

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

Olomouc 2016

Martin Dihel

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Role mikroprostředí u Hodgkinova lymfomu

Martin Dihel

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: Dr. Ing. Eva Kriegová

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Dr. Ing. Evy Kriegové a použil jen uvedené bibliografické a elektronické zdroje.

V Olomouci 25. července 2016

podpis

Souhrn

Hodgkinův lymfom (HL) je maligní lymfoproliferativní onemocnění nejasné etiologie. Klasický HL se vyznačuje přítomností typických nádorových Hodgkinových a Reed-Sternbergových (HRS) buněk, jež jsou obklopeny hustým imunitním mikroprostředím nezbytným pro jejich přežití. V současné době se studie zaměřují na pochopení vlivu mikroprostředí a identifikaci biomarkerů využitelných pro včasné odhalení rizikových pacientů, u nichž dochází k opakovaným relapsům.

Naše studie byla zaměřena na vyhodnocení počtu HRS buněk a s lymfomem asociovaných makrofágů (LAM) ve tkáních lymfatických uzlin odebraných pacientům s HL, rozdělených do skupin dle vývoje onemocnění (remise vs. relabující onemocnění). Dále byl u těchto pacientů vyhodnocen počet jader a velikost HRS buněk. Pro analýzu těchto parametrů byl použit inovativní automatický obrazový analyzační systém TissueFAXS.

U pacientů s HL, u kterých po léčbě došlo k remisi onemocnění, byla zaznamenána větší hustota nádorových HRS buněk než u pacientů, u kterých došlo později k relapsu onemocnění. Při porovnání zastoupení LAM a poměru LAM/HRS nebyl pozorován rozdíl u podskupin HL pacientů, u kterých došlo k remisi, anebo k relapsu onemocnění.

V rámci zkoumání morfologie nádorových buněk byla zaznamenána vyšší hustota jednojaderných HRS buněk u pacientů s remisí onemocnění ve srovnání s pacienty, u kterých došlo k relapsu. Pacienti s remisí se také vyznačovali častějším výskytem menších jednojaderných HRS buněk, zatímco u relabujících pacientů byl zaznamenán častý výskyt větších HRS buněk s více jádry.

Pozorované rozdíly v počtu i morfologii nádorových HRS buněk u pacientů s Hodgkinovým lymfomem by mohly být využitelné jako vhodný prognostický marker onemocnění. Naše nálezy také potvrzují využitelnost automatické obrazové analýzy velkých oblastí biopované tkáně pomocí systému TissueFAXS.

Summary

Hodgkin lymphoma (HL) is a malignant lymphoproliferative disease of an indistinct etiology. The classical HL is characterized by the presence of typical tumor cells (Hodgkin and Reed-Sternberg cells, HRS) surrounded by a dense immune microenvironment, which is essential for its survival. Currently, there are studies focused on understanding of the microenvironment and identification of the biomarkers applicable for early detection of risk patients.

Our study was focused on assessment of the number of HRS cells and lymphoma-associated macrophages (LAM) in the lymph node tissues of HL patients with different stages of the disease (remission vs. relapsing disease). Sizes of HRS cells and diverse number of their nuclei were assessed. For the analysis of these parameters was used an innovative automatic image analysis system TissueFAXS.

In cases where the treatment was followed by a remission of the disease, greater density of the tumor HRS cells was detected, than in cases where the disease in the patients relapsed. When comparing the subgroups of HL patients, who experienced remission or relapsing of the disease, no difference in the representation of LAM or the ratio of LAM/HRS was observed.

When examining the morphology of tumor cells, a greater density of mononuclear cells was found in the patients who achieved a remission of the disease, than in those who experienced a relapse. The patients achieving a remission also had a smaller mononuclear HRS cells, whilst in the patients experiencing a relapse were found larger HRS cells with multiple nuclei.

The observable divergences in the number and the morphology of tumor HRS cells in the subgroups of patients with the Hodgkin's lymphoma could be used as a useful prognostic marker of the disease. Our findings also confirm the applicability of the automatic analysis of large areas of a biopsied tissue using the TissueFAXS system.

This work was financially supported by grant of Palacky University IGA_LF_2016_001, IGA_LF_2016_011 and Takeda Pharmaceuticals International AG IISR-2015-101289.

Poděkování

Chtěl bych poděkovat zejména své vedoucí bakalářské práce Dr. Ing. Evě Kriegové za odborné a ochotné vedení, cenné rady, trpělivost a vstřícnost při vypracování této práce. Rovněž chci poděkovat Mgr. Tereze Dýškové, Ph.D. a Mgr. Zuzaně Mikulkové, Ph.D. za spolupráci v laboratořích a za mnoho podnětných rad. Dále děkuji doc. MUDr. Vítu Procházkovi, Ph.D. z Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc za poskytnutí klinických dat a Mgr. Tomáši Novosadovi, Ph.D. za vyhodnocení distribucí studovaných buněk pomocí softwaru Kernel.

Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Cíle práce	2
3.	Současný stav řešené problematiky	3
3.1.	Hodgkinův lymfom	3
3.1.1.	Etiologie.....	4
3.1.2.	Incidence	5
3.1.3.	Klinický obraz.....	6
3.1.4.	Patologie	6
3.1.4.1.	Nodulární HL s lymfocytární predominancí (NLPHL)	7
3.1.4.2.	Klasický HL (CHL)	8
3.1.5.	Klinická stádia a prognostické faktory	8
3.1.6.	Léčba a prognóza	10
3.1.7.	Role mikroprostředí u CHL	12
4.	Principy metod.....	14
4.1.	Imunohistochemické metody	14
4.1.1.	Přímá metoda	15
4.1.2.	Nepřímá dvoustupňová metoda	15
4.1.3.	Nepřímá trojstupňová metoda.....	15
4.1.3.1.	Trojstupňová metoda využívající (strept)avidin-biotin komplex	15
4.2.	Imunohistochemické barvení tkáňových preparátů.....	15
4.3.	Automatický obrazový analyzační systém TissueFAXS	16
5.	Materiál a metodika	18
5.1.	Materiál a vybavení.....	18
5.2.	Schéma postupu práce	18
5.3.	Soubor pacientů.....	18
5.4.	Popis tkáňových preparátů	19

5.5.	Automatický analyzační systém TissueFAXS	19
5.6.	Statistické vyhodnocení.....	21
6.	Výsledky	22
6.1.	Vyhodnocení počtu HRS buněk a LAM u pacientů s HL.....	22
6.1.1.	Vyhodnocení hustoty HRS buněk.....	22
6.1.2.	Vyhodnocení hustoty LAM a jejich poměru k HRS buňkám.....	23
6.2.	Vyhodnocení morfologie HRS buněk	24
6.2.1.	Vyhodnocení počtu a tvaru jader HRS buněk	25
6.2.2.	Vyhodnocení distribuce velikostí HRS buněk.....	27
7.	Diskuse.....	29
8.	Závěr	32
9.	Seznam použité literatury	33
10.	Seznam použitých zkratk	38

1. Úvod

Hodgkinův lymfom (HL) je maligní lymfoproliferativní onemocnění. První popis tohoto onemocnění provedl britský patolog Thomas Hodgkin roku 1832 u pacientů se zvětšenými uzlinami a slezinou. Pro HL je charakteristická přítomnost nádorových Hodgkinových a Reed-Sternbergových buněk (HRS), které ve většině případů vznikají maligní transformací zárodečných center B-lymfocytů. Etiologie HL je však stále neznámá.

HL se obecně vyznačuje velmi příznivou prognózou. I přes velké pokroky v léčbě však u 20% pacientů po primární léčbě nedochází ke kompletní remisi nebo se nemoc opět objeví.

V čem se tedy etiopatogeneze u pacientů s relabujícím onemocněním liší od těch, u kterých léčba zabírá? A jak předpovědět selhání či účinnost léčby? Odpovědi snad nalezneme s příchodem personalizované medicíny, která klade důraz na cílenou léčbu pro každého pacienta. Kromě ní je zapotřebí také nových prediktivních nástrojů, jež reflektují biologické vlastnosti nádoru a stav imunitního systému nemocného.

Experimentální část bakalářské práce se proto zabývá porovnáním mikroprostředí HL u pacientů, u kterých došlo k remisi tohoto onemocnění, a pacientů, u kterých v průběhu 5letého sledování došlo k její recidivě. Konkrétně se tato práce zaměřuje na studium odlišností v počtu a morfologii nádorových buněk srovnávaných podskupin pacientů s HL pomocí automatického obrazového analyzačního systému TissueFAXS. Dále byl vyhodnocen počet s lymfomem asociovaných makrofágů (LAM) a jejich poměr k HRS buňkám u podskupin pacientů dle vývoje onemocnění.

