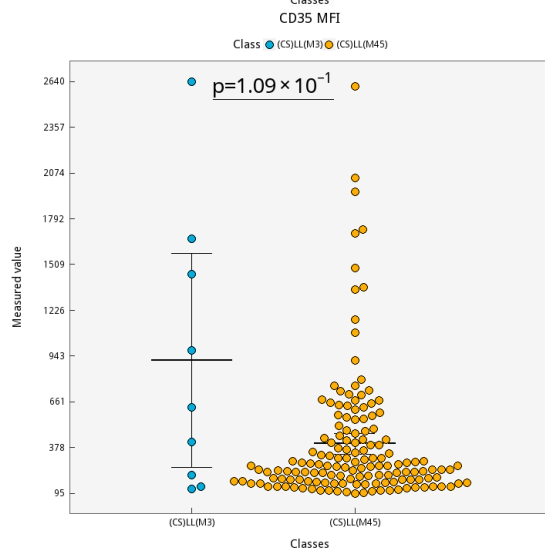
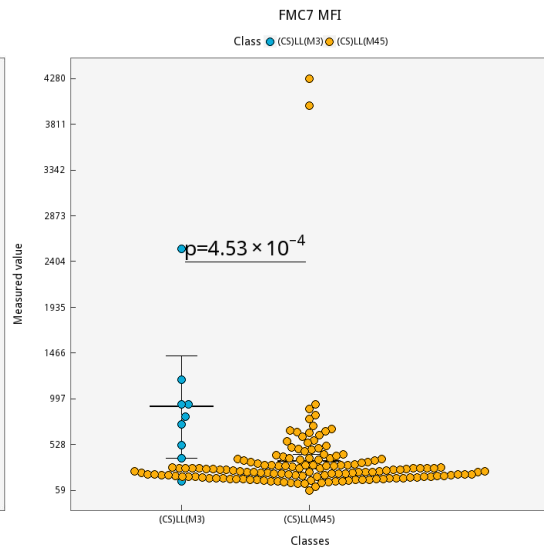
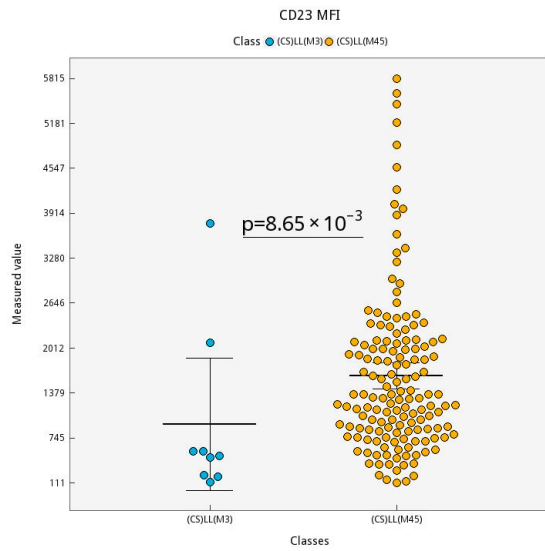
Tab. 29. Markery se statisticky významnými rozdíly MFI mezi CLL4+5 a CLL3

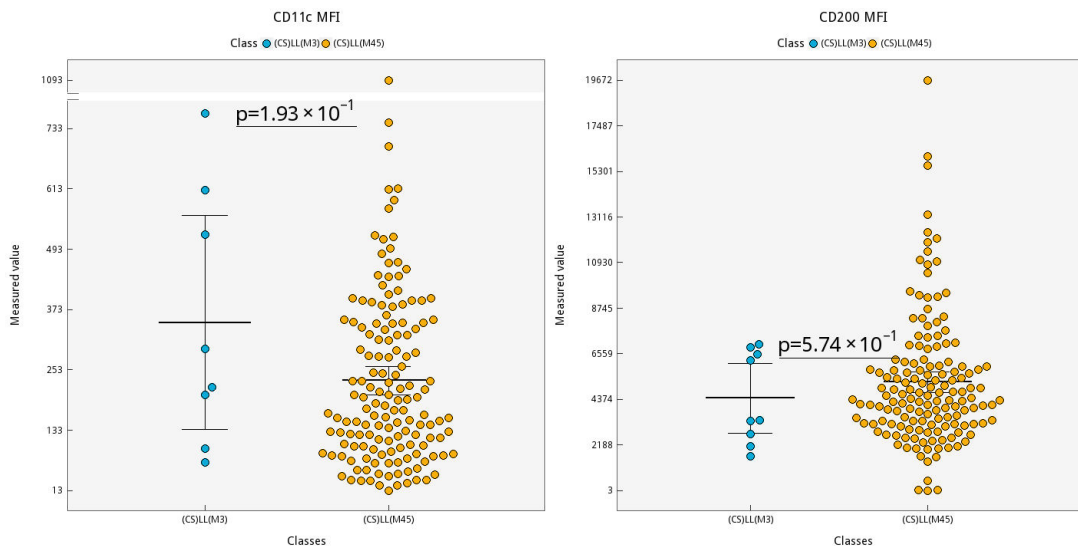
Wilcoxon test			Lineární ddCq (95 % interval spolehlivosti - CI)					
Znak	p-hodnota	B-Hochberg	CLL3			CLL4+5		
			Průměr	CI _{dolní}	CI _{horní}	Průměr	CI _{dolní}	CI _{horní}
CD20	1.79×10^{-4}	2.5×10^{-3}	2634	1711.18	3556.82	819.4	677.23	961.57
FMC7	4.72×10^{-4}	3.3×10^{-3}	912.2	463.96	1360.44	355.2	279.03	431.37
CD43	3.23×10^{-3}	1.51×10^{-2}	1105	101.02	2108.98	2348	2154.32	2541.68
CD23	8.69×10^{-3}	3.04×10^{-2}	939.1	146.16	1732.04	1618	1434.02	1801.98
CD79b	2.15×10^{-2}	6.02×10^{-2}	2034	823.25	3244.75	686.5	606.2	766.8

Obr. 64 ukazuje distribuci hodnot MFI analyzovaných markerů u porovnávaných diagnostických skupin.

Obr. 64. Distribuce hodnot MFI u lehkých řetězců kappa a lambda, znaků CD20, CD22, CD79b, CD5, CD23, FMC7, CD35, CD38, CD43, CD25, CD11c a CD200; diagramy typu box-plot, diagnostická kategorie na ose x, hodnoty MFI na ose y (CLL3 vs. CLL4+5)







7.3.2.8 Vyhodnocení diferenciálně diagnostického potenciálu dvojkombinací a trojkombinací informativních markerů u CLL/SLL, MCL a CD5+ MZL

Matematickým modelem byly s využitím MFI stanoveny dvojkombinace a trojkombinace markerů, které s určitou mírou správnosti navzájem rozlišovaly jednotlivé diagnostické jednotky. Na základě frekvence výskytu diagnostických markerů ve dvojkombinacích a trojkombinacích a s ohledem na výše popsanou statistickou významnost rozdílů v jejich expresi mezi diagnostickými skupinami byly definovány znaky s nejvyšší diferenciálně diagnostickou informační hodnotou (nejinformativnější markery). Klíčové informativní markery byly zobrazeny pomocí sítě.

7.3.2.8.1 Diferenciální diagnostika CLL/SLL a MCL

V rámci diferenciální diagnostiky CLL/SLL a MCL existovalo celkem 91 dvojkombinací markerů rozlišující tyto jednotky se správností nejméně 88.7 %, a 364 trojkombinací markerů rozlišující tyto jednotky se správností nejméně 90.4 %.

V rámci diferenciální diagnostiky CLL/SLL a MCL existovalo celkem 28 dvojkombinací znaků, které tyto jednotky rozlišily se správností nejméně 94.4 %. Mezi těmito dvojkombinacemi se vyskytovaly znaky: FMC7 – 9x, CD20 – 8x, CD200 – 7x, CD79b – 6x, CD38 – 6x, CD23 – 5x, CD43 – 4x, CD11c – 3x, CD5 – 2x, lambda – 2x, CD25 – 1x, CD22 – 1x, CD35 – 1x, kappa – 1x. 9 nejužitečnějších dvojkombinací MFI shrnuje tab. 30.

Tab. 30. Dvojkombinace MFI diagnostických markerů rozlišující CLL/SLL a MCL se správností nejméně 96.1 %

Marker 1	Marker 2	Chybovost zařazení diagnózy (%)
CD200	CD23	2.2
CD23	FMC7	2.8
CD200	CD79b	2.8
CD200	CD43	3.4
CD23	CD20	3.4
CD79b	CD5	3.4
CD200	FMC7	3.9
CD20	CD38	3.9
CD79b	FMC7	3.9

V rámci diferenciální diagnostiky CLL/SLL a MCL existovalo celkem 50 trojkombinací znaků, které tyto jednotky rozlišily se správností nejméně 99.4 %. Mezi těmito trojkombinacemi se vyskytovaly znaky: CD200 – 32x, CD23 – 28x, FMC7 – 16x, CD79b – 10x, CD43 – 9x, CD5 – 9x, CD11c – 7x, CD20 – 6x, CD25 – 5x, CD35 – 5x, CD22 – 4x, lambda – 4x, kappa – 3x, CD38 – 2x. 3 nejužitečnější trojkombinace MFI shrnuje tab. 31.

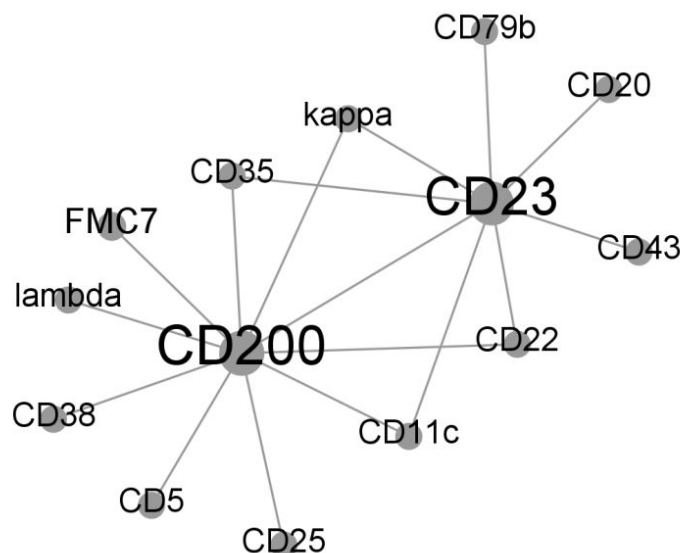
Tab. 31. Trojkombinace MFI diagnostických markerů rozlišující CLL/SLL a MCL se správností 100 %

Marker 1	Marker 2	Marker 3	Chybovost zařazení diagnózy (%)
CD23	FMC7	CD43	0
CD23	CD20	CD43	0
CD23	CD43	CD11c	0

S ohledem na sestavu znaků se statistickými rozdíly MFI mezi CLL/SLL a MCL a výše uvedené údaje lze označit markery CD200, CD23, FMC7, CD79b, CD20, CD43 a CD38 za znaky s nejvyšší diferenciálně diagnostickou informační hodnotou při rozlišení CLL a MCL. Absolutně nejčastějšími znaky v kombinacích byly CD23 a CD200. Tato kombinace správně odlišila CLL/SLL a MCL v 97.8 % případů. Přidání kteréhokoli ze znaků CD5,

FMC7, CD20, CD22, CD35, CD38, CD43, CD25, CD79b, CD11c a lehkých řetězců kappa nebo lambda zvýšila správnost odlišení CLL/SLL a MCL nad 99 %. Výběr nejinformativnějších markerů pro odlišení CLL/SLL a MCL graficky znázorňuje obr. 65.

Obr. 65. Výběr nejinformativnějších markerů pro odlišení CLL/SLL a MCL



7.3.2.8.2 Diferenciální diagnostika CLL/SLL a CD5+ MZL

V rámci diferenciální diagnostiky CLL/SLL a CD5+ MZL existovalo celkem 91 dvojkombinací markerů rozlišující tyto jednotky se správností nejméně 94.6 % a 364 trojkombinací markerů rozlišující tyto jednotky se správností nejméně 95.4 %.

V rámci diferenciální diagnostiky CLL/SLL a CD5+ MZL existovalo celkem 28 dvojkombinací znaků, které tyto jednotky rozlišily se správností nejméně 97.6 %. Mezi těmito dvojkombinacemi se vyskytovaly znaky: CD79b – 12x, kappa – 9x, CD20 – 4x, CD11c – 4x, CD25 – 4x, CD35 – 4x, FMC7 – 4x, CD23 – 3x, CD22 – 3x, CD43 – 2x, CD200 – 1x, CD5 – 1x, CD38 – 1x, lambda 1x. 6 nejužitečnějších dvojkombinací MFI shrnuje tab. 32.

Tab. 32. Dvojkombinace MFI diagnostických markerů rozlišující CLL/SLL a CD5+ MZL se správností nejméně 98.8 %

Marker 1	Marker 2	Chybovost zařazení diagnózy (%)
CD79b	FMC7	0.6
Kappa	CD20	1.2
CD23	CD79b	1.2
CD79b	CD20	1.2
CD79b	CD11c	1.2
CD79b	CD25	1.2

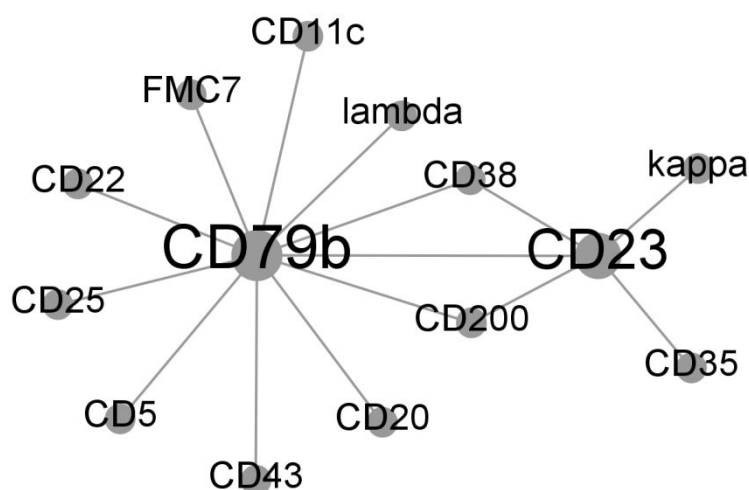
V rámci diferenciální diagnostiky CLL/SLL a CD5+ MZL existovalo celkem 53 trojkombinací znaků, které tyto jednotky rozlišily se správností nejméně 99.4 %. Mezi těmito trojkombinacemi se vyskytovaly znaky: CD79b – 32x, CD23 – 28x, CD43 – 20x, FMC7 – 12, CD20 – 8x, CD11c – 8x, CD35 – 7x, kappa – 6x, CD25 – 6x, CD200 – 6x, CD38 – 5x, CD22 – 4x, CD5 – 4x. 13 nejužitečnějších trojkombinací MFI shrnuje tab. 33.

Tab. 33. Trojkombinace MFI diagnostických markerů rozlišující CLL/SLL a CD5+ MZL se správností 100 %

Marker 1	Marker 2	Marker 3	Chybovost zařazení diagnózy (%)
Kappa	CD23	CD79b	0
Kappa	CD23	CD43	0
Lambda	CD23	CD79b	0
CD200	CD23	CD79b	0
CD23	CD79b	FMC7	0
CD23	CD79b	CD38	0
CD23	CD79b	CD35	0
CD23	CD79b	CD43	0
CD23	CD79b	CD25	0
CD23	CD79b	CD22	0
CD23	CD79b	CD11c	0
CD23	CD35	CD43	0
CD79b	CD43	CD11c	0

S ohledem na sestavu znaků se statistickými rozdíly MFI mezi CLL/SLL a CD5+ MZL a výše uvedené údaje lze označit markery CD79b, CD23, CD43, FMC7, CD20, CD11c, CD35 a lehké řetězce kappa a lambda za znaky s nejvyšší diferenciálně diagnostickou informační hodnotou při rozlišení CLL/SLL a CD5+ MZL. Absolutně nejčastějšími znaky v kombinacích byly CD23 a CD79b. Tato kombinace správně odlišila CLL/SLL a CD5+ MZL v 98.8 % případů. Přidání kteréhokoli ze znaků CD200, FMC7, CD22, CD35, CD38, CD43, CD25, CD79b, CD11c a lehkých řetězců kappa nebo lambda zvýšila správnost odlišení CLL/SLL a MZL na 100 %. Výběr nejinformativnějších markerů pro odlišení CLL/SLL a CD5+ MZL graficky znázorňuje obr. 66.