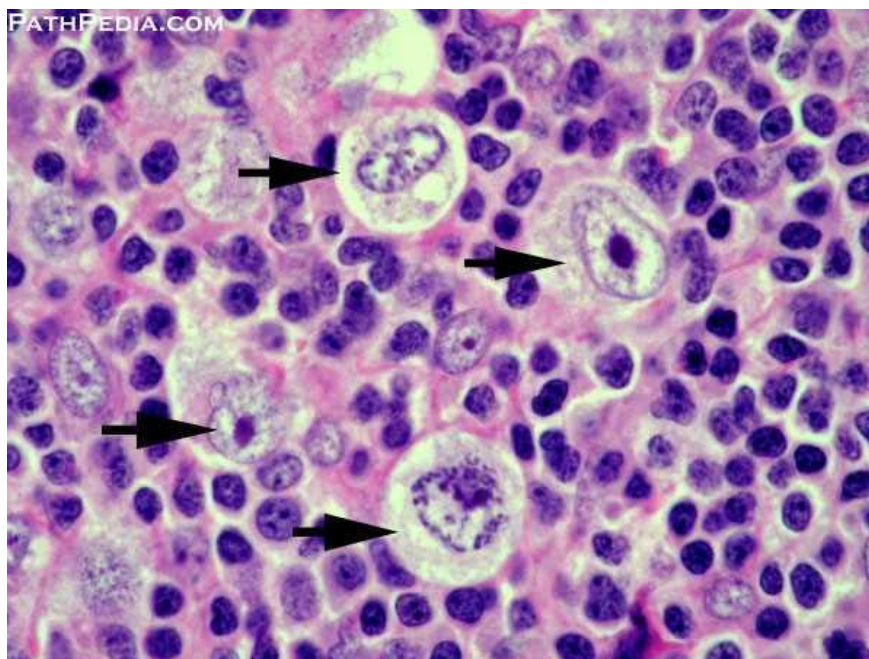
2. Cíle práce

- Vypracování literární rešerše na téma Hodgkinův lymfom se zaměřením na roli mikroprostředí v jeho patogenezi.
- Zvládnutí metod: mikroskopování a automatická obrazová analýza tkání pomocí technologie TissueFAXS.
- Vyhodnocení počtu Hodgkinových a Reed-Sternbergových buněk (HRS, CD30+) a s lymfomem asociovaných makrofágů (LAM, CD68+) ve tkáních odebraných pacientům s Hodgkinovým lymfomem a jejich porovnání u podskupin pacientů dle vývoje onemocnění (remise vs. relabující onemocnění).
- Vyhodnocení morfologie nádorových buněk u podskupin HL pacientů dle vývoje onemocnění (remise vs. relabující onemocnění).