Obr. 66. Výběr nejinformativnějších markerů pro odlišení CLL/SLL a CD5+ MZL



7.3.2.8.3 Diferenciální diagnostika MCL a CD5+ MZL

V rámci diferenciální diagnostiky MCL a CD5+ MZL existovalo celkem 91 dvojkombinací markerů rozlišující tyto jednotky se správností nejméně 66.7 % a 364 trojkombinací markerů rozlišující tyto jednotky se správností nejméně 74.1 %.

V rámci diferenciální diagnostiky MCL a CD5+ MZL existovalo celkem 10 dvojkombinací znaků, které tyto jednotky rozlišily se správností nejméně 88.9 %. Mezi těmito dvojkombinacemi se vyskytovaly znaky: CD200 – 4x, CD11c – 4x, CD23 – 2x, CD25 – 2x, CD38 – 2x, kappa – 2x, CD20 – 1x, CD22 – 1x, CD79b – 1x, CD35 – 1x. 10 nejužitečnějších dvojkombinací MFI shrnuje tab. 34.

Tab. 34. Dvojkombinace MFI diagnostických markerů rozlišující MCL a CD5+ MZL se správností nejméně 88.9 %

Marker 1	Marker 2	Chybovost zařazení diagnózy (%)
CD200	CD11c	7.4
CD38	CD22	7.4
CD25	CD11c	7.4
Kappa	CD200	11.1
Kappa	CD79b	11.1
CD200	CD38	11.1
CD200	CD35	11.1
CD23	CD25	11.1
CD23	CD11c	11.1
CD20	CD11c	11.1

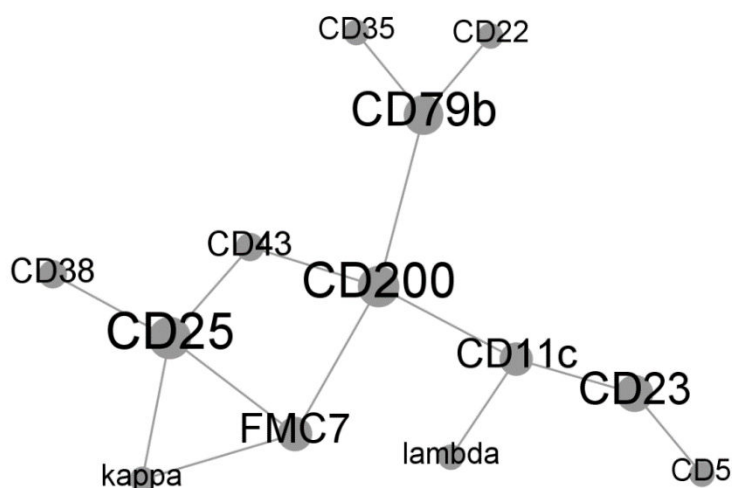
V rámci diferenciální diagnostiky MCL a CD5+ MZL existovalo celkem 27 trojkombinací znaků, které tyto jednotky rozlišily se správností nejméně 92.6 %. Mezi těmito trojkombinacemi se vyskytovaly znaky: CD200 – 9x, CD11c – 9x, CD79b – 8x, CD25 – 8x, CD43 – 8x, FMC7 – 8x, CD38 – 6x, kappa – 5x, CD35 – 5x, CD23 – 4x, lambda – 3x, CD5 – 2x, CD22 – 2x. 8 nejužitečnějších trojkombinací MFI shrnuje tab. 35.

Tab. 35. Trojkombinace MFI diagnostických markerů rozlišující MCL a CD5+ MZL se správností nejméně 96.3 %

Marker 1	Marker 2	Marker 3	Chybovost zařazení diagnózy (%)
CD200	CD43	CD25	1.2
CD5	CD43	CD22	1.2
CD200	CD79b	CD38	3.7
CD23	FMC7	CD5	3.7
CD79b	CD35	CD22	3.7
FMC7	CD38	CD35	3.7
CD38	CD43	CD25	3.7
CD38	CD25	CD11c	3.7

S ohledem na sestavu znaků se statistickými rozdíly MFI mezi MCL a CD5+ MZL a výše uvedené údaje lze označit markery CD200, CD79b, CD25, CD38, CD43 a CD11c za znaky s nejvyšší diferenciálně diagnostickou informační hodnotou při rozlišení MCL a CD5+ MZL. Absolutně nejčastějšími znaky v kombinacích byly CD200, CD79b, CD25, CD23. Nejužitečnějšími trojkombinacemi byly kombinace znaků CD200, CD43 a CD25 a kombinace znaků CD5, CD43 a CD22. U žádného z těchto znaků ovšem dříve uvedená analýza neshledala statisticky významný rozdíl v intenzitě exprese mezi MCL a CD5+ MZL. Výběr nejinformativnějších markerů pro odlišení MCL a CD5+ MZL graficky znázorňuje obr. 67. Míra diagnostické nejistoty při rozlišení MCL a CD5+ MZL je podstatně vyšší než u odlišení CLL/SLL od MCL a CD5+ MZL.

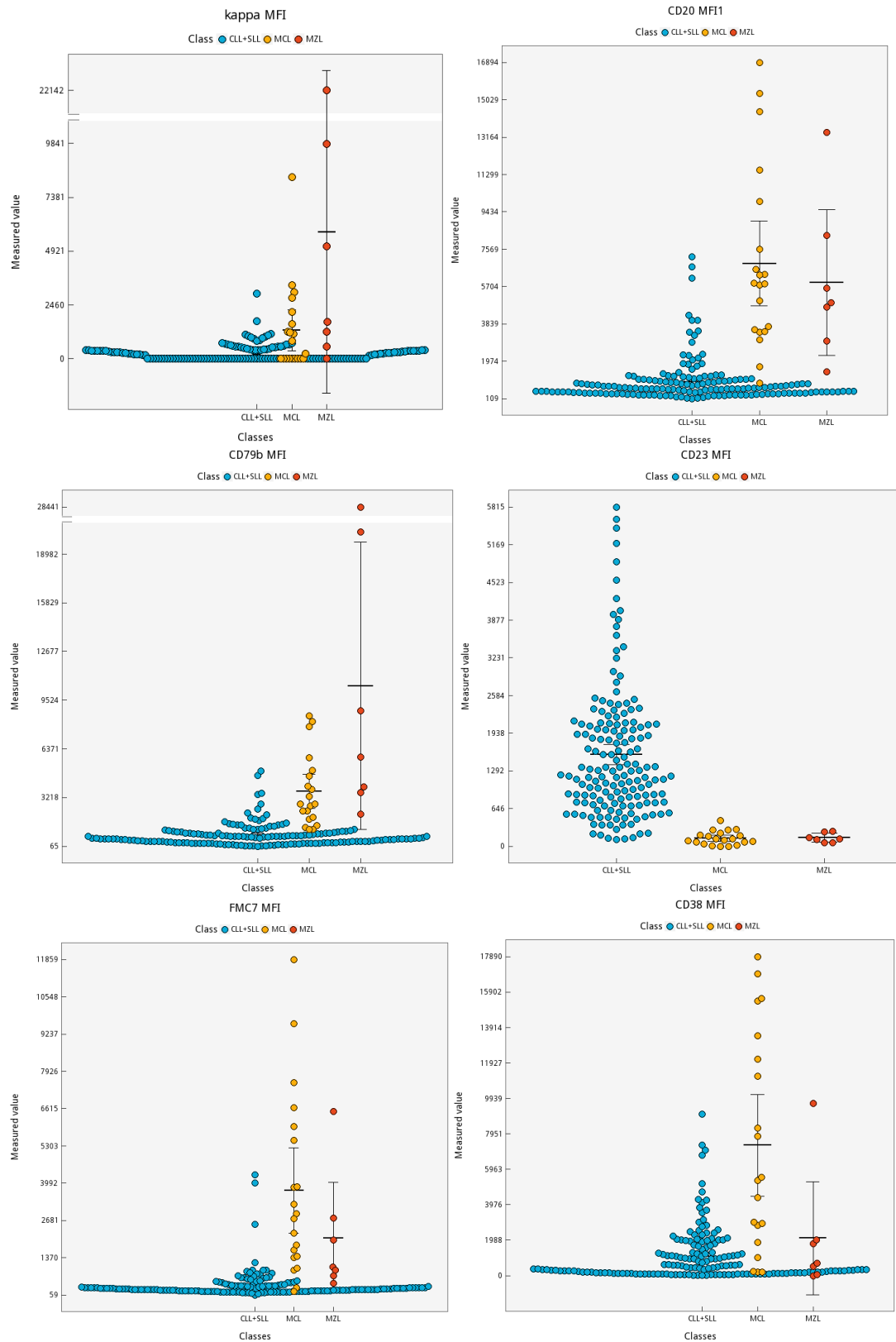
Obr. 67. Výběr nejinformativnějších markerů pro odlišení MCL a CD5+ MZL

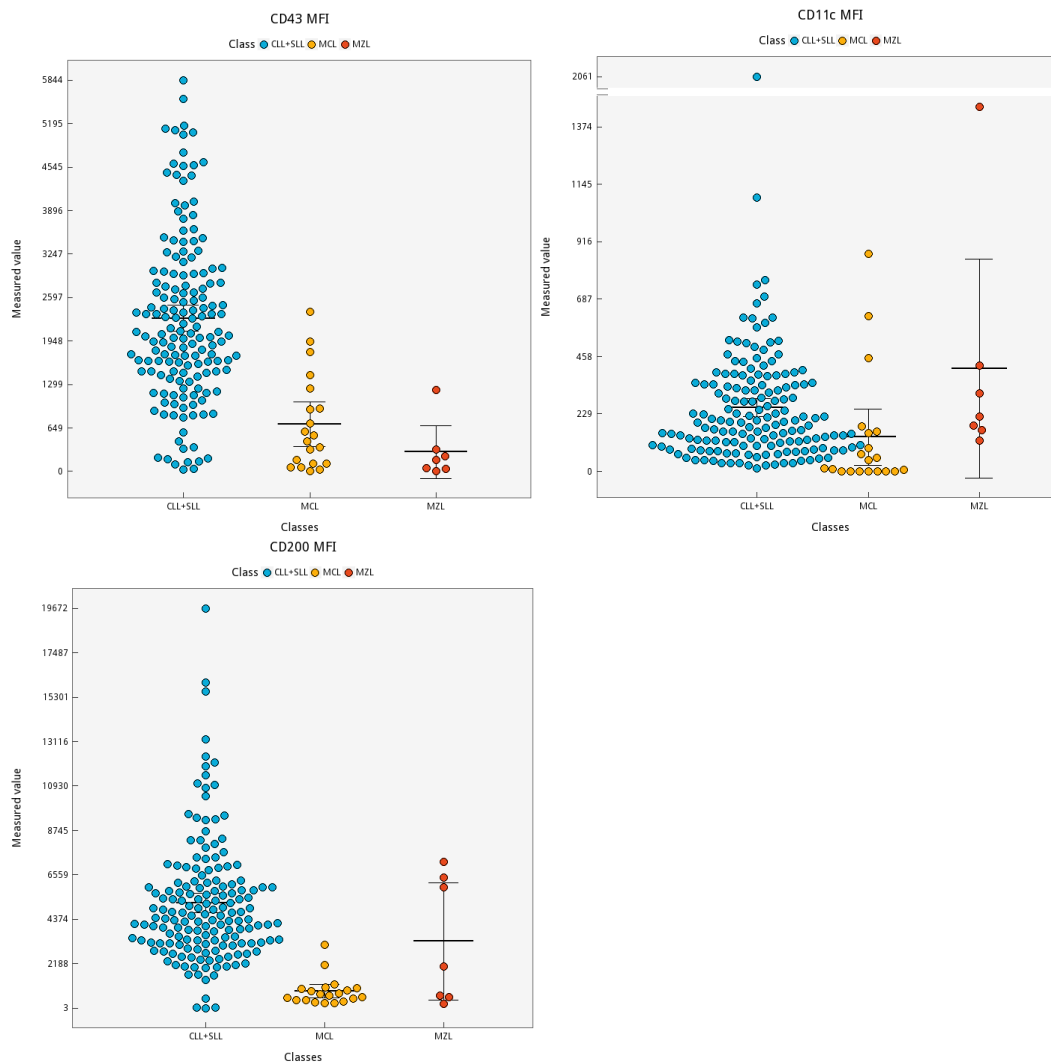


7.3.2.8.4 Grafické znázornění rozdílů exprese nejinformativnějších markerů odlišujících CLL/SLL, MCL a CD5+ MZL

Výše byly definovány nejinformativnější markery imunofenotypu s diferenciálně diagnostickým významem mezi CLL/SLL, MCL a CD5+ MZL. Rozdíly v jejich expresi u těchto jednotek znázorňuje obr. 68.

Obr. 68. Distribuce hodnot MFI u znaků CD20, CD79b, CD23, FMC7, CD38, CD43, CD11c, CD200; diagramy typu box-plot, diagnostická kategorie na ose x, hodnoty MFI na ose y (CLL/SLL vs. MCL vs. CD5+ MZL)

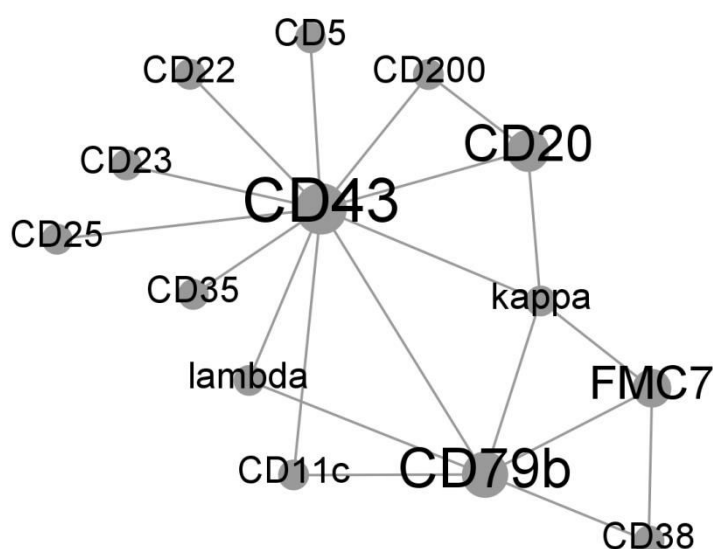




7.3.2.8.5 Rozdíly imunofenotypu CLL3 a CLL4+5

Při porovnání CLL4+5 a CLL3 se v kombinacích MFI nejčastěji vyskytovaly znaky CD43, CD20 a CD79b. Kombinace CD43 a CD20 správně odlišila CLL4+5 a CLL3 v 96.8 % případů. Kombinace CD43 a CD79b správně odlišila CLL4+5 a CLL3 v 96.8 % případů. Přidání některého ze znaků CD5, FMC7, CD23, CD25, kappa a lambda zvýšilo správnost odlišení CLL 4+5 a CLL3 nad 98 %. Výběr nejinformativnějších markerů pro odlišení CLL4+5 a CLL3 graficky znázorňuje obr. 69.

Obr. 69. Výběr nejinformativnějších markerů pro odlišení CLL4+5 a CLL3

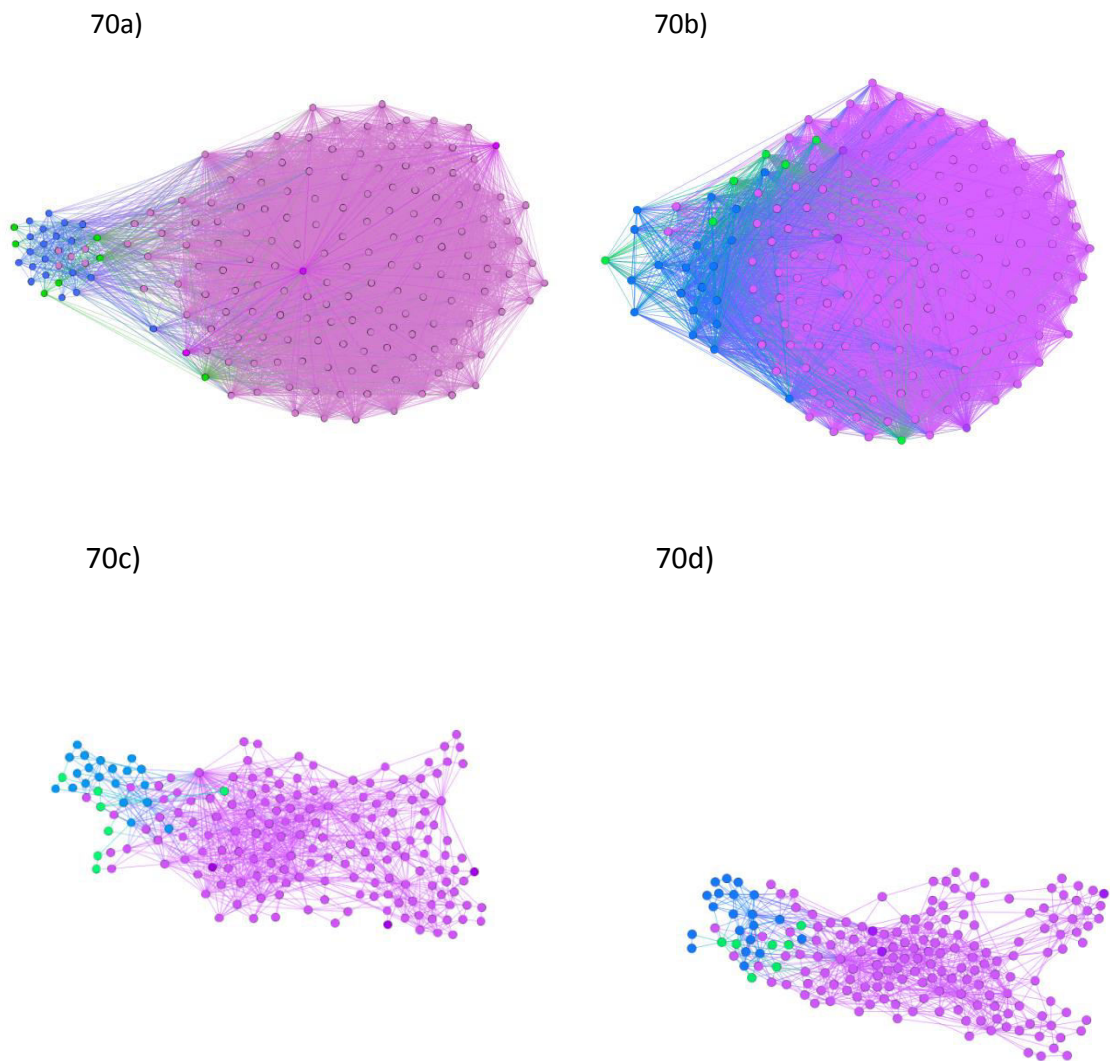


7.3.2.9 Vizualizace expresního profilu imunofenotypu CLL/SLL, MCL, CD5+ MZL a neklasifikovatelných zralých CD5-pozitivních neoplázií pomocí datových sítí

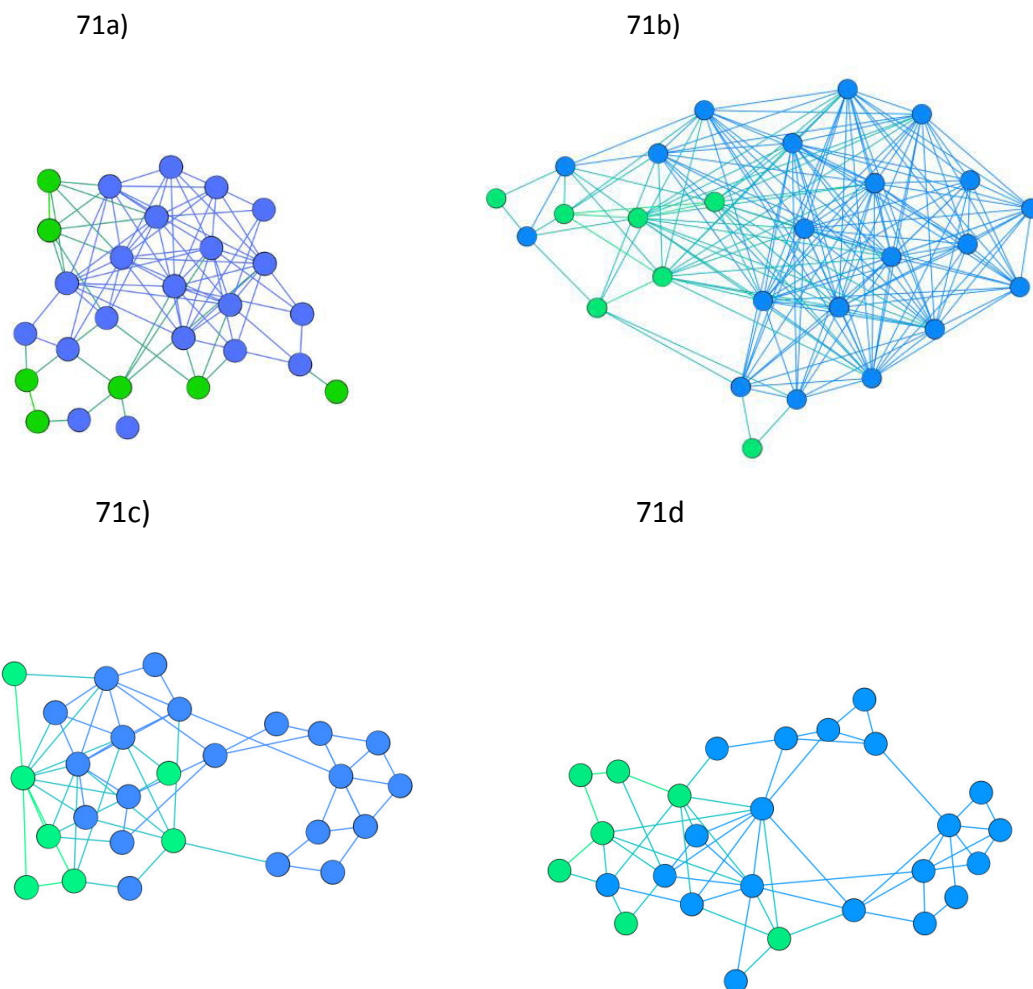
Rozdíly imunofenotypového expresního profilu CLL, MCL a CD5+ MZL byly vizualizovány pomocí datových sítí. Umístění každého případu v datové síti odráželo kombinaci exprese všech analyzovaných znaků vyjádřené jako MFI. Datové sítě pro celý analyzovaný soubor a pro skupiny MCL a CD5+ MZL ukazují obr. 70 a obr. 71. Z těchto datových sítí je zřejmé, že CLL a MCL a CLL a CD5+ MZL představují jednotky s významnými vzájemnými rozdíly imunofenotypového expresního profilu. Imunofenotyp MCL a CD5-pozitivního MZL je vzájemně daleko podobnější a i přes využití poměrně širokého imunofenotypizačního panelu existují problémy při spolehlivém odlišení těchto jednotek. Rozlišení jednotlivých diagnostických jednotek bylo přehlednější v síti s expresními daty všech znaků nežli v síti s expresními daty nejinformativnějších markerů. Neklasifikovatelné případy byly svým imunofenotypem nejbližší CD5+ MZL (obr. 72). Datová síť konstruovaná pro případy CLL ukazuje poměrně homogenní imunofenotypový expresní profil pro případy s CLL skóre 4 a 5 (obr. 73). Vzácné případy CLL se skóre 3 nevykazovaly unikátní a jednotný expresní profil imunofenotypu. Struktura datové sítě MCL postuluje přítomnost minimálně 2 podskupin pacientů. Identifikace a bližší charakteristika těchto podskupin a objasnění event. souvislosti s průběhem onemocnění vyžaduje další analýzy. Rozlišení

jednotlivých jednotek s využitím datové vizualizace založené na sítích vycházející z MFI analyzovaných znaků je daleko přesnější nežli jejich rozlišení s využitím standardního hodnocení na základě positivity/negativity. Informace o struktuře analyzovaných dat je komplexnější a přesnější, podobnost záznamů je kalkulována mnohem přesněji. Vizualizace prostřednictvím sítí vycházejících z MFI analyzovaných znaků poskytuje rozmanitější informace o vztazích a substrukturách skrytých v datech.

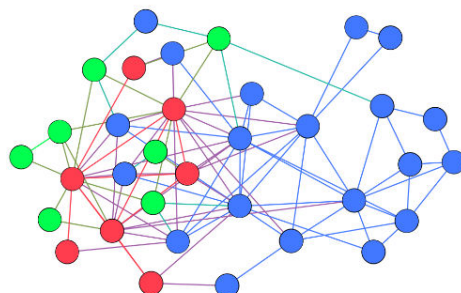
Obr. 70. Datové sítě pro celý analyzovaný soubor; 70a) síť s využitím všech znaků (pozitivita/negativita), 70b) síť s využitím nejinformativnějších znaků (pozitivita/negativita), 70c) síť s využitím všech znaků (MFI), 70d) síť s využitím nejinformativnějších znaků (MFI); (CLL – fialově, MCL – modře, CD5+ MZL – zeleně)



Obr. 71. Datová síť u MCL a CD5+ MZL; 71a) síť s využitím všech znaků (pozitivita/negativita), 71b) síť s využitím nejinformativnějších znaků (pozitivita/negativita), 71c) síť s využitím všech znaků (MFI), 71d) síť s využitím nejinformativnějších markerů (MFI); (MCL – modře, CD5+ MZL – zeleně)

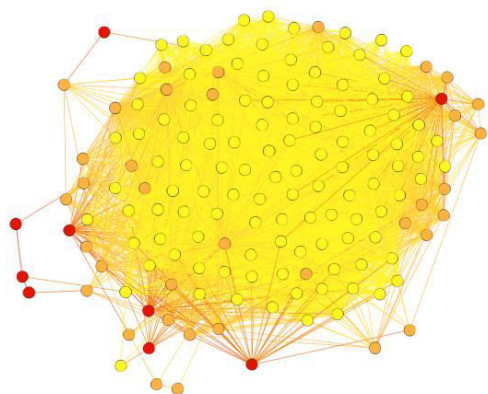


Obr. 72. Datová síť u MCL, CD5+ MZL a neklasifikovatelných případů (MCL – modře, CD5+ MZL – zeleně, neklasifikovatelné případy – červeně)

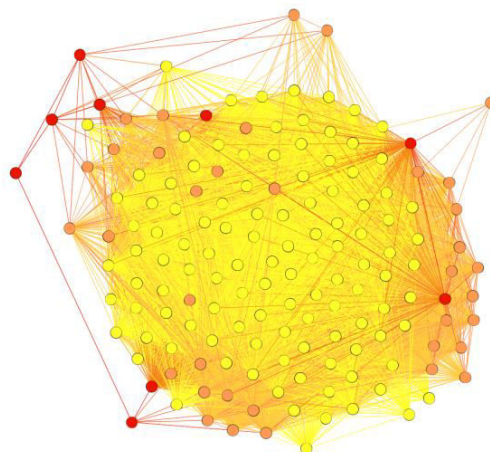


Obr. 73. Datová síť u CLL; 73a) síť s využitím všech znaků (pozitivita/negativita), 73b) síť s využitím nejinformativnějších znaků (pozitivita/negativita), 73c) síť s využitím všech znaků (MFI), 73d) síť s využitím nejinformativnějších markerů (MFI); (CLL5 – žlutě, CLL4 – oranžově, CLL3 – červeně)

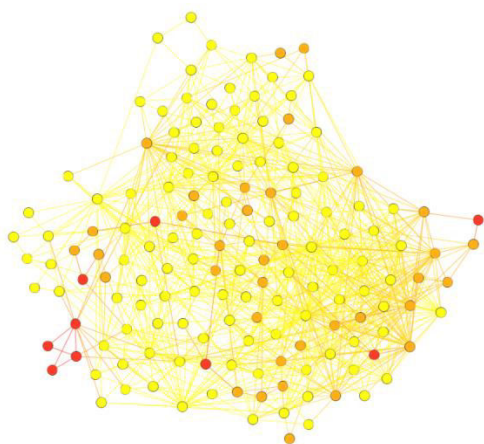
73a)



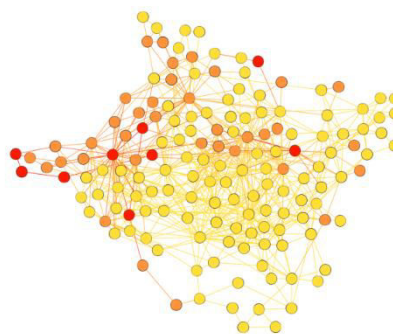
73b)



73c)



73d)



8. Diskuze

8.1 Cytomorfologie zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií

Cytomorfologické vyšetření má v rámci diferenciální diagnostiky CD5-pozitivních B-lymfoproliferací stejně důležité místo jako ostatní diagnostické modality, velkou výhodou je rychlost, všeobecná dostupnost a nízká cena této metody. CD5-pozitivní B-lymfoidními neoplázie jsou charakteristické značnou pestrostí cytomorfologického obrazu a dále faktem, že mezi jednotlivými diagnostickými entitami existuje poměrně velký překryv cytologického nálezu. Jednotlivé cytomorfologické typy a varianty jsou diskutovány níže a jsou zasazeny do širšího kontextu cytologické diferenciální diagnostiky těchto nemocí. V obecné rovině lze konstatovat, že vzájemné odlišení řady jednotek pouze na cytomorfologickém základě může být značně obtížné až nemožné.

Malobuněčný typ včetně typu s plazmocelulární diferenciací se vyskytuje u typické CLL, SLL, u malobuněčné varianty MCL, u MZL a také u LPL a FL. V analyzovaném souboru byl tento morfologický typ nejčastější a byl pozorován u 79.1 % vzorků CLL, u všech případech SLL, u 45.4 % vzorků CD5+ MZL a 23.6 % vzorků MCL (většina variantních forem). V případě neklasifikovatelných případů šlo o většinový cytologický nález (71.4 %). Literatura udává frekvenci typické morfologie u CLL přibližně u 80 % případů, což bylo v souladu s výskytem v analyzovaném souboru (89, 90, 91). Literární údaje hovoří o frekvenci výskytu malobuněčné varianty MCL do 5 % (92, 93), najdeme ale i údaj o 25 % výskytu MCL v případě hodnocení vzorků kostní dřeně u malobuněčných CD5-pozitivních B-lymfomů (94). Většina prací zohledňuje při morfologickém hodnocení MCL zejména histologickou analýzu, spolehlivé údaje o cytomorfologii jsou omezené, v těchto studiích je popisován výskyt malobuněčné varianty MCL až v 15 % případů (95, 96). U lymfomu z marginální zóny tvoří malobuněčný obraz většinu případů, typická je určitá heterogenita cytologického nálezu, častá je plazmocelulární diferenciace, malá příměs atypických větších lymfocytů a též nepravidelnosti okraje cytoplazmy („viloidní“ lymfocyty) (55, 56, 58, 59, 97, 98, 99). Vzhledem k časté plazmocelulární diferenciaci může být velmi složité rozlišení mezi MZL a LPL, a to i s podporou imunofenotypizace (59, 98, 99). Je třeba mít na paměti, že malobuněčný cytomorfologický nález lze pozorovat též u T-lymfomů, zejména periferního T-buněčného lymfomu, malobuněčné

varianty T-prolymfocytární leukémie a také některých případů hepatosplenického T-buněčného lymfomu.

Malobuněčný typ s prolymfocyty je charakteristický pro případy atypické CLL – varianty CLL/PL. Arbitrární hranice počtu prolymfocytů v periferní krvi pro odlišení CLL/PL a B-PLL je stanovena na 55 %. Vzácně lze nalézt příměs elementů podobných prolymfocytům také u případů MCL a MZL (56, 100). V analyzovaném souboru byl u CLL nalezen takový morfologický obraz (CLL/PL) u 11.9 % vzorků. V případě CLL udává literatura výskyt CLL/PL mezi 10-14 % (89, 90, 91), což korespondovalo s údaji z analyzovaného souboru. Tato varianta atypické CLL je často spojena s trisomií 12 nebo komplexními změnami karyotypu zahrnujícími tuto genetickou změnu. Přítomnost CLL/PL je u CLL negativním prognostickým faktorem (89, 91, 101, 102).

Prolymfocytární/prolymfocytoidní typ se vyznačuje zastoupením prolymfocytů mezi lymfocyty periferní krve přesahujícím 55 %; je příznačný pro B-PLL. Příklad B-PLL nebyl v analyzovaném souboru pozorován. Vzácně lze nalézt cytologický obraz připomínající B-PLL u MCL. Tyto případy by měly být řazeny k pleomorfní variantě MCL (100, 103). V analyzovaném souboru se vyskytly 2 případy prolymfocytoidní morfologie u MCL. V širší diferenciální diagnostice nelze opomenout raritní T-prolymfocytární leukémii, jejíž cytomorfológický obraz může být zcela identický s B-PLL.