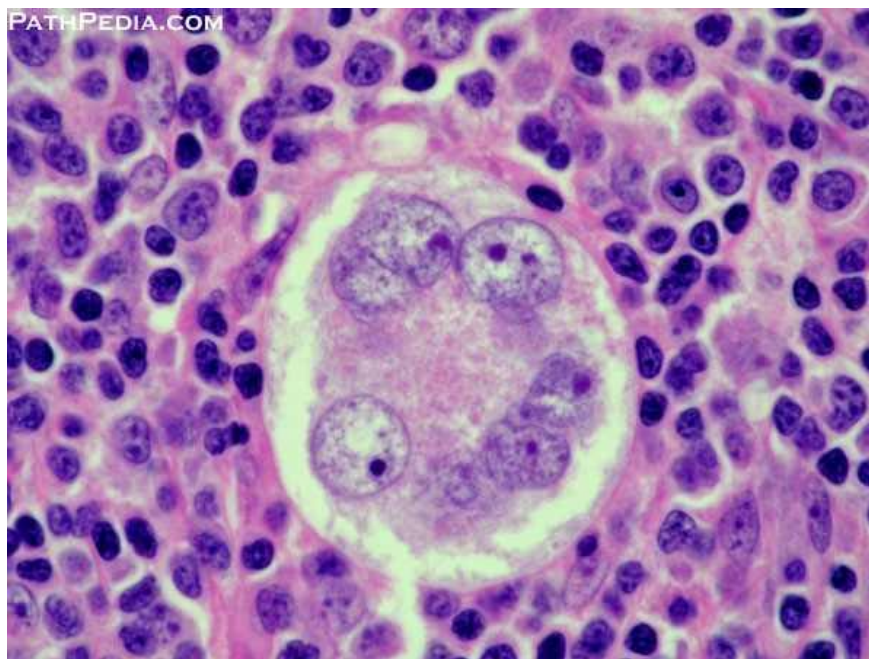
3. Současný stav řešené problematiky

3.1. Hodgkinův lymfom

Hodgkinův lymfom (HL) je maligní lymfoproliferativní nádorové onemocnění, pro které je charakteristická přítomnost gigantických jednojaderných Hodgkinových (viz Obrázek 1) a vícejaderných Reed-Sternbergových buněk (HRS, viz Obrázek 2) (Küppers et al., 1995; Rengstl et al., 2014; Thomas et al., 2004). HRS buňky představují jen malý zlomek nádorového infiltrátu, jehož mikroprostředí je z většinové části zastoupeno lymfocyty, makrofágy, eozinofily, žírnými, plazmatickými a stromálními buňkami, fibroblasty a dalšími buňkami (Steidl et al., 2011). Jako první popsal toto onemocnění britský patolog Thomas Hodgkin u pacientů se zvětšenými uzlinami a slezinou (Hodgkin, 1832). Teprve až o více než 150 let později molekulární studie ukázaly, že v 98 % jsou HRS buňky odvozeny z klonů periferních B-lymfocytů vznikajících maligní transformací zárodečných center a pouze ve 2 % se jedná o klony odvozené z T-lymfocytů (Matsuki et al., 2015; Pileri et al., 2002; Küppers et al., 1998).



Obrázek 1: Jednojaderné Hodgkinovy buňky (převzato z: http://www.pathpedia.com/education/atlas/histopathology/lymph_node/hodgkin_lymphoma_mixed_cellularity_subt_vpe.aspx, navštíveno dne 17. 6. 2016).



Obrázek 2: Gigantická vícejaderná Reed-Sternbergova buňka (převzato z: http://www.pathpedia.com/education/atlas/histopathology/lymph_node/hodgkin_lymphoma_mixed_cellularity_subtype.aspx, navštíveno dne 17. 6. 2016).

3.1.1. Etiologie

I přes nové poznatky v oblasti původu HRS buněk zůstává etiologie HL zatím stále neobjasněna. HRS buňky pocházejí z pre-apoptotických B-lymfocytů zárodečného centra lymfatického folikulu, které nevytvářejí B-buněčné receptory s dostatečně vysokou afinitou, a i přesto nepodléhají apoptóze. Během normální fyziologické imunitní reakce jsou B-lymfocyty s nežádoucími mutacemi (B-buněčné receptory s autoreaktivní nebo omezenou afinitou) včas a účinně apoptoticky eliminovány prostřednictvím transmembránového receptoru FAS/CD95 (Hudeček, 2006). Důvod této výhody HRS buněk, jež apoptóze unikají, rovněž není znám. Thomas et al. (2004) však popsali mechanismy, u kterých se předpokládá, že umožňují HRS buňkám přežít a dokonce autonomně růst:

- Exprese apoptotických inhibitorů prostřednictvím FAS/CD95 (c-FLIP) HRS buněk
- Aberantní exprese, parakrinní a autokrinní aktivace receptorů tyrozinkináz HRS buňkami
- Aktivace transkripčních faktorů STAT a AP1 a cyklinu D2
- Aktivace *NF-κB* v HRS buňkách zapříčiněna mutací jeho inhibitoru nebo expresí proteinů LMP1 a LMP2 způsobenou infekcí virem Epstein-Barrové (EBV)

HRS buňky se vyznačují také snížením hladiny mRNA pro znaky B-linie včetně imunoglobulinů. Toto snížení hladiny mRNA zapříčiňuje nedostatek transkripčního faktoru Oct2 a jeho koaktivátoru BOB.1, což vede k inaktivaci imunoglobulinového promotoru. HRS buňky zvýšenou tvorbou cytokinů (např. IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10 a IL-13) a jejich receptorů způsobují tzv. B-symptomy projevující se v klinickém obraze (viz kapitola 3.1.3. Klinický obraz) a zároveň určují charakter celulárního nádorového infiltrátu (Stein et al., 2001).

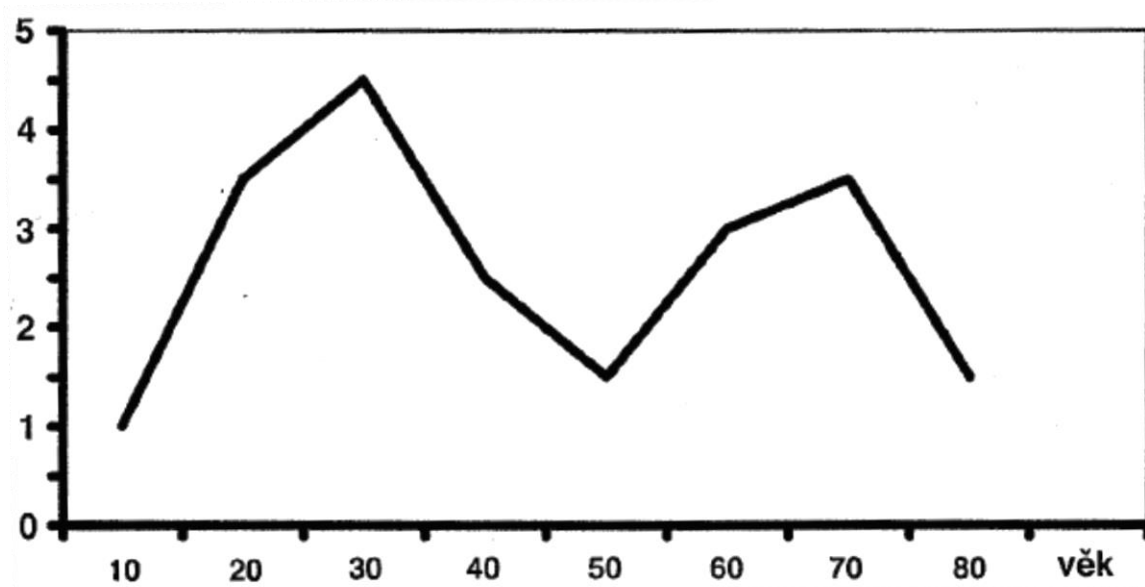
V diskusích o etiologii HL hraje velmi významnou roli souvislost s EBV, což je lidský herpesvirus infikující B-lymfocyty, T-lymfocyty a epiteliální buňky (Küppers et al., 1998). Platí, že infekce EBV zvyšuje onkogenezi HL (Stein et al., 2001). EBV je přítomný v maligní buňce ve 30-50% případech v závislosti na podtypu HL, a také epidemiologických faktorech, jako jsou geografie, etnikum a věk (Jarret et al., 1996; Greaves et al., 2013, Thomas et al., 2004). Například v Peru a Hondurasu se výskyt HRS buněk pozitivních na EBV pohybuje mezi 96-100 % (Küppers et al., 1998). Bylo prokázáno, že osoby, jež v průběhu života prodělaly infekční mononukleózu, podléhají až 3x většímu riziku onemocnění HL. Na základě imunohistochemických dat a profilování genové exprese vyplývá, že EBV může výrazně ovlivnit mikroprostředí, což v konečném důsledku může vést až k vyvolání relapsu způsobeného residuálními nádorovými buňkami původních HRS klonů (Hudeček 2006; Greaves et al., 2013; Küppers et al., 1998).

V etiologii HL má zřejmě svůj význam také genetika. Byl pozorován častější výskyt onemocnění u příbuzných v rodinách pacientů s HL než ve zbylé populaci (Mauch et al., 1999). Pro HL je charakteristická chromozómová nestabilita s aneuploidií a přítomnost nespecifických chromozómových aberací (např. 2p25-16, 9p24, 12q23-24). Dnes se molekulární a cytogenetická vyšetření provádí jen v rámci studií za účelem pochopení mechanismů vedoucích ke vzniku HL (<http://www.hodgkin.cz/diagnostika/>, navštíveno dne 17. 6. 2016, Stein et al., 2001).

3.1.2. Incidence

HL je jeden z nejčastějších maligních lymfomů vyskytujících se v západním světě. Představuje více než 11 % všech lymfomů, přičemž incidence stále roste (Touati et al., 2014). Ta se v centrální Evropě a Severní Americe (obecně v ekonomicky vyspělých zemích) pohybuje okolo 2-3 případů na 100 000 obyvatel s vyšším zastoupením mužů než žen (Marková, 2011). HL vykazuje typickou bimodální věkovou incidenci s maximálním výskytem okolo 30. roku života (viz Graf 1). Druhý vrchol tvoří nemocní ve věku 60-70 let

(Marková, 2011; Pileri et al., 2002). Další rozdíly v incidenci byly popsány i v rámci rasy, etnika a komunity na různé socioekonomické úrovni (Glaser et al., 2011).



Graf 1: Bimodální věková incidence Hodgkinova lymfomu na 100 000 obyvatel (převzato z Indrák et al., 2006)

3.1.3. Klinický obraz

Nebolestivé zvětšení lymfatických uzlin bývá nejčastěji prvním příznakem HL, a to především v nadklíčkové a krční oblasti. Běžný je také výskyt zvětšených uzlin v hrudní oblasti, což může zapříčinit rozvoj symptomů vyplývajících z útlaku vnitřních orgánů (např. dušnost, dráždivý kašel, bolest zad a páteře, syndrom horní duté žíly).

Kromě lokálních příznaků jsou přítomné příznaky systémové, kterým se běžně v praxi říká B-symptomy, a jsou to především teploty nad 38°C zpravidla doprovázeny zimnicí, nočním pocením a váhovým úbytkem. Teploty bývají často nevysvětlitelné a mohou mít cyklický charakter trvající 1-2 týdny (horečka Pel-Ebsteinova typu). Charakteristickou součástí klinického obrazu je celková únava a slabost.