Centrocytoidní typ s jadernými atypiami tvoří valnou část případů MCL (klasický MCL). V analyzovaném souboru se vyskytl u 45.4 % vzorků MCL. Literatura udává výskyt klasického MCL mezi 46 % a 87 % všech případů MCL (92, 93, 96, 104). Vzácně lze centrocytoidní obraz pozorovat též u MZL (56), tento jev nebyl v analyzovaném souboru pozorován.

Pleomorfní typ lze nalézt u pleomorfní varianty atypické CLL, pleomorfní varianty MCL a ojedinělých případů MZL. V analyzovaném souboru byl pleomorfní typ cytomorfológie druhým nejčastějším obrazem a vyskytl se u 8.2 % vzorků CLL, 21.1 % vzorků MCL a 18.2 % vzorků CD5+ MZL. U neklasifikovatelných případů šlo o ojedinělý cytologický nález. V literatuře se popisuje výskyt pleomorfní varianty atypické CLL kolem 7 % a zdůrazňuje se její negativní prognostický význam (89, 91). V případě MCL se udává frekvence pleomorfní varianty 5.9 % - 9.6 % a agresivní klinický průběh této

varianty (92, 93, 96, 104). Do této kategorie by měly být řazeny také případy MCL s morfologií podobnou B-PLL (100, 103). U MZL se výskyt pleomorfní cytologie považuje za vzácný (56). Rozdíly mezi údaji o výskytu z analyzovaného souboru a z literatury jsou vysvětlitelné rozdílností metody (cytologie, histologie), počtem případů MCL a CD5+ MZL v souboru a subjektivitou morfologického hodnocení. V širším kontextu lze uvést, že pleomorfní cytologický obraz se může vyskytnout také u malobuněčné varianty T-prolymfocytové leukémie.

Typ se středně velkými lymfocyty nebo „monocytoidními“ lymfocyty lze nalézt u lymfomu z marginální zóny, v souboru se vyskytl u 18.2 % vzorků MZL. Literatura považuje tuto cytomorfolonii u MZL spíše za vzácnost (56). Je možno ji pozorovat také ve vzácných případech MCL (varianta podobná lymfomu z marginální zóny), v analyzovaném souboru byl nalezen jediný takový případ. Ve skupině neklasifikovatelných případů šlo též o ojedinělý cytologický nález.

Typ s vilózními lymfocyty je specifický pro splenický lymfom z marginální zóny (subtyp splenický lymfom s vilózními lymfocyty). V analyzovaném souboru se vyskytly 2 případy této jednotky. Literatura popisuje výskyt vilózních lymfocytů u velké části SMZL, často jako diskrétní nález. Také u ostatních forem MZL jsou nepravidelnosti okraje cytoplazmy velmi časté („viloidní“ lymfocyty). Je třeba zdůraznit, že distribuce výběžků cytoplazmy nemusí být vždy unipolární nebo bipolární. (55, 56, 57, 58). V širší diferenciální diagnostice je třeba odlišit vlasatobuněčnou leukémii a její variantní formu.

Blastoidní typ včetně velkobuněčného typu centroblastického a imunoblastického se vyskytuje u blastoidní varianty MCL, DLBCL a ve vzácných případech transformace CLL v DLBCL. Případy blastoidní varianty MCL mohou připomínat akutní leukemii nebo DLBCL. V analyzovaném souboru tvořila blastoidní varianta 5.3 % vzorků MCL (případy byly velmi podobné imunoblastické variantě DLBCL). Frekvence výskytu blastoidní varianty MCL se v literatuře udává v širokém rozptylu 2.6 % - 39 % případů MCL (43, 45, 92, 93, 96, 100, 102, 103, 104), což odráží již dříve zmíněné rozdíly mezi použitými metodami analýzy (cytomorfologie, histologie) a též interpretační nejednotnost mezi jednotlivými specialisty. 2 případy DLBCL byly představovány centroblastickou variantou a jeden případ imunoblastickou variantou. Tyto varianty jsou u DLBCL

nejčastější (1, 105, 106, 107, 108). Transformace CLL v DLBCL nebyla v analyzovaném souboru zaznamenána. Podobný cytomorfologický obraz mohou mít folikulární lymfom vyššího gradingu a v širším kontextu též některé T-buněčné lymfomy, např. periferní T-buněčný lymfom, blíže nespecifikovaný, a též blastická plazmocytoidní neoplázie z dendritických buněk.

Anaplastický typ je charakteristický pro anaplastickou variantu DLBCL, kterou je nutno odlišit od anaplastického velkobuněčného lymfomu. V analyzovaném souboru se nalezl jeden případ anaplastické varianty CD5+ DLBCL.

Intratumorózní morfoloická variabilita

Dynamická variabilita individuálních biologických vlastností nádoru je všeobecně známou skutečností a dotýká se jeho morfoloického charakteru, imunofenotypu, genetického profilu, alterací protinádorového imunitního dozoru, mikroprostředí nádoru i jeho klinického chování. Tato intratumorózní variabilita má časový a místní rozměr, tj. proměnlivost vlastností nádoru v průběhu jeho vývoje a během léčby a současně též existence rozdílů mezi jednotlivými kompartmenty nádoru. Dokladem popsaného faktu v analyzovaném souboru jsou pozorované rozdíly cytomorfologického nálezu u několika případů CLL (atypická CLL v periferní krvi s typickou cytomorfologií v kostní dřeni), 2 případů MCL (klasický MCL v periferní krvi versus pleomorfní varianta v kostní dřeni a malobuněčná varianta v periferní krvi versus pleomorfní obraz v kostní dřeni) a 2 případů MZL (malobuněčný obraz v periferní krvi a lymfatické uzlině s pleomorfním obrazem v kostní dřeni, malobuněčný obraz v kostní dřeni a pleomorfní obraz v cerebrospinálním likvoru). Intratumorózní variabilita je tedy významným faktorem, který musíme brát do úvahy při diferenciální diagnostice lymfomů.

8.2 Imunofenotyp zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií

8.2.1 Konstrukce diagnostického panelu

Imunofenotypizační charakteristika zralých B-lymfoidních neoplázií je dnes komplexnější díky využití širších typizačních panelů (109). Vlastní diagnostický panel byl sestaven s ohledem na dříve zmíněná literární doporučení (5, 13, 14). Vzhledem k potřebě univerzálnosti použití zahrnoval panel také markery pro diagnostiku vlasatobuněčné leukémie (CD11c, CD25, CD103) a další znaky s potenciálem zpřesnění

diferenciální diagnostiky (CD35, CD43, CD95, CD200). Při tvorbě panelu byla částečně využita také doporučení skupiny EuroFlow (109, 110). Jedním z východisek byly též technické možnosti použitého průtokového cytometru.

8.2.2 Diagnostický význam analyzovaných markerů

Znak CD5 byl vzhledem k definici analyzovaného souboru exprimován s převažující vysokou intenzitou exprese u všech analyzovaných případů CLL/SLL, MZL, DLBCL a většiny případů MCL. Byl prokázán statisticky významný rozdíl v intenzitě exprese tohoto znaku mezi CLL/SLL a MCL a CLL/SLL a CD5+ MZL. 3 případy MCL byly CD5-negativní (diskuzi k atypickému MCL viz níže). Informativní hodnota exprese znaku při diferenciální diagnostice nepatřila mezi nejvyšší. CD5-pozitivita je zcela charakteristická pro CLL/SLL a MCL, u ostatních zralých B-buněčných neoplázií se vyskytuje daleko méně často, jak bylo podrobně uvedeno v kapitole 5 a 6. Přesto musí být každý případ CD5-pozitivní B-lymfoidní neoplázie posuzován komplexně s vědomím existence vzácnějších CD5-pozitivních lymfoproliferací (B-PLL, MZL, DLBCL, LPL, FL a BL)

Pan-B-lymfocytární znaky CD19, CD20, CD22 a CD79b měly rozdílnou úroveň exprese ve skupině CLL/SLL a v ostatních skupinách. Ve skupině CLL/SLL byla intenzita exprese těchto znaků výrazně nižší než v ostatních skupinách. Analýza prokázala statisticky významné rozdíly intenzity exprese markerů CD20, CD22 a CD79b mezi CLL/SLL a MCL, CLL/SLL a CD5+ MZL a u znaku CD79b též mezi MCL a CD5+ MZL. Intenzita exprese CD20 a CD79b patřila mezi faktory s nejvyšší diferenciálně diagnostickou informační hodnotou při rozlišení mezi CLL/SLL a MCL a mezi CLL/SLL a CD5+ MZL, totéž platilo pro znak CD79b při rozlišení MCL a CD5+ MZL. Byly potvrzeny a upřesněny známé údaje o expresi pan-B-lymfocytárních znaků u zmíněných diagnostických skupin, tj. jejich nízkou úroveň exprese u CLL a vysokou úroveň exprese u ostatních CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií (1, 3, 5, 9, 10, 11, 12, 14, 31, 33, 34, 46, 111). Navíc se intenzita exprese CD79b jeví jako vhodný nástroj odlišení části případů MCL a CD5+ MZL.

Rozdíly v intenzitě exprese **lehkých řetězců imunoglobulinů kappa a lambda** měly podobný charakter jako u pan-B-lymfocytárních antigenů. Analýza prokázala statisticky významné rozdíly intenzity exprese lehkých řetězců imunoglobulinů typu kappa mezi CLL/SLL a MCL a CLL a CD5+ MZL, u lehkých řetězců lambda nebyl rozdíl tak výrazný. Ve

skupině CLL/SLL lehce převažoval typ lehkých řetězců kappa, nepatrná převaha lehkých řetězců kappa byla zaznamenána také u MCL (literatura udává převahu lambda-forem MCL). Lehké řetězce kappa výrazně převažovaly u případů CD5+ MZL, všechny případy DLBCL byly kappa-pozitivní. U CLL/SLL tvořilo 10 % případů null typ, podobný nález byl jinak přítomen pouze u jediného vzorku MCL. Marker kappa patřil mezi nejinformativnější markery při rozlišení CLL a CD5+ MZL. Byly potvrzeny a upřesněny známé údaje o expresi lehkých řetězců imunoglobulinů u uvedených diagnostických skupin, tj. jejich klíčový význam pro stanovení klonality v případě lehkých řetězců Ig, nízkou expresi u CLL a zřetelnou expresi u ostatních CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií (1, 3, 5, 9, 10, 11, 12, 14, 31, 33, 34, 46, 111).

Znak CD23 byl exprimován u více nežli 80 % vzorků CLL/SLL, většinou s nízkou či střední intenzitou exprese. V ostatních diagnostických skupinách se tento znak nevyskytoval s výjimkou jediného případu v kategorii neklasifikovatelných zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií. Byl prokázán statisticky významný rozdíl intenzity exprese toho markeru mezi CLL/SLL a MCL a CLL a CD5+ MZL. Statisticky významný rozdíl v intenzitě exprese znaku u CD5+ MZL a MCL neexistoval. Intenzita exprese CD23 patřila mezi faktory s nejvyšší diferenciací diagnostickou informační hodnotou při rozlišení mezi CLL/SLL a MCL a mezi CLL/SLL a CD5+ MZL. Nepřítomnost CD23 byla nejčastějším nálezem u případů CLL s atypickým imunofenotypem. Potvrdili a upřesnili jsme klíčový diferenciací diagnostický význam znaku CD23 u CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií uváděný v literatuře, tj. jeho vysoký výskyt u CLL a spíše ojedinělou přítomnost u jiných CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií (1, 3, 5, 9, 10, 11, 12, 14, 31, 33, 34, 46, 112, 113, 114, 115). Exprese CD23 neodlišuje MCL od CD5+ MZL.

Znak FMC7 byl negativní u téměř 97 % vzorků CLL/SLL, naopak byl pozitivní u většiny MCL (84 %, vysoká úroveň exprese) a CD5+ MZL (64 %, střední úroveň exprese), 75 % vzorků CD5+ DLBCL a 71.4 % neklasifikovatelných případů. Byl prokázán statisticky významný rozdíl v intenzitě exprese znaku mezi CLL/SLL a MCL a CLL/SLL a CD5+ MZL. Tento znak patřil mezi nejinformativnější markery při rozlišení CLL/SLL a MCL a CLL/SLL a CD5+ MZL. Byl potvrzen klíčový diferenciací diagnostický význam znaku FMC7 u CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií uváděný v literatuře, tj. jeho převažující

negativitu u CLL a převažující pozitivitu u MCL a CD5+ MZL (1, 3, 5, 9, 10, 11, 12, 14, 31, 33, 34, 46, 112, 113). Při odlišení MCL a CD5+ MZL nemá FMC7 valný význam.

Znak CD35 byl analyzován z důvodu zpřesnění diagnostiky CD5+ MZL. Byl negativní u 87.9 % vzorků CLL/SLL, pozitivní u 52.6 % vzorků MCL (nízká úroveň exprese), 18.2 % vzorků CD5+ MZL (nízká úroveň exprese), 25 % vzorků CD5+ DLBCL a 42.9 % vzorků neklasifikovatelných případů. Byl prokázán statisticky významný rozdíl v intenzitě exprese znaku mezi CLL/SLL a MCL a CLL/SLL a CD5+ MZL. Informativní hodnota při diferenciální diagnóze však byla nižší. Z hlediska diferenciální diagnostiky CLL/SLL a MCL a CD5+ MZL jde o znak redundantní a ani při rozlišení MCL a CD5+ MZL není příliš cenný.

Znak CD38 byl pozitivní u 38.2 % vzorků CLL/SLL a 36.3 % vzorků CD5+ MZL (střední úroveň exprese), 81.6 % vzorků MCL (vysoká úroveň exprese), 75 % vzorků CD5+ DLBCL (vysoká úroveň exprese) a malé části neklasifikovatelných případů. Byl prokázán statisticky významný rozdíl v intenzitě exprese tohoto znaku mezi CLL/SLL a MCL a MCL a CD5+ MZL. Tento znak patří mezi nejinformativnější markery při rozlišení CLL/SLL a MCL a MCL a CD5+ MZL. Literatura udává výskyt CD38 až u 76 % případů CLL, 98 % případů MCL a 77 % případů SMZL (116). Z pohledu naší analýzy se ovšem intenzita exprese markeru CD38 jeví jako velmi důležitá při rozlišení CLL/SLL a MCL a MCL a CD5+ MZL.

Znak CD43 byl pozitivní u 90.8 % vzorků CLL/SLL (střední úroveň exprese), 26.1 % MCL (nízká úroveň exprese), 25 % CD5+ DLBCL a pouze u jediného CD5+ MZL. Ve skupině neklasifikovatelných případů se tento znak nevyskytl. Byl prokázán statisticky významný rozdíl v intenzitě exprese tohoto znaku mezi CLL/SLL a MCL a CLL a CD5+ MZL. Tento znak patřil mezi neinformativnější markery při rozlišení CLL/SLL a MCL a CLL/SLL a CD5+ MZL. Literární údaje o expresi znaku CD43 u CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií jsou omezené, vycházejí většinou z imunohistochemických nálezů a postulují pozitivitu CD43 také u MCL (1, 117, 118, 119). Teprve recentně publikovaná práce autorů Sorigué a spol. (120) se podrobně zabývala flow-cytometrickou analýzou exprese znaku CD43 u chronických lymfoproliferativních onemocnění a prokázala pozitivní korelaci exprese CD43 a hodnot CLL skóre. Výsledky

této práce se shodují s naším zjištěním o mimořádné důležitosti tohoto markeru v diferenciální diagnostice CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií.

Znak CD25 byl exprimován u 39.3 % vzorků CLL/SLL (střední úroveň exprese), 65.8 % vzorků MCL (střední úroveň exprese), 54.5 % vzorků CD5+ MZL (nízká úroveň exprese) a 75% vzorků CD5+ DLBCL a neklasifikovatelných případů. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v intenzitě exprese tohoto markeru mezi hodnocenými diagnostickými skupinami. Také literatura udává vysoký výskyt tohoto znaku u CD5-pozitivních lymfoidních neoplázií v rozmezí 66 – 89 % (116). Z hlediska diferenciální diagnostiky těchto chorob lze tedy marker CD25 považovat za méně přínosný s výjimkou odlišení některých případů MCL a CD5+ MZL.

Znak CD10 s nízkou úrovní exprese jsme pozorovali pouze u jednoho případu MCL a jednoho případu u CD5+ DLBCL. Expresí znaku CD10 u CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií je velmi vzácná a nejlépe je popsána v případě MCL s atypickým imunofenotypem (45, 46, 47, 121).