Za méně časté až raritní příznaky HL bývají považovány svědění kůže (zhruba 20 % případů) a bolest v okolí postižených lymfatických uzlin po konzumaci alkoholu. Ta bývá málo častá, ale pro HL typická (Ballová, 2008; Indrák et al., 2006).

3.1.4. Patologie

HL patří do skupiny onemocnění, která se vyznačují svou heterogenitou. Na základě odlišných morfoloických variant a klinického obrazu potvrdila Světová zdravotnická

organizace (WHO) roku 1994 rozdělení HL do dvou velkých skupin (Matsuki et al., 2015; Pileri et al., 2002):

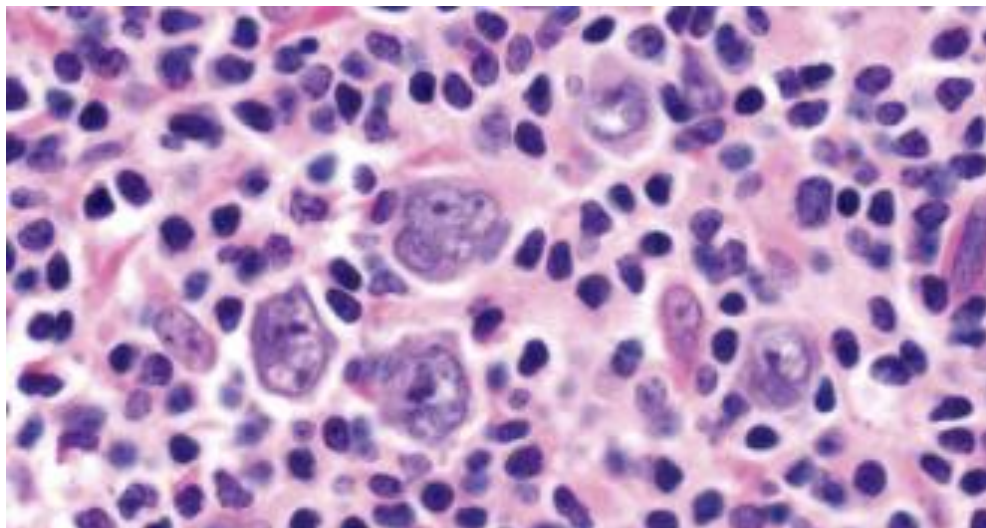
- Nodulární HL s lymfocytární predominancí (NLPHL)
- Klasický HL (CHL)

3.1.4.1. Nodulární HL s lymfocytární predominancí (NLPHL)

NLPHL, taktéž označován jako nodulární paragranulom, je v západních zemích vzácný typ HL (pouze 5 % všech případů), který se od CHL liší především svými buněčnými povrchovými antigeny, biologickým chováním a celkovou léčebnou strategií (Matsuki et al., 2015). NLPHL postihuje zejména periferní lymfatické uzliny mužů ve věku okolo 35 let (Hudeček, 2006; Yung et al., 2003). Ve srovnání s CHL je NLPHL asociován s méně agresivním nádorovým růstem a lymfadenopatií, ovšem se sklony k relapsům.

Histologicky se NLPHL může projevit dvěma různými morfologickými podtypy: nodulárním a difúzním.

Nodulární podtyp je charakterizován přítomností atypických lymfocytárních a histiocytárních (L&H, viz Obrázek 3), nebo také tzv. popcorn buněk, které jsou součástí buněčného pozadí tvořeného především malými B-lymfocyty a jinými reaktivními buňkami. L&H buňky obvykle exprimují B-lymfocytární marker (znak) CD20 a postrádají expresi markeru CD15 a CD30, jež jsou charakteristické pro CHL (Nogová et al., 2008).



Obrázek 3: Atypické lymfocytární a histiocytární (tzv. popcorn) buňky v nodulárním Hodgkinově lymfomu s lymfocytární predominancí (převzato z <http://www.ascopost.com/issues/december-15-2011/how-should-we-treat-nodular-lymphocyte-predominant-hodgkin-lymphoma.aspx>, navštíveno dne 18. 6. 2016)

V difúzním podtypu NPLHL jsou L&H buňky rozptýleny na buněčném pozadí skládajícím se hlavně z reaktivních T-lymfocytů. Nicméně stále není jasné, zda difúzní podtyp NPLHL může být chápán jako samostatný podtyp. Podle současné definice WHO je k určení diagnózy NPLHL nutná alespoň částečná přítomnost nodulárního vzoru (Jaffe et al., 2001).

3.1.4.2. Klasický HL (CHL)

CHL je nejčastějším typem HL (tvoří přibližně 95 % všech případů) a dělíme ho dále do čtyř podtypů (Stein et al., 1999):

- Nodulární skleróza (NSCHL)
- Smíšená buněčnost (MCCHL)
- Klasický HL bohatý na lymfocyty (LRCHL)
- Lymfocytární deplece (LDCHL)

Nejčastějším CHL podtypem je NSCHL (70 % případů) následovaný MCCHL (20-25 % případů), LRCHL (5 % případů) a podtypem LDCHL, který se vyskytuje v méně než 1 % případů. Tyto podtypy se liší v klinických, morfologických, fenotypových a genotypových vlastnostech, zejména pak v jejich modelu růstu, přítomnosti fibrózy a složením buněčného pozadí. Imunofenotypově jsou však všechny nádorové buňky konzistentní (Matsuki et al., 2015). Právě HRS buňky (viz Obrázek 1 a 2) jsou pro CHL naprosto typické a jejich imunohistochemická pozitivita na markery CD15 a CD30 je nutná pro potvrzení diagnózy HL (Diefenbach et al., 2013). Dají se snadno detekovat a jejich počet je případ od případu odlišný (Pileri et al., 2002).

3.1.5. Klinická stádia a prognostické faktory

Od roku 1989 se v klinické praxi stádia onemocnění stanovují Cotswoldskou modifikací Ann Arbor klasifikace pocházející z roku 1971 (viz Tabulka 1; Lister et al., 1989).

Britská skupina The British National Lymphoma Investigation (BNLI) v roce 1985 publikovala prognostický index HL na základě analýzy více než 2000 pacientů (Haybittle et al., 1985). Tento index byl však velmi složitý a odbornou veřejností nebyl příliš přijat, nicméně ujal se princip stanovení léčby založený na rizikových faktorech. I díky tomu velké pracovní skupiny European Organisation for the Research and Treatment of Cancer (EORTC) a German Hodgkin's Study Group (GHSG) určily několik vlastností indikujících horší prognózu v raných stádiích I a II HL a použily je pro stratifikaci léčby (viz Tabulka 2;

Král, 2014; Yung et al., 2003). Ovšem ani dnes stále neexistují standardizované prognostické modely a jednotné definice rizikových skupin (Neste et al., 2013).

Hasenclever (1998) ve své studii na základě analýz 5141 pacientů léčených chemoterapeutiky vyvinul mezinárodní prognostické skóre (IPS) pro pacienty v pokročilém stádiu onemocnění, též nazývané Hasencleverův index. Identifikoval 7 prognostických faktorů, přičemž přítomnost každého z nich zhoršuje prognózu o 7-8 % při pětiletém pozorování (viz Tabulka 3).

Tabulka 1: Základní klasifikace stádií Hodgkinova lymfomu z Ann Arbor

(upraveno z Indrák et al., 2006)

STÁDIUM	ANN ARBOR KLASIFIKACE (1971)	COTSWOLDS KLASIFIKACE (1988)
I	postižení jednoho okrsku uzlin nebo lokalizované postižení jednoho extralymfatického* orgánu	stejná kritéria
II	postižení dvou nebo více okrsků uzlin na stejné straně bránice nebo lokalizované postižení extralymfatického orgánu a jednoho nebo více okrsků uzlin na stejné straně bránice	stejná kritéria, pravá a levá plicní branka a mezihrudí jsou hodnoceny jako samostatné okrsky uzlin, požadavek záznamu počtu postižených okrsků
III	postižení okrsků lymfatických uzlin na obou stranách bránice, hodnocení zahrnuje i slezinu nebo lokalizované postižení extralymfatického orgánu	diferencuje: III1 - postižení jaterních uzlin a uzlin sleziny (vztahuje se i na postižení sleziny) III2 - postižení paraaortálních a pobřišnicových uzlin
IV	diseminované postižení jednoho nebo více extralymfatických orgánů či tkání, mohou nebo nemusí být postiženy uzliny	stejná kritéria

Poznámka: *Jako extralymfatický orgán je považována např. kostní dřeň, kosti, plíce atd.