Znak CD11c byl pozitivní pouze u 45.4 % vzorků CD5+ MZL (nízká úroveň exprese) a 12.7 % vzorků CLL. U MCL byla jeho pozitivita ojedinělá. Byl prokázán statisticky významný rozdíl v intenzitě exprese tohoto znaku mezi CLL/SLL a MCL a MCL a CD5+ MZL, ovšem v této souvislosti je nutné upozornit na skutečnost, že jde o rozdíly v pásmu poměrně nízkých hodnot MFI. Literatura udává pozitivitu CD11c u 4 – 89 % případů CLL, nečetných případů MCL a velké části MZL, zejména SMZL (až 80 %) (55, 56, 57, 58, 119, 122, 123, 124). Z tohoto pohledu má marker CD11c zvláštní důležitost zejména při rozlišení MCL a CD5+ MZL.

Znak CD200 byl exprimován u 98.3 % vzorků CLL/SLL (vysoká úroveň exprese), 63.6 % vzorků MZL (vysoká úroveň exprese) a pouze 7.9 % vzorků MCL. U CD5+ DLBCL byl znak pozitivní v 75 % (střední úroveň exprese). Znak byl většinou pozitivní také ve skupině neklasifikovatelných případů (71.4 %, střední úroveň exprese). Byl prokázán statisticky významný rozdíl v intenzitě exprese znaku mezi CLL/SLL a MCL. Pozorované rozdíly intenzity exprese mezi MCL a CD5+ MZL nebyly statisticky významné. Znak CD200 patřil mezi nejinformativnější markery při rozlišení CLL/SLL a MCL a podle našeho názoru též mezi MCL a CD5+ MZL. Literatura z posledních let zdůrazňuje klíčový význam exprese

CD200 při rozlišení CLL a MCL (15, 16, 17, 18, 125). Důležité je také zjištění, že marker CD200 bývá pozitivní také u většiny případů CLL s atypickým imunofenotypem (125), což bylo pozorováno též v analyzovaném souboru. V případě MZL se údaje o expresi CD200 různí, některé práce popisují expresi CD200 u MZL včetně SMZL jako negativní (18, 126), v jiných pracích byla u významné části MZL prokázána pozitivita CD200 (125, 15, 127).

Znak CD95 byl do panelu zařazen z důvodu očekávaného zlepšení identifikace CD5+ MZL. Vyskytl se ovšem pouze u dvou vzorků CD5+ MZL a dvou vzorků CD5+ DLBCL. Jeho diferenciálně diagnostický význam u MZL zdůrazňovaný některými autory (60, 61) lze proto považovat za sporný.

Znak CD103 nebyl prokázán u žádného z vyšetřených případů. Tento nálezný do jisté míry potvrzuje údaj o vysoké specifitě tohoto markeru pro diagnózu vlasatobuněčné leukémie. Na našem pracovišti byla exprese znaku CD103 kromě vlasatobuněčné leukémie pozorována pouze v jediném případě CLL.

Případy atypické exprese uvedených znaků jsou popsány níže.

8.2.3 Diagnostický význam kombinací informativních markerů

Využití hodnocení intenzity exprese kombinací informativních markerů výrazně zvyšuje přesnost diferenciální diagnostiky také v případě zralých CD5-pozitivních lymfoidních neoplázií. Z analýzy diagnostického přínosu expresní úrovně dvojkombinací a trojkombinací markerů použitých v imunofenotypizačním panelu vyplývá, že za nejinformativnější lze v tomto ohledu považovat při diagnostice CLL/SLL, MCL a CD5-pozitivního MZL znaky CD20, CD79b, CD23, CD43, CD38, CD11c, FMC7, CD200 a lehkých řetězců kappa a zejména jejich kombinace. Využití těchto kombinací dává předpoklad efektivizace imunofenotypizační diagnostiky minimalizací počtu vyšetřovaných znaků. Odlišení MCL od CD5+ MZL pomocí použitého imunofenotypizačního panelu a kvantifikace exprese diagnostických znaků bylo méně přesné než odlišení CLL/SLL od MCL a odlišení CLL/SLL od CD5+ MZL. Další zpřesnění této diferenciální diagnostiky vyžaduje v současnosti stanovení cyklinu D1, SOX11 a t(11; 14) pomocí imunohistochemie a molekulární cytogenetiky. Konstrukce datových sítí umožnila instruktivní vizualizaci rozdílů imunofenotypového expresního

profilu mezi CLL/SLL, MCL a CD5+ MZL a zpřesnila jejich vzájemné rozlišení oproti standardnímu hodnocení positivity/negativity exprese. Představuje tak možný prvek diferenciální diagnostiky u nových a diagnosticky obtížnějších případů, neboť poskytuje detailnější, komplexnější a přesnější informaci o analyzovaných datech. Modely kvantitativní multiparametrové imunofenotypizační analýzy představují moderní perspektivu diagnostiky u lymfoidních neoplázií (109, 110, 128). Jednou z nich je též automatická interpretace expresního profilu imunofenotypu s využitím rozhodovacích stromů (129).

8.2.4 Diagnostický význam CLL skóre

I v současné době zůstává CLL skóre vynikajícím nástrojem diferenciální diagnostiky CLL a non-CLL lymfoidních neoplázií. V analyzovaném souboru vykazalo pouze 5 % vzorků CLL skóre 3, což je v souladu s recentními literárními údaji (118). CLL skóre 3 a 4 se vyskytlo pouze u dvou atypických případů MCL, všechny ostatní analyzované případy měly CLL skóre 0-2. Markery využitě při konstrukci CLL skóre patří podle naší analýzy mezi neinformativnější faktory diferenciální diagnostiky CLL, MCL a CD5+ MZL. Diferenciálně diagnostickou výzvu představují případy s CLL skóre 3, u kterých je k přesné klasifikaci nezbytné využití ostatních informativních markerů, zejména CD200 (125, 126, 130). Vizualizace imunofenotypového expresního profilu pomocí datové sítě neprokázala unikátní či jednotný vzorec imunofenotypu u skupin CLL s CLL skóre 3, 4 a 5.

8.2.5 Atypický (variantní) imunofenotyp CLL a MCL

WHO klasifikace nádorů hematopoetické a lymfoidní tkáně uvádí, že případy **atypické CLL** vykazují vyšší expresi antigenů CD19, CD20, CD22 a CD79b a sIg včetně lehkých řetězců a některé případy mohou být také CD5-negativní, CD23-negativní nebo FMC-positivní (1). Z jiného pohledu lze atypickou CLL definovat jako případ s CLL skóre nižším nežli 4 (125). Nejčastější atypii v rámci hodnocení CLL skóre byla u aberantních případů CLL negativita CD23 (19.8 %) následovaná vysokou expresí lehkých řetězců imunoglobulinů (9.0 %), pozitivita FMC7 (3.0 %) a vysoká exprese CD79b (1.8 %). Ostatní atypie imunofenotypu zahrnovaly vysokou intenzitu exprese CD20 (8.3 %) a CD22 (13.8 %), která se často vyskytovala současně (více nežli polovina případů

s vysokou intenzitou exprese CD20 vykazovala také vysokou intenzitou exprese CD22). Zajímavým zjištěním byla skutečnost, že ve skupině atypické CLL s vysokou intenzitou exprese CD20 se výrazně častěji objevily případy s CLL skóre 3 (43 % versus 5.3 % v celé skupině CLL). Všechny případy atypické CLL byly CD200-pozitivní, což popisuje též literatura (125), naopak všechny vzácné CD200-negativní případy CLL měly CLL skóre 5. Znak CD200 je tedy mimořádně důležitým nástrojem diferenciální diagnostiky CLL s atypickým imunofenotypem a Sandes et al. považují diagnózu případů s CLL skóre 3 a současnou CD200-pozitivitou za jistou CLL (125). Zajímavým nálezem byla také převažující CD43-negativita ve skupině CLL se skóre 3 (63.0 % versus 9.0 % v celé skupině CLL). Z tohoto pohledu mizí důležitý diferenciálně diagnostický význam exprese CD43 mezi CLL se skóre 3 a CD5-pozitivními non-CLL lymfoidními neopláziemi.

Variantní imunofenotyp MCL se vyznačuje atypickou expresí jednoho či více znaků charakteristických pro MCL (přítomnost cyklinu D1, pozitivita pan-B-lymfocytárních markerů, CD5, FMC7, CD38; negativita CD23, CD10 a CD200) (46).

Výskyt variantních imunofenotypových forem MCL není výjimečný, některé práce udávají jejich zastoupení až ve 40 % všech případů MCL (46). CD5-negativní formy MCL mohou tvořit až 12 % všech případů MCL a jsou popsány u všech morfologických typů MCL (42, 43, 44, 45, 46). V analyzovaném souboru se vyskytly 3 případy CD5-negativního MCL, u kterých byla negativita CD5 jednoznačně verifikována také imunohistochemicky. CD5-negativita byla u těchto lymfomů jedinou odchylkou od většinového imunofenotypu MCL. Exprese znaků CD23 a FMC7 je důležitým prvkem odlišení MCL a CLL v typických případech (112, 113, 114). Pozitivita znaku CD23 se ovšem udává v rozmezí 0 - 45 % všech případů MCL (46, 112, 113, 114) a až 40 % případů MCL může být FMC7-negativní (112, 113, 114). Pozitivita CD23 u MCL nebyla v analyzovaném souboru pozorována. FMC-7 byl v hodnoceném souboru negativní u menšiny případů (16 % vzorků), ovšem na našem pracovišti byla popsána sestava případů MCL s negativitou tohoto znaku až ve 40 %. Vzácnou aberací imunofenotypu u MCL je pozitivita CD10, která je jinak typická pro FL a část DLBCL (45, 47, 121). Tato atypie se vyskytuje u MCL s frekvencí až 11 % a může se kombinovat s jinými variantami imunofenotypu, např. s CD5-negativitou (45, 46). V analyzovaném souboru se našel 1 případ CD10-pozitivního MCL, který byl současně FMC7-negativní.

V souboru se také vyskytly též ojedinělé případy CD38-negativního MCL. V rozporu s některými literárními údaji (1, 116, 117) byla většina vyšetřených případů MCL CD43-negativní se statisticky významným rozdílem v intenzitě exprese tohoto znaku mezi CLL a MCL a vysokou informativní hodnotou intenzity exprese CD43 při diferenciální diagnostice CLL a MCL. Při diagnostických rozpacích lze využít některých méně využívaných markerů, např. CD148 a CD160 (131, 132). Literatura uvádí, že nebyla prokázána souvislost výskytu variantních imunofenotypových forem MCL a jeho morfologických variant (46), a ani v analyzovaném souboru se takový jev nevyskytl.

Na okraj údajů o imunofenotypové variabilitě MCL lze uvést též fakt, že u některých jiných B-lymfoidních neoplázií, např. DLBCL, se velmi vzácně můžeme setkat s nadměrnou expresí cyklinu D1 (133).

V kontextu atypických imunofenotypových nálezů u CLL a MCL je třeba zdůraznit, že variabilita imunofenotypu může souviset kromě přirozené fenotypové pestrosti také s izotypem a klonem použité monoklonální protilátky a druhem konjugovaného fluorochromu.

8.2.6 Intratumorální variabilita imunofenotypu

Dynamická variabilita individuálních biologických vlastností nádoru se týká též jeho imunofenotypu. Stejně jako v případě morfologie se imunofenotyp může vyvíjet v čase a jeho proměnlivost lze pozorovat též v podobě rozdílů mezi jednotlivými kompartmenty nádoru.

Dokladem popsaného faktu v analyzovaném souboru jsou pozorované rozdíly imunofenotypového profilu mezi vzorky periferní krve, kostní dřeně, resp. lymfatické uzliny či cerebrospinálního likvoru u několika případů CLL, MCL i MZL. Tyto rozdíly se týkaly exprese řady CD antigenů. U CLL vedly např. k rozdílům v CLL skóre, jiným příkladem je případ nodálního lymfomu z marginální zóny, u něhož kontrastovala slabá pozitivita markeru CD5 na neoplastických buňkách v kostní dřeni a lymfatické uzlině s jeho úplnou negativitou na patologických lymfocytech periferní krve. Vzácně se v analyzovaném souboru vyskytly též 2 případy biklonální CLL. Také v případě imunofenotypu je intratumorální variabilita důležitým faktorem diferenciální diagnostiky lymfoidních neoplázií.

9. Závěry

Závěry práce s ohledem na definici jejích cílů v kapitole 2 jsou následující:

1. Diagnostika zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií musí být komplexní a multidisciplinární. Jednotlivé diagnostické modalities jsou komplementární a vykazují diagnostický synergismus. Respekt k této skutečnosti a vědomí určité diagnostické nejistoty (existence falešně pozitivních a falešně negativních výsledků) je základem objektivní diagnostiky v hematologii. Práce shrnula aktuální teoretické poznatky o cytomorfolologii a imunofenotypu zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií.
2. Diagnostický imunofenotypizační panel sloužící k flow-cytometrické diferenciální diagnostice zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií zahrnoval stanovení povrchové exprese znaků CD19, CD20, CD22, CD79b, CD5, CD23, FMC7, CD10, CD35, CD38, CD43, CD25, CD103, CD11c, CD95 a lehkých řetězců kappa a lambda.
3. Na základě analýzy cytomorfologie a imunofenotypu souboru zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií lze konstatovat:

3.1 Cytomorfologické vyšetření a stanovení imunofenotypu průtokovou cytometrií jsou u zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií rychlé a komplementární diagnostické metody s vysokou diagnostickou výtěžností. U CLL je kombinace těchto metod spolu s výsledkem hemogramu plně postačující pro stanovení konečné diagnózy nemoci.

3.2 V případě cytomorfologie zralých CD5-pozitivních B-lymfoidních neoplázií bylo předloženo praktické rozdělení na definované morfologické typy usnadňující diferenciální diagnostiku (typ malobuněčný včetně plazmocelulární diferenciace, malobuněčný typ s prolymfocyty, prolymfocytární typ, centrocytoidní typ s jadernými atypii, pleomorfní typ, typ se středně velkými či monocytoidními lymfocyty, typ s vilózními lymfocyty, blastoidní typ, anaplastický typ). CD5-pozitivní B-lymfoidními neopláziemi jsou charakteristické značnou pestrostí

cytomorfologického obrazu a mezi jednotlivými diagnostickými entitami existuje poměrně velký překryv cytologického obrazu. Proto může být vzájemné odlišení řady případů pouze na cytomorfologickém základě značně obtížné až nemožné.

3.3 S využitím popsaného imunofenotypizačního panelu bylo možno velmi spolehlivě odlišit CLL/SLL od MCL a CLL/SLL od CD5+ MZL. V diferenciální diagnostice CLL/SLL a MCL byla nejcennější analýza intenzity povrchové exprese znaků CD200, CD23, FMC7, CD79b, CD20, CD43 a CD38, v případě rozlišení CLL/SLL a CD5+ MZL šlo o markery CD79b, CD23, CD43, FMC7, CD20, CD11c a lehký řetězec kappa. Diagnosticky složitější mohou být případy atypické CLL a MCL s variantním imunofenotypem. U nich zůstává vynikajícím diagnostickým nástrojem pečlivé stanovení CLL skóre, ke kterému přistupuje expresní profil znaků CD200, CD43 a CD38. Vzácné případy CLL se skóre 3 nevykazovaly unikátní a jednotný expresní profil imunofenotypu. I přes využití poměrně širokého imunofenotypizačního panelu existovaly problémy při spolehlivém odlišení MCL od CD5-pozitivního MZL. Statistické rozdíly v intenzitě exprese analyzovaných markerů nebyly příliš významné a rozlišení MCL a CD5+ MZL pomocí kombinací informativních markerů bylo méně přesné nežli v případě odlišení od CD5+ MZL od CLL/SLL. Přestože jde spíše o marginální oblast diferenciální diagnostiky, neboť většina MZL je CD5-negativní a většina MCL CD5-pozitivní, je třeba hledat další imunofenotypové charakteristiky pro odlišení MCL a CD5+ MZL. Vždy je též nutné pečlivé cytomorfologické vyšetření, protože nález vilózních nebo viloidních lymfocytů je značně specifický pro splenický MZL. Další zpřesnění diferenciální diagnostiky MCL a CD5+ MZL vyžaduje v současnosti stanovení cyklinu D1, SOX11 a t(11; 14) pomocí imunohistochemie a molekulární cytogenetiky.

3.4 Diagnosticky významné rozdíly imunofenotypu mezi CLL/SLL, MCL a CD5+ MZL lze přehledně vizualizovat pomocí datových sítí, které spolu s výsledky ostatních analýz poukázaly na fakt, že imunofenotypové difference mezi CLL/SLL a MCL a CLL/SLL a CD5+ MZL jsou výraznější nežli rozdíl mezi MCL a CD5+ MZL. Rozlišení jednotlivých jednotek s využitím datové vizualizace založené na sítích vycházející z MFI analyzovaných znaků bylo daleko přesnější nežli jejich rozlišení s využitím

standardního hodnocení na základě positivity/negativity. Vizualizace prostřednictvím sítí poskytuje komplexnější a rozmanitější informace o vztazích a substrukturách skrytých v datech. Například struktura datové sítě MCL postulovala přítomnost minimálně 2 podskupin pacientů, jejichž bližší charakteristika a objasnění event. souvislosti s průběhem onemocnění vyžaduje další analýzy.

3.5 Diagnostická interpretace dat získaných analýzou průtokovou cytometrií se obvykle realizuje jako komplexní expertní posouzení imunofenotypového profilu detekované neoplastické populace. Snaha o optimalizaci a standardizaci v této oblasti vedla ke konstrukci matematických modelů, jejichž využití minimalizuje subjektivitu hodnocení na expertní bázi. Rutinní použití kvantitativního hodnocení expresního profilu vyžaduje další optimalizaci navržených biomedicínských modelů. Jednou z perspektiv založených na výsledcích práce je automatická interpretace expresního profilu imunofenotypu s využitím rozhodovacích stromů.

10. Abecední seznam zkratk

ABC aktivovaný B-lymfocyt
ADP adenosindifosfát
AIDS syndrom získaného selhání imunity
ALK anaplastic lymphoma kinase
APC allofykocyanin
BCR B-buněčný receptor
C3d C3d složka komplementu
CD cluster of differentiation
ČR Česká republika
BD Becton Dickinson
BCL2 B-cell lymphoma 2
BCL6 B-cell lymphoma 6
B-PLL B-prolymfocytární leukémie
CCND1 gen kódující cyklin D1
CGH komparativní genomická hybridizace
cIgM cytoplazmatický imunoglobulin M
CL cerebrospinální likvor
CLL chronická lymfocytární leukémie
CLL/PL chronická lymfocytární leukémie s prolymfocyty
CNS centrální nervový systém
Cy 5, 5.5, 7 cyanin 5, 5.5, 7
Del delece
DLBCL difuzní velkobuněčný B-lymfom
DNA deoxyribonukleová kyselina
EBV Epstein – Barrové virus
FACS fluorescence activating cell sorting
FITC fluoresceinizotiokyanát
FRET fluorescence resonant energy transfer
Fc krystalizující fragment imunoglobulinu

FISH fluorescenční in situ hybridizace
FMC7 konformační varianta molekuly CD20
FSC forward scatter channel
GCB B-lymfocyt germinálního centra
He-Cd helium-cadmium
IgE imunoglobulin E
IgH těžký řetězec imunoglobulinu
IGHV variabilní část genu pro těžký řetězec imunoglobulinu
IL-2, 3 interleukin 2, 3
IRF4 interferon regulační faktor 4
IWCLL mezinárodní workshop o CLL
kDa kilodalton
Ki-67 protein Ki-67 (marker buněčné proliferace)
Kr krypton
LH lymfohistiocytární buňky u Hodgkinova lymfomu
LAIR-1 leukocyte associated immunoglobulin like receptor 1
LPL lymfoplazmocytární lymfom
MALT lymfatická tkáň asociovaná se sliznicí
MESF molecules of equivalent soluble fluorochrome
MFI průměrná fluorescenční intenzita
mFISH mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace
MCL lymfom z plášťových buněk
MZL lymfom z marginální zóny
MUM-1 transkripční faktor multiple myeloma 1
MYC lidský homolog genu izolovaného z viru ptačí myelocytomatózy
NAD nikotinamidadenindinukleotid
NCI-WG National Cancer Institute – Working Group
NGS sekvenování nové generace
OX-2 OX-2 membránový glykoprotein
p krátké raménko chromozomu
PCR polymerázová řetězová reakce

PE fykoerytrin
Per-CP peridinin
PP pleurální punktát
q dlouhé raménko chromozomu
RPMI Roswell Park Memorial Institute
sIgD, M povrchový imunoglobulin D, M
SKY spektrální karyotypování
SLL lymfom z malých lymfocytů
RS Reed-Sternberg
SEKK systém externí kontroly kvality
SMZL splenický lymfom z marginální zóny
Smlg surface membrane immunoglobulin
SSC side scatter channel
t translokace
TdT terminální deoxynukleotidyltransferáza
TBNK T- a B-lymfocyt a NK-buňka
TP53 nádorový protein 53
USA Spojené státy americké
WHO Světová zdravotnická organizace
YAG yttrio-hlinitý granát
ZAP-70 zeta-chain-associated protein kinase 70

11. Reference

1. Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Fourth Edition. IARC: Lyon 2008.
2. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. 2016 May 19; 127(20):2375-90.
3. Starostka D. et al.: Možnosti diagnostiky CD5-pozitivních B-lymfoproliferací, *Onkologie* 2014; 8(3): 102-106.
4. Pecka M et al. *Praktická hematologie. Laboratorní metody*. První vydání. Nakladatelství Infiniti art, s.r.o., Český Těšín, 2010.
5. Marinov I. *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Triton, Praha. 2008.
6. Novák M. Mechanizmy navozené imunitolerance nádorových buněk cestou dráhy programové buněčné smrti u chronické lymfocytární leukémie a možnosti jejich detekce metodami průtokové cytometrie. *Dizertační práce*. Univerzita Palackého, Lékařská fakulta, Olomouc 2015.
7. Pospíšilová Š, Dvořáková D, Mayer J et al. *Molekulární hematologie*. Galén, Praha. 2013.
8. Davis BH, Holden JT, Bene MC, Borowitz MJ, Braylan RC, Cornfield D, Gorczyca W, Lee R, Maiese R, Orfao A, Wells D, Wood BL, Stetler-Stevenson M. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: medical indications. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007; 72 Suppl 1: S5-13.
9. Braylan RC. Impact of flow cytometry on the diagnosis and characterization of lymphomas, chronic lymphoproliferative disorders and plasma cell neoplasias. *Cytometry A.* 2004 Mar; 58(1):57-61.
10. Kaleem Z. Flow cytometric analysis of lymphomas: current status and usefulness. *Arch Pathol Lab Med.* 2006 Dec; 130(12):1850-8.
11. Morice WG, Kurtin PJ, Hodnefield JM, Shanafelt TD, Hoyer JD, Remstein ED, Hanson CA. Predictive value of blood and bone marrow flow cytometry in B-cell lymphoma classification: comparative analysis of flow cytometry and tissue biopsy in 252 patients. *Mayo Clin Proc.* 2008 Jul; 83(7):776-85.
12. Sánchez ML, Almeida J, Vidriales B, López-Berges MC, García-Marcos MA, Moro MJ, Corrales A, Calmuntia MJ, San Miguel JF, Orfao A. Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation. *Leukemia.* 2002 Aug; 16(8):1460-9.
13. Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, Oldaker T et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of

hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72(Suppl 1): S14-22.

14. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111: 3941-3967.

15. Alapat D, Coviello-Malle J, Owens R, Qu P, Barlogie B, Shaughnessy JD, Lorschach RB. Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol* 2012; 137(1): 93-100.

16. Palumbo GA, Parrinello N, Fargione G et al. CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2009; 33: 1212-1216.

17. Spacek M, Karban J, Radek M, Babunkova E, Kvasnicka J, Jaksa R, Berkova A, Klener P, Trnny M. CD200 expression improves differential diagnosis between chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Blood* 2014; 124: 5637.

18. Dorfman DM, Shahsafaei A. CD200 (OX-2 membrane glycoprotein) expression in B cell-derived neoplasms. *Am J Clin Pathol* 2010; 134: 726-733.

19. Böcker W, Buchwalow IB. *Immunohistochemistry: Basics and methods*. Springer. 2010.

20. Richard KK, Robinett S. Detection of genetic translocations in lymphoma using fluorescence in situ hybridization. *Methods Mol Biol* 2013; 999:189-202.

21. Teruya-Feldstein J. Getting the diagnosis right in NHL: role of immunohistochemistry and molecular diagnostic testing. *J Natl Compr Canc Netw* 2008 Apr; 6:422-7.

22. Rossi D, Khiabani H, Spina V, et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(14):2139-47.

23. Pospisilova S, Sutton LA, Malcikova J, et al. Innovation in the prognostication of chronic lymphocytic leukemia: how far beyond TP53 gene analysis can we go? *Haematologica*. 2016;101(3):263-5.

24. Rodamilans B, Munoz IG, Sarrias MR, Lozano F, Blanco FJ, Montoya G. Crystal structure of CD5 domain III reveals the fold of a group B scavenger cysteine-rich receptor. *J Biol Chem*. 2007 Apr 27;282(17):12669-77.

25. Hardy RR. B-1 B Cell Development. *J Immunol* 2006; 177:2749-2754.

26. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, et al. The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2004;13(3):279-87.

27. Doubek M, Panovská, A., Janča, J., et al. Co víme o incidenci chronické lymfocytární leukémie (CLL) a kde a jak jsou nemocní s CLL léčeni ? *Transfuzie a hematologie dnes*. 2010;16(1):11-5.

28. Eichhorst B, Dreyling M, Robak T, et al. Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2011;22 Suppl 6:vi50-4.
29. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Döhner H. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) updating the National Cancer Institute-Working Group (NCI-WG) 1996 guidelines. *Blood* 2008; 11 1: 5446-5456.
30. Kačírková P, Campr V, Karban J, Mikulenková D. Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně. Grada Publishing, a.s. Praha. 2007.
31. Inamdar KV, Bueso-Ramos CE. Pathology of chronic lymphocytic leukemia: an update. *Ann Diag Pathol* 2007 Oct; 11:363-89.
32. Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 1410-1416.
33. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994 Oct; 8:1640-5.
34. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*. 1997;108(4):378-82.
35. López C, Delgado J, Costa D, Villamor N, Navarro A, Cazorla M et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: analysis of correlations with IGHV mutational status, NOTCH1 mutations and clinical significance. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013 Oct; 52:920-7.
36. Dreyling M, Kluin-Nelemans HC, Bea S, Klapper W, Vogt N, Delfau-Larue MH et al. Update on the molecular pathogenesis and clinical treatment of mantle cell lymphoma: report of the 11th annual conference of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Leuk Lymphoma* 2013 Apr; 54:699-707.
37. Richard P, Vassallo J, Valmary S, Missouri R, Delsol G, Brousset P. „In situ-like“ mantle cell lymphoma: a report of two cases. *J Clin Pathol* 2006; 59: 995-996.
38. Starostka D, Koláček D, Mikula P, Tichý M. Cytomorfologie a imunofenotyp lymfomu z pláštových buněk. *Transfuzie Hematol. dnes*, 21, 2015, No. 4, p. 173-183.
39. Obr A, Mikešová M, Jarošová M, Procházka V, Tessoulin B, Papajík T. Diagnostika a prognostické faktory lymfomu z buněk pláště. *Transfuzie Hematol. Dnes* 2016; 22(3): 190-200.
40. Vogt N, Klapper W. Variability in morphology and cell proliferation in sequential biopsies of mantle cell lymphoma at diagnosis and relapse: clinical correlation and insights into disease progression. *Histopathology* 2013; 52(2): 334-342.
41. Bernard M, Gressin R, Lefrere F et al. Blastic variant of mantle cell lymphoma: a rare but highly aggressive subtype. *Leukemia* 2001; 15(11): 1785-1791.
42. Liu Z, Dong HY, Gorczyca W et al. CD5- mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 216-224.

43. Seok Y, Kim J, Choi JR et al. CD5-negative blastoid variant mantle cell lymphoma with complex CCND1/IGH and MYC aberrations. *Ann Lab Med* 2012; 32: 95-98.
44. Hashimoto Y, Omura H, Tanaka T, Hino N, Nakamoto S. CD5-negative mantle cell lymphoma resembling extranodal marginal zone lymphoma of MALT: a case report. *J Clin Exp Hematopathol* 2012; 52: 185-191.
45. Morice WG, Hodnefield JM, Kurtin PJ et al. An unusual case of leukemic mantle cell lymphoma with a blastoid component showing loss of CD5 and aberrant expression of CD10. *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 122-127.
46. Gao J, Peterson L, Nelson B, Goolsby C, Chen YH. Immunophenotypic variations in mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2009; 132(5): 699-706.
47. Dong HY, Gorczyca W, Liu Z et al. B-cell lymphomas with coexpression of CD5 and CD10. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 218-230.
48. Mozos A, Royo C, Hartmann E, De Jong D, Baró C, Valera A. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 2009; 94:1555-1562.
49. Cao X, Fan L, Fang C, Zhu DX, Dong HJ, Wang DM, Wang YH, Xu W, Li JY. The expression of SOX11, cyclin D1, cyclin D2, and cyclin D3 in B-cell lymphocytic proliferative diseases. *Med Oncol*. 2012 Jun; 29(2): 1190-6.
50. Xu W, Li JY. SOX11 expression in mantle cell lymphoma. *Leu Lymphoma* 2010 Nov; 51(11): 1962-7.
51. Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, Piris MA, Martin-Subero JI, Nieler I et al. Mantle cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* 2005; 105: 4445-4454.
52. Stefancikova L, Moulis M, Fabian P, Falkova I, Vasova I, Kren L, Macak J, Smardova J. Complex analysis of cyclin D1 expression in mantle cell lymphoma: two cyclin D1-negative cases detected. *J Clin Pathol*. 2009 Oct, 62 (10): 948-50.
53. Wlodarska I, Meeus P, Stul M et al. Variant t(2; 11)(p11;q13) associated with the IgK-CCND1 rearrangement is a recurrent translocation in leukemic small-cell B-non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia* 2004; 18(10): 1705-1710.
54. Rocha CK, Praulich I, Gehrke I, Hallek M, Kreuzer KA. A rare case of t(11; 22) in a mantle cell lymphoma like B-cell neoplasia resulting in a fusion of IGL and CCND1: case report. *Mol Cytogenet* 2011; 4(1): 8.
55. Matutes E, Oscier D, Montalban C, Berger F, Callet-Bauchu E, Dogan A et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia* 2008; 22: 487-495.
56. Baseggio L, Traverse-Glehen A, Petinataud F, Callet-Bauchu E, Berger F, Ffrench M. CD5 expression identifies a subset of splenic marginal zone lymphomas with higher lymphocytosis: a clinico-pathological, cytogenetic and molecular study of 24 cases. *Haematologica* 2010 Apr; 95: 604-612.
57. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houlihan A, Catovsky D. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood* 1994; 83 (6): 1558-62.

58. Troussard X, Valensi F, Duchayne E, Garand R, Felman P, Tulliez M et al. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: clinical presentation, biology and prognostic factors in a series of 100 patients GFHC. *Br J Haematol*. 1996; 93(3): 731-6.
59. Papadaki T, Stamatopoulos K, Belessi C, Pouliou E, Parasi A, Douka V, Lauotaris N, Fassas A, Anagnostopoulos A, Anagnostou D. Splenic marginal zone lymphoma: on or more entities ? A histologic, immunohistochemical and molecular study of 42 cases. *Am J Surg Pathol*. 2007 Mar; 31(3): 438-46.
60. Kost CB, Holden JT, Mann KP. Marginal zone B-cell lymphoma: A retrospective immunophenotypic analysis. *Cytometry* 2008; 74B: 282-286.
61. Nguyen PL, Harris NL, Ritz J, Robertson MJ. Expression of CD95 antigen and bcl-2 protein in non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. *Am J Pathol*. 1996; 148: 847-853.
62. Salido M, Baro C, Oscier D, Stamatopoulos K, Dierlamm J, Matutes E, Traverse-Glehen A et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-cell Lymphoma Group. *Blood* 2010; 116: 1479-1488.
63. Xu-Monette ZY, Tu M, Jabbar KJ, Cao X, Tzankov A, Visco C, Nagarajan L, Cai Q, Montes-Moreno S, An Y, Dybkaer K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Richards KL, Hsi ED, Choi WW, van Krieken JH, Huh J, Ponzoni M, Ferreri AJ, Zhao X, Møller MB, Farnen JP, Winter JN, Piris MA, Miranda RN, Medeiros LJ, Young KH. Clinical and biological significance of de novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. *Oncotarget* 2015 Mar 20; 6(8):5615-33
64. Tzankov A, Leu N, Muenst S, Juskevicius D, Klingbiel D, Mamot C, Dirnhofer S. Multiparameter analysis of homogeneously R-CHOP-treated diffuse large B cell lymphomas identifies CD5 and FOXP1 as relevant prognostic biomarkers: report of the prospective SAKK 38/07 study. *J Hematol Oncol*. 2015 Jun 14; 8:70
65. Alinari L, Gru A, Quinion C, Huang Y, Lozanski A, Lozanski G, Poston J, Venkataraman G, Oak E, Kreisel F, Park SI, Matthews S, Abramson JS, Iris Lim H, Martin P, Cohen JB, Evens A, Al-Mansour Z, Singavi A, Fenske TS, Blum KA. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: Adverse outcomes with and without stem cell transplantation in a large, multicenter, rituximab treated cohort. *Am J Hematol*. 2016 Jun; 91(4):395-9
66. Chuang WY, Chang H, Shih LY, Wang PN, Chang YS, Lin TL, Hung YS, Yeh CJ, Ueng SH, Tang TC, Kuo MC, Dunn P, Wu JH, Kao HW, Ou CW, Wan YL, Hsueh C. CD5 positivity is an independent adverse prognostic factor in elderly patients with diffuse large B cell lymphoma. *Virchows Arch*. 2015 Nov; 467(5):571-82.
67. Úbeda Romero A, Santonja C, Blanco García A, Requena L, Rodríguez Pinilla SM. De novo CD5-positive diffuse large B-Cell lymphoma: report of a case presenting with cutaneous involvement and featuring extensive intravascular dissemination on postmortem examination. *Int J Surg Pathol*. 2016 Dec; 24(8):763-768.
68. Singh D, Kapuria D, Nanua S, Gaur R. A Case of de novo CD5+ disseminated intravascular large B-cell lymphoma presenting as multiorgan failure. *Case Rep Hematol*. 2016; 2016:6239416

69. Li Y, Hu S, Zuo Z, Hong M, Lin P, Li S, Konoplev S, Wang Z, Khoury JD, Young KH, Medeiros LJ, Yin CC. CD5-positive follicular lymphoma: clinicopathologic correlations and outcome in 88 cases. *Mod Pathol*. 2015 Jun; 28(6):787-98
70. Mayson E, Saverimuttu J, Cartwright K. CD5-positive follicular lymphoma: prognostic significance of this aberrant marker? *Intern Med J*. 2014 Apr;44(4):417-22.
71. Miyoshi H, Sato K, Yoshida M, Kimura Y, Kiyasu J, Ichikawa A, Ishibashi Y, Arakawa F, Nakamura Y, Nakashima S, Niino D, Sugita Y, Ohshima K. CD5-positive follicular lymphoma characterized by CD25, MUM1, low frequency of t(14;18) and poor prognosis. *Pathol Int*. 2014 Mar; 64(3):95-103
72. Sekiguchi Y, Imai H, Wakabayashi M, Sawada T, Ichikawa K, Komatsu N, Noguchi M. CD5-positive follicular lymphoma: a case report and literature review. *Intern Med*. 2011; 50(8):899-904
73. Asplund SL, McKenna RW, Doolittle JE, Kroft SH. CD5-positive B-cell neoplasms of indeterminate immunophenotype: a clinicopathologic analysis of 26 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005 Dec; 13(4):311-7.
74. Konoplev S, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE, Jorgensen JL, Lin P. Immunophenotypic profile of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia. *Am J Clin Pathol*. 2005 Sep; 124(3):414-20.
75. Hunter ZR, Branagan AR, Manning R, Patterson CJ, Santos DD, Tournilhac O, Dorfman DM, Treon SP. CD5, CD10, and CD23 expression in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma*. 2005 Mar; 5(4):246-9.
76. Petit B, Chaury MP, Le Clorennec C, Jaccard A, Gachard N, Moalic-Judge S, Labrousse F, Cogné M, Bordessoule D, Feuillard J. Indolent lymphoplasmacytic and marginal zone B-cell lymphomas: absence of both IRF4 and Ki67 expression identifies a better prognosis subgroup. *Haematologica*. 2005 Feb; 90(2):200-6.
77. Lin P, Bueso-Ramos C, Wilson CS, Mansoor A, Medeiros LJ. Waldenstrom macroglobulinemia involving extramedullary sites: morphologic and immunophenotypic findings in 44 patients. *Am J Surg Pathol*. 2003 Aug; 27(8):1104-13.
78. San Miguel JF, Vidriales MB, Ocio E, Mateo G, Sánchez-Guijo F, Sánchez ML, Escibano L, Báez A, Moro MJ, Hernández J, Aguilera C, Cuello R, García-Frade J, López R, Portero J, Orfao A. Immunophenotypic analysis of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol*. 2003 Apr;30(2):187-95. Erratum in: *Semin Oncol*. 2002 Jun; 15(2):427.
79. D'Angelo G, Hotz AM, Monti M. Lymphoplasmacytic nonHodgkin lymphoma/Waldenström's macroglobulinemia with CD5+, CD23+, and CD10-. *Blood Res*. 2013 Dec; 48(4):300-3.
80. Randen U, Trøen G, Tierens A, Steen C, Warsame A, Beiske K, Tjønnfjord GE, Berentsen S, Delabie J. Primary cold agglutinin-associated lymphoproliferative disease: a B-cell lymphoma of the bone marrow distinct from lymphoplasmacytic lymphoma. *Haematologica*. 2014 Mar; 99(3):497-504.

81. Kim YL, Gong SJ, Hwang YH, Joo JE, Cho YU, Lee JA, Sung SA, Lee SY, Kim NY. Waldenstrom macroglobulinemia with CD5+ expression presented as cryoglobulinemic glomerulonephropathy: a case report. *J Korean Med Sci.* 2011 Jun; 26(6):824-8.
82. Dronca RS, Jevremovic D, Hanson CA, Rabe KG, Shanafelt TD, Morice WG, Call TG, Kay NE, Collins CS, Schwager SM, Slager SL, Zent CS. CD5-positive chronic B-cell lymphoproliferative disorders: diagnosis and prognosis of a heterogeneous disease entity. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010; 78 Suppl 1:S35-41.
83. Morice WG, Chen D, Kurtin PJ, Hanson CA, McPhail ED. Novel immunophenotypic features of marrow lymphoplasmacytic lymphoma and correlation with Waldenström's macroglobulinemia. *Mod Pathol.* 2009 Jun; 22(6):807-16.
84. Lin CW, O'Brien S, Faber J, Manshoury T, Romaguera J, Huh YO, Kantarjian H, Keating M, Albitar M. De novo CD5+ Burkitt lymphoma/leukemia. *Am J Clin Pathol.* 1999 Dec; 112(6): 828-35.
85. Niwano H, Aoki S, Tsukada N, Toba K, Fuse I, Kishi K, Koike T, Takahashi H, Yamamori S, Shibata A, Aizawa Y. An aggressive case of Burkitt's lymphoma with t(8;14) and c-myc rearrangement transformed from CD5+ B-cell lymphoma. *Ann Hematol.* 1997 Nov-Dec;75(5-6):221-5.
86. Felten CL, Stephenson CF, Ortiz RO, Hertzberg L. Burkitt transformation of mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2004 Oct;45(10):2143-7.
87. Yan, S., Xu, D., Yang, Q., Zhang, L., Tang, X., Zhang, H. J. (2007). Multilinear discriminant analysis for face recognition. *IEEE Transactions on Image Processing*, 16(1), 212-220.
88. Zehnalova, S., Kudelka, M., Platos, J., Horak, Z. (2014). Local representatives in weighted networks. *IEEE/ACM International Conference on Advances in Social Networks Analysis and Mining (ASONAM 2014)*, pp. 870-875. IEEE.
89. Oscier D, Else M, Matutes E, Morilla R, Strefford JC, Catovsky D. The morphology of CLL revisited: the clinical significance of prolymphocytes and correlations with prognostic/molecular markers in the LRF CLL4 trial. *Br J Haematol.* 2016 Sep;174(5):767-75.
90. Matutes E, Wotherspoon A, Catovsky D. Differential diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007 Sep;20(3):367-84.
91. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, Hamblin T, Lens D, Swansbury GJ, Catovsky D. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol.* 1996 Feb;92(2):382-8.
92. Yatabe Y., Suzuki R., Matsuno Y., Tobinai K., Ichinohazama R., Tamaru J, Mizoguchi Y, Hashimoto Y, Yamaguchi M, Kojima M, Uike N, Okamoto M, Isoda K, Ichimura K, Morishima Y, Seto M, Suchi T, Nakamura S. Morphological spectrum of cyclin D1-positive mantle cell lymphoma: Study of 168 cases. *Pathology International* 2001, 51: 747–761.
93. Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling MH, Campo E, Norton A, Berger F, Kluin P, Ott G, Pileri S, Pedrinis E, Feller AC, Merz H, Janssen D, Hansmann ML, van Krieken H, Möller P, Stein H, Unterhalt M, Hiddemann W, Parwaresch R. Histopathology, cell proliferation indices

and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the *European MCL Network*. *Br J Haematol*. 2005, 131: 29–38.

94. Peng S, Zhu F, You S, Gong M, Wen Z. Pathologic characteristics of bone marrow for CD5 positive small B cell lymphoma. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2016 Apr;41(4):374-9.

95. Wong, K.-F., Chan, J. K. C., So, J. C. C. and Yu, P.-H. Mantle cell lymphoma in leukemic phase. *Cancer* 1999, 86: 850–857.

96. Matutes E, Parry-Jones N, Brito-Babapulle V, Wotherspoon A, Morilla R, Atkinson S, Elnenaï MO, Jain P, Giustolisi GM, A'Hern RP, Catovsky D. The leukemic presentation of mantle-cell lymphoma: disease features and prognostic factors in 58 patients. *Leuk Lymphoma*. 2004 Oct;45(10):2007-15.

97. Murphy BA, Meda BA, Buss DH, Geisinger KR. Marginal zone and mantle cell lymphomas: assessment of cytomorphology in subtyping small B-cell lymphomas. *Diagn Cytopathol*. 2003 Mar;28(3):126-30.

98. Harmon CM, Smith LB. B-cell Non-Hodgkin Lymphomas with Plasmacytic Differentiation. *Surg Pathol Clin*. 2016 Mar;9(1):11-28.

99. Swerdlow SH, Kuzu I, Dogan A, Dirnhofer S, Chan JK, Sander B, Ott G, Xerri L, Quintanilla-Martinez L, Campo E. The many faces of small B cell lymphomas with plasmacytic differentiation and the contribution of MYD88 testing. *Virchows Arch*. 2016 Mar;468(3):259-75.

100. Schlette E, Bueso-Ramos C, Giles F, Glassman A, Hayes K, Medeiros LJ. Mature B-cell leukemias with more than 55% prolymphocytes. A heterogeneous group that includes an unusual variant of mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2001 Apr;115(4):571-81.

101. Oscier DG, Matutes E, Copplestone A, Pickering RM, Chapman R, Gillingham R, Catovsky D, Hamblin TJ. Atypical lymphocyte morphology: an adverse prognostic factor for disease progression in stage A CLL independent of trisomy 12. *Br J Haematol*. 1997 Sep;98(4):934-9.

102. Hjalmar V, Kimby E, Matutes E, Sundström C, Wallvik J, Hast R. Atypical lymphocytes in B-cell chronic lymphocytic leukemia and trisomy 12 studied by conventional staining combined with fluorescence in situ hybridization. *Leuk Lymphoma*. 2000 May;37(5-6):571-6.

103. Wong KF, So CC, Chan JK. Nucleolated variant of mantle cell lymphoma with leukemic manifestations mimicking prolymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2002 Feb;117(2):246-51.

104. Ott G, Kalla J, Hanke A, Müller JG, Rosenwald A, Katzenberger T, Kretschmar R, Kreipe H, Müller-Hermelink HK. The cytomorphological spectrum of mantle cell lymphoma is reflected by distinct biological features. *Leuk Lymphoma*. 1998 Dec;32(1-2):55-63.

105. Xie Z, Pittaluga S, Jaffe ES. The Histological Classification of Diffuse Large B-cell Lymphomas. *Semin Hematol*. 2015 Apr; 52(2): 57–66.

106. Carbone A, Gloghini A, Kwong ZL, Younes A. Diffuse large B cell lymphoma: using pathologic and molecular biomarkers to define subgroups for novel therapy. *Ann Hematol*. 2014; 93(8): 1263–1277.

107. Menon MP, Pittaluga S, Jaffe ES. The Histological and Biological Spectrum of Diffuse Large B-cell Lymphoma in the WHO Classification. *Cancer J*. 2012 Sep; 18(5): 411–420.

108. Ott G, Ziepert M, Klapper W, Horn H, Szczepanowski M, Bernd HW, Thorns C, Feller AC, Lenze D, Hummel M, Stein H, Müller-Hermelink HK, Frank M, Hansmann ML, Barth TF, Möller P, Cogliatti S, Pfreundschuh M, Schmitz N, Trümper L, Loeffler M, Rosenwald A. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood*. 2010 Dec 2;116(23):4916-25. doi: 10.1182/blood-2010-03-276766. Epub 2010 Aug 24.
109. Costa ES, Pedreira CE, Barrena S, Lecrevisse Q, Flores J, Quijano S, Almeida J, del Carmen García-Macias M, Bottcher S, Van Dongen JJ, Orfao A. Automated pattern-guided principal component analysis vs expert-based immunophenotypic classification of B-cell chronic lymphoproliferative disorders: a step forward in the standardization of clinical immunophenotyping. *Leukemia*. 2010 Nov;24(11):1927-33.
110. van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, Rawstron A, Asnafi V, Lécrevisse Q, Lucio P, Mejstrikova E, Szczepański T, Kalina T, de Tute R, Brüggemann M, Sedek L, Cullen M, Langerak AW, Mendonça A, Macintyre E, Martin-Ayuso M, Hrusak O, Vidriales MB, Orfao A; EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012 Sep;26(9):1908-75.
111. Cabezudo E, Carrara P, Morilla R, Matutes E. Quantitative analysis of CD79b, CD5 and CD19 in mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Haematologica*. 1999 May;84(5):413-8.
112. Ahmad E, Garcia D, Davis BH. Clinical utility of CD23 and FMC7 antigen coexistent expression in B-cell lymphoproliferative disorder subclassification. *Cytometry* 2002; 50: 1-7.
113. Garcia DP, Rooney MT, Ahmad E et al. Diagnostic usefulness of CD23 and FMC7 antigen expression patterns in B-cell lymphoma classification. *Am J Clin Pathol* 2001; 115: 258-265.
114. Gong JZ, Lagoo AS, Peters D et al. Value of CD23 determination by flow cytometry in differentiating mantle cell lymphoma from chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2001; 116: 893-897.
115. Lopez-Matas M, Rodriguez-Justo M, Morilla R, Catovsky D, Matutes E. Quantitative expression of CD23 and its ligand CD21 in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2000 Nov;85(11):1140-5.
116. Demurtas A, Stacchini A, Aliberti S, Chiusa L, Chiarle R, Novero D. Tissue flow cytometry immunophenotyping in the diagnosis and classification of non-Hodgkin's lymphomas: a retrospective evaluation of 1,792 cases. *Cytometry B Clin Cytom*. 2013 Mar;84(2):82-95.
117. Lai R, Weiss LM, Chang KL, Arber DA. Frequency of CD43 expression in non-Hodgkin lymphoma. A survey of 742 cases and further characterization of rare CD43+ follicular lymphomas. *Am J Clin Pathol*. 1999 Apr;111(4):488-94.
118. Ma XB, Zheng Y, Yuan HP, Jiang J, Wang YP. CD43 expression in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: CD43 is a marker of adverse prognosis. *Hum Pathol*. 2015 Apr;46(4):593-9.
119. Mitrovic Z, Iqbal J, Fu K, Smith LM, Bast M, Greiner TC, Aoun P, Armitage JO, Vose JM, Weisenburger DD, Chan WC. CD43 expression is associated with inferior survival in the non-germinal centre B-cell subgroup of diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2013 Jul;162(1):87-92.
120. Sorigué M, Juncà J, Sarrate E, Grau J. Expression of CD43 in chronic lymphoproliferative leukemias. *Cytometry B Clin Cytom*. 2017 Jan 10. doi: 10.1002/cyto.b.21509. [Epub ahead of print]

121. Zanetto U, Dong H, Huang Y et al. Mantle cell lymphoma with aberrant expression of CD10. *Histopathology* 2008; 53: 20-29.
122. Kilo MN, Dorfman DM. The utility of flow cytometric immunophenotypic analysis in the distinction of small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia from mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 1996; **105**:451–457.
123. Domingo A, Gonzalez-Barca E, Castellsague X et al. Expression of adhesion molecules in 113 patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship with clinicoprognostic features. *Leuk Res.* 1997; **21**:67–73.
124. Kraus TS, Sillings CN, Saxe DF, Li S, Jaye DL. The role of CD11c expression in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2010 Aug;**134**(2):271-7.
125. Sandes AF, de Lourdes Chauffaille M, Oliveira CR, Maekawa Y, Tamashiro N, Takao TT, Ritter EC, Rizzatti EG. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2014 Mar;**86**(2):98-105.
126. El Desoukey NA, Afify RA, Amin DG, Mohammed RF. CD200 expression in B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *J Investig Med.* 2012 Jan;**60**(1):56-61.
127. Brunetti L, Abate G, Gorrese M, Raia M, Pascariello C, Scalia G, Rotoli B, Del Vecchio L. CD200: a new target for immunotherapy in hematologic malignancies. Abstract 1598, ASH Annual Meeting, 2008.
128. Mizrahi O, Ish Shalom E, Baniyash M, Klieger Y.
Quantitative flow cytometry: Concerns and recommendations in clinic and research. *Cytometry B Clin Cytom.* 2017 Feb 11. doi: 10.1002/cyto.b.21515. [Epub ahead of print]
129. Breiman, L., Friedman, J., Stone, C. J., Olshen, R. A. (1984). Classification and regression trees. CRC press.
130. El Borgi W, Ben Salah N, Ben Lakhel F, Makni L, Gouider E, Hafsia R. Immunophenotyping of B chronic lymphoproliferative syndromes (CLL excluded): confrontation with the histology. *Ann Biol Clin (Paris).* 2013 Nov-Dec;**71**(6):693-7.
131. Lesesve JF, Tardy S, Frotscher B, Latger-Cannard V, Feugier P, De Carvalho Bittencourt M. Combination of CD160 and CD200 as a useful tool for differential diagnosis between chronic lymphocytic leukemia and other mature B-cell neoplasms. *Int J Lab Hematol.* 2015 Aug;**37**(4):486-94.
132. Fan L, Miao Y, Wu YJ, Wang Y, Guo R, Wang L, Shen AL, Chen YY, Xu W, Li JY. Expression patterns of CD200 and CD148 in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders and their potential value in differential diagnosis. *Leuk Lymphoma.* 2015;**56**(12):3329-35.
133. Juskevicius D, Ruiz C, Dirnhofer S, Tzankov A. Clinical, morphologic, phenotypic, and genetic evidence of cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphomas with CYCLIN D1 gene rearrangements. *Am J Surg Pathol.* 2014 May;**38**(5):719-27.

12. Přehled obrázků

Obr. 1. Provádění nátěru periferní krve a kostní dřeně

Obr. 2. Struktura antigenu CD5 (B. Rodamilans a kol., 2007) (24)

Obr. 3. CLL (zralé lymfocyty, Gumprechtovy stíny), periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 4. CLL, prolymfocytární varianta, (zralé lymfocyty, prolymfocyty), periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 5. CLL, pleomorfní varianta, (lymfocyty s jadernými atypii a nukleoly, okrajové výběžky cytoplazmy), periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 6. CLL, periferní krev, imunofenotyp CD19+CD5+CD23+CD200+kappa+ CD79b-FMC7-, průtoková cytometrie (dot plot diagramy, selektovaná populace – lymfocyty, u povrchové exprese kappa, lambda selekce B-lymfocytů), archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.

Obr. 7. MCL (pleomorfní varianta), kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 8. MCL, membránová pozitivita CD5 (8a) a intracelulární pozitivita cyklinu D1 (8b), imunohistochemie, světelná mikroskopie, zvětšení 400x, publikováno se souhlasem doc. MUDr. Martina Tichého, CSc., Ústav klinické a molekulární patologie FNOL a LF UP v Olomouci

Obr. 9. MCL, t(11; 14), FISH (sonda Kreatech ON BCL1/IGH t(11;14)Fusion), fúzní signály translokovaných chromozomů jsou vyznačeny šipkou, publikováno se souhlasem CGB laboratoře a.s.

Obr. 10. B-PLL, dva prolymfocyty, periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 11. SMZL, vilózní lymfocyty, kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 12. DLBCL, centroblastická varianta, cytospin ascitické tekutiny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 13. DLBCL, imunoblastická varianta, imprint slezinné tkáně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 14. Folikulární lymfom, centrocyty s jadernými zářezy, imprint lymfatické uzliny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 15. Waldenströmova makroglobulinemie, lymfoplazmocytoidní lymfocyty, kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 16. LPL, lymfoplazmocytoidní lymfocyty a plazmocyty, imprint lymfatické uzliny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 17. Sporadický Burkittův lymfom, cytospin pleurálního punktátu, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 18. CLL, typický cytomorfologický nále, periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 19. Typická CLL, plazmocelulární diferenciace, periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 20. Atypická CLL, varianta CLL/PL (skupina prolymfocytů), periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 21. Atypická CLL – varianta CLL/PL, periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 22. CLL, cytomorfologický nále na hranici CLL/PL a pleomorfní varianty, pleurální punktát, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 23. Atypická CLL, pleomorfní varianta, (lymfocyty s jadernými atypemi a atypemi cytoplazmy), periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 24. Atypická CLL – pleomorfní varianta (jaderné atypie, bazofilie cytoplazmy, vakuolizace cytoplazmy), periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 25. Atypická CLL, pleomorfní varianta (lymfocyty s cytoplazmatickými vakuolami), periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 26. Atypická CLL, pleomorfní varianta (středně velké lymfocyty s jadernými atypemi, silně bazofilní cytoplazma), kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 27. SLL, infiltrace lymfatické uzliny malými zralými lymfocyty, imprint lymfatické uzliny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 28. MCL, klasická morfologie s převažujícími centrocyty, imprint lymfatické uzliny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 29. MCL, klasická morfologie s převažujícími centrocyty a přítomností „buttock cells“, nátěr kostní dřeně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 30. MCL, malobuněčná („CLL-like“) varianta, převaha malých zralých lymfocytů, nátěr kostní dřeně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 31. MCL, malobuněčná varianta, imprint lymfatické uzliny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 32. MCL, pleomorfní varianta (anizocytóza, anizomorfie, jaderné atypie a přítomnost nukleolů), nátěr kostní dřeně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 33. MCL, pleomorfní varianta s prolymfocytoidními rysy (v popředí jaderné atypie), nátěr kostní dřeně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 34. MCL, pleomorfní varianta, lymfocyty s výraznými nukleoly podobné prolymfocytům, nátěr kostní dřeně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 35. MCL, pleomorfní varianta s bilobárními jádry, nátěr kostní dřeně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 36. MCL, blastoidní varianta, nátěr kostní dřeně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv autora, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 37. MCL, blastoidní varianta, kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 38. MCL, varianta podobná lymfomu z marginální zóny, nátěr kostní dřeně, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 39. CD5+ MZL, zralé lymfocyty, diskrétní nepravidelnosti cytoplazmy, periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 40. CD5+ MZL, zralé lymfocyty s plazmocytoidní diferenciací, periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 41. CD5+ MZL, převážně malobuněčný obraz, zčásti s plazmocelulární diferenciací, kostní dřev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 42. CD5+ MZL, středně velké lymfocyty s naznačenou plazmocytoidní diferenciací, s jádérky a vakuolizací cytoplazmy, kostní dřev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 43. CD5+ MZL, velký lymfocyt se dvěma jádérky blízky prolymfocytu, kostní dřev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 44. CD5+ MZL, středně velké lymfocyty „monocytoidního vzhledu“, periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 45. CD5+ SMZL (SLVL), vilózní lymfocyty, kostní dřev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 46. CD5+ MZL, pleomorfní obraz, kostní dřev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 47. CD5+ MZL, pleomorfní obraz, cytopsin cerebrospinálního likvoru, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 48. Plazmablastický lymfom jakožto transformace MZL, imprint lymfatické uzliny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 49. CD5+ DLBCL, infiltrace lymfatické uzliny převažujícími centroblasty s výraznými jádérky, imprint lymfatické uzliny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 50. CD5+ DLBCL, infiltrace imiunoblasty, kostní dřev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 51. CD5+ DLBCL, imunoblastická varianta, kostní dřev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 52. CD5+ DLBCL, leukemizace centroblastů, periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 53. CD5+ DLBCL, anaplastická varianta, imprint lymfatické uzliny, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1000x, archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., foto autora

Obr. 54. Variabilita exprese lehkých řetězců kappa u CLL (5 případů CLL, dvouparametrové dot-plot diagramy, exprese lehkých řetězců kappa na svislé ose, gating z B-lymfocytů, logaritmická

škála exprese na obou osách), archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.

Obr. 55. Variabilita exprese znaku CD5 u CLL (3 případy CLL, dvouparametrové dot-plot diagramy CD19/CD5, exprese CD5 na svislé ose, gating z lymfocytů, logaritmická škála exprese na obou osách), archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.

Obr. 56. Variabilita exprese znaku CD200 u CLL (2 případy CLL, dvouparametrové dot-plot diagramy CD19/CD200, exprese CD200 na svislé ose, gating z lymfocytů, logaritmická škála exprese na obou osách), archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.

Obr. 57. Pozitivita CD10 u MCL (dvouparametrové dot plot diagramy, CD20 na vodorovné a CD10 na svislé ose, gating z B-lymfocytů, logaritmická škála exprese na obou osách), archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.

Obr. 58. Variabilita exprese znaků CD20 a CD22 (dvouparametrové dot plot diagramy, CD20 na vodorovné a CD22 na svislé ose, gating z B-lymfocytů, logaritmická škála exprese na obou osách), archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.

Obr. 59. Variabilita exprese znaku CD5 (dvouparametrové dot plot diagramy, CD19 na vodorovné a CD5 na svislé ose, gating z B-lymfocytů, logaritmická škála exprese na obou osách), archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.

Obr. 60. Variabilita exprese znaků CD20 a CD38 (dvouparametrové dot plot diagramy, CD20 na vodorovné a CD38 na svislé ose, gating z B-lymfocytů, logaritmická škála exprese na obou osách), archiv Oddělení klinické hematologie Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.

Obr. 61. Distribuce hodnot MFI u lehkých řetězců kappa a lambda, znaků CD20, CD22, CD79b, CD5, CD23, FMC7, CD35, CD38, CD43, CD25, CD11c a CD200; diagramy typu box-plot, diagnostická kategorie na ose x, hodnoty MFI na ose y (CLL/SLL vs. MCL)

Obr. 62. Distribuce hodnot MFI u lehkých řetězců kappa, znaků CD20, CD22, CD79b, CD5, CD23, FMC7, CD35, CD38, CD43, CD25, CD11c a CD200; diagramy typu box-plot, diagnostická kategorie na ose x, hodnoty MFI na ose y (CLL/SLL vs. MZL)

Obr. 63. Distribuce hodnot MFI u lehkých řetězců kappa, znaků CD20, CD22, CD79b, CD5, CD23, FMC7, CD35, CD38, CD43, CD25, CD11c a CD200; diagramy typu box-plot, diagnostická kategorie na ose x, hodnoty MFI na ose y (MCL vs. MZL)

Obr. 64. Distribuce hodnot MFI u lehkých řetězců kappa a lambda, znaků CD20, CD22, CD79b, CD5, CD23, FMC7, CD35, CD38, CD43, CD25, CD11c a CD200; diagramy typu box-plot, diagnostická kategorie na ose x, hodnoty MFI na ose y (CLL3 vs. CLL4+5)

Obr. 65. Výběr nejinformativnějších markerů pro odlišení CLL/SLL a MCL

Obr. 66. Výběr nejinformativnějších markerů pro odlišení CLL/SLL a CD5+ MZL

Obr. 67. Výběr nejinformativnějších markerů pro odlišení MCL a CD5+ MZL

Obr. 68. Distribuce hodnot MFI u znaků CD20, CD79b, CD23, FMC7, CD38, CD43, CD11c, CD200; diagramy typu box-plot, diagnostická kategorie na ose x, hodnoty MFI na ose y (CLL/SLL vs. MCL vs. CD5+ MZL)

Obr. 69. Výběr nejinformativnějších markerů pro odlišení CLL4+5 a CLL3

Obr. 70. Datové sítě pro celý analyzovaný soubor; 70a) síť s využitím všech znaků (pozitivita/negativita), 70b) síť s využitím nejinformativnějších znaků (pozitivita/negativita),

70c) síť s využitím všech znaků (MFI), 70d) síť s využitím nejinformativnějších znaků (MFI); (CLL – fialově, MCL – modře, MZL – zeleně)

Obr. 71. Datová síť u MCL a MZL; 71a) síť s využitím všech znaků (pozitivita/negativita), 71b) síť s využitím nejinformativnějších znaků (pozitivita/negativita), 71c) síť s využitím všech znaků (MFI), 71d) síť s využitím nejinformativnějších markerů (MFI); (MCL – modře, MZL – zeleně)

Obr. 72. Datová síť u MCL, MZL a neklasifikovatelných případů (MCL – modře, MZL – zeleně, neklasifikovatelné případy – červeně)

Obr. 73. Datová síť u CLL; 73a) síť s využitím všech znaků (pozitivita/negativita), 73b) síť s využitím nejinformativnějších znaků (pozitivita/negativita), 73c) síť s využitím všech znaků (MFI), 73d) síť s využitím nejinformativnějších markerů (MFI); (CLL5 – žlutě, CLL4 – oranžově, CLL3 – červeně)

13. Přehled tabulek

- Tab. 1. Přehled nejdůležitějších diferenciálně diagnostických B-markerů
- Tab. 2. Diagnostická kritéria CLL
- Tab. 3. Skórovací systém pro CLL dle Estelly Matutes
- Tab. 4. Výskyt genetických aberací u CLL
- Tab. 5. Morfologické varianty MCL
- Tab. 6. Diagnostické kategorie a pohlavní distribuce
- Tab. 7. Věková struktura pacientů v souboru
- Tab. 8. Typy vzorků u jednotlivých diagnostických kategorií
- Tab. 9. Sestava zkumavek k analýze průtokovou cytometrií
- Tab. 10. Příklad nastavení voltáží pro FSC, SSC a jednotlivé fluorochromy
- Tab. 11. Příklad nastavení kompenzací jednotlivých fluorochromů
- Tab. 12. Cytomorfologie CLL/SLL
- Tab. 13. Cytomorfologie MCL
- Tab. 14. Cytomorfologie CD5+ MZL
- Tab. 15. Cytomorfologie CD5+ DLBCL
- Tab. 16. Cytomorfologie ve skupině neklasifikovatelných zralých CD5+ B-lymfoidních neoplázií
- Tab. 17. Cytomorfologické typy u zralých CD5+ B-lymfoidních neoplázií (%)
- Tab. 18. Pozitivita a hodnoty MFI diagnostických markerů u CLL/SLL
- Tab. 19. CLL skóre, frekvence a atypických imunofenotypů a exprese CD20, CD43, CD38 a CD200 u CLL
- Tab. 20. Souvislost cytomorfologie CLL s atypií imunofenotypu CLL
- Tab. 21. Pozitivita a hodnoty MFI diagnostických markerů u MCL
- Tab. 22. Pozitivita a hodnoty MFI diagnostických markerů u CD5+ MZL
- Tab. 23. Pozitivita a hodnoty MFI diagnostických markerů u CD5+ DLBCL
- Tab. 24. Pozitivita a hodnoty MFI diagnostických markerů u neklasifikovatelných případů
- Tab. 25. CLL skóre u diagnostických skupin
- Tab. 26. Markery se statisticky významnými rozdíly MFI mezi CLL/SLL a MCL
- Tab. 27. Markery se statisticky významnými rozdíly MFI mezi CLL/SLL a CD5+ MZL
- Tab. 28. Markery se statisticky významnými rozdíly MFI mezi MCL a CD5+ MZL
- Tab. 29. Markery se statisticky významnými rozdíly MFI mezi CLL4+5 a CLL3

Tab. 30. Dvojkombinace diagnostických markerů rozlišující CLL a MCL s pravděpodobností nejméně 96.1 %

Tab. 31. Trojkombinace diagnostických markerů rozlišující CLL a MCL s pravděpodobností 100 %

Tab. 32. Dvojkombinace diagnostických markerů rozlišující CLL a CD5+ MZL s pravděpodobností nejméně 98.8 %

Tab. 33. Trojkombinace diagnostických markerů rozlišující CLL a CD5+ MZL s pravděpodobností 100 %

Tab. 34. Dvojkombinace diagnostických markerů rozlišující MCL a CD5+ MZL s pravděpodobností nejméně 88.9 %

Tab. 35. Trojkombinace diagnostických markerů rozlišující MCL a CD5+ MZL s pravděpodobností nejméně 96.3 %