Tabulka 2: Prognostické faktory pro pacienty v raných stádiích I a II
(upraveno dle Fermé, 2003)

EORTC - European Organization for Research and Treatment of Cancer	GHSG - German Hodgkin's Study Group
Velká masa v mezihrudí ($\geq 1/3$ maximálního průměru hrudníku)	Velká masa v mezihrudí ($\geq 1/3$ maximálního průměru hrudníku)
Věk ≥ 50 let	Extranodální postižení (postižení extralymfatické tkáně způsobené přímým prorůstáním nádoru z postižené uzliny)
Sedimentace erytrocytů ≥ 50 bez B-symptomů nebo ≥ 30 s B-symptomy	Sedimentace erytrocytů ≥ 50 bez B-symptomů nebo ≥ 30 s B-symptomy
≥ 4 postižené oblasti	≥ 3 postižené oblasti

Tabulka 3: Prognostické faktory pro pacienty v pokročilých stádiích III a IV, mezinárodní prognostické skóre (IPS, upraveno dle Hasenclever, 1998)

Věk > 45 let	IPS s nízkým rizikem (0-3 rizikové faktory) IPS s vysokým rizikem (≥ 4 rizikové faktory)
Mužské pohlaví	
Klinické stádium IV	
Anémie (Hb < 10,5 g/dl)	
Albumin < 40 mg/l	
Leukocytóza (> 15 000/mm ³)	
Lymfopenie (< 600/mm ³ nebo < 8 % leukocytů)	

3.1.6. Léčba a prognóza

Za posledních 40 let bylo dosaženo značného pokroku v oblasti péče o pacienty s HL. Pokrok představovala především cílená radioterapie, efektivní chemoterapie, imunoterapie, zpřesnění diagnostiky, podpůrná léčba infekcí a dalších komplikací. To vše vedlo ke zvýšení celkové kurability až na 80 % bez ohledu na klinická stádia. Nicméně zbývajících 20 % pacientů je refrakterních na léčbu nebo se u nich dříve či později objeví recidiva nemoci. I v tomto případě však bývá až polovina pacientů vyléčena (Marková, 2013; Touati et al., 2014). U pacientů s opakujícími se relapsy je prognóza velmi špatná a jejich léčba bývá zpravidla už jen paliativní. Naději pro tuto skupinu pacientů přináší nové terapeutické metody, jež představují použití biologické léčby cílené přímo na receptory nádorové buňky pacienta. Hovoříme zde o příchodu tzv. personalizované medicíny. V současné době dochází

k testování nového slibného léku Brentuximab vedotinu konjugujícího anti CD30 protilátku a antimitoticky působící látku (Marková, 2013). Jakmile se protilátka s navázaným lékem přichytí na cílovém buněčném povrchu, je do ní začleněna pomocí endocytózy. Uvnitř buňky poté dochází pomocí lysozomální proteolýzy k uvolnění léčiva (Diefenbach et al., 2013).

Samotná primární léčba pacientů s HL dnes zahrnuje především radioterapii, protinádorovou chemoterapii a jejich kombinace (Žikavská et al., 2010). Celková léčebná strategie závisí na stádiu a přítomnosti prognostických (rizikových) faktorů (viz kapitola 3.1.5. Klinická stádia a prognostické faktory). V klinické praxi se všeobecně akceptovaným stalo rozdělení nemocných do tří terapeutických skupin (viz Tabulka 4; Diehl, 2004). Zlatý léčebný standard pro rané a intermediární stádium je kombinace chemoterapie s radioterapií „involved field“ 20 až 30 Gy. U pokročilého stádia HL je nezbytná léčba chemoterapeutiky s obsahem antracyklinů (Diehl, 2003).

Tabulka 4: Terapeutické skupiny pacientů s HL z hlediska prognózy a léčby
(upraveno dle Hudeček, 2006)

Stádium	EORTC - European Organization for Research and Treatment of Cancer	GHSB - German Hodgkin's Study Group
Rané stádium s příznivou prognózou	Klinické stádium I-II bez rizikových faktorů (nad bránicí)	Klinické stádium I-II bez rizikových faktorů
Rané stádium s nepříznivou prognózou (intermediární)	Klinické stádium I-II s počtem rizikových faktorů ≥ 1 (nad bránicí)	Klinické stádium I, klinické stádium IIA s počtem rizikových faktorů ≥ 1 , klinické stádium IIB se zvýšenou sedimentací a/nebo ≥ 3 postiženými oblastmi, ale bez velké masy v mezihrudí a/nebo extranodální postižení
Pokročilé stádium	Klinické stádium III-IV	Klinické stádium IIB s velkou masou v mezihrudí a/nebo extranodálním postižením, klinické stádium III-IV

Radioterapie a chemoterapie však s sebou přinášejí nemalá rizika v podobě vedlejších účinků a pozdních následků léčby (např. kardiotoxicita, sekundární neoplazie, plicní toxicita, neplodnost, imunosuprese s infekčními potížemi, poškození měkkých tkání a kostí a také neurologické komplikace). Bohužel, efektivní léčba bez vedlejších účinků zatím stále neexistuje (Žikavská et al., 2010).

3.1.7. Role mikroprostředí u CHL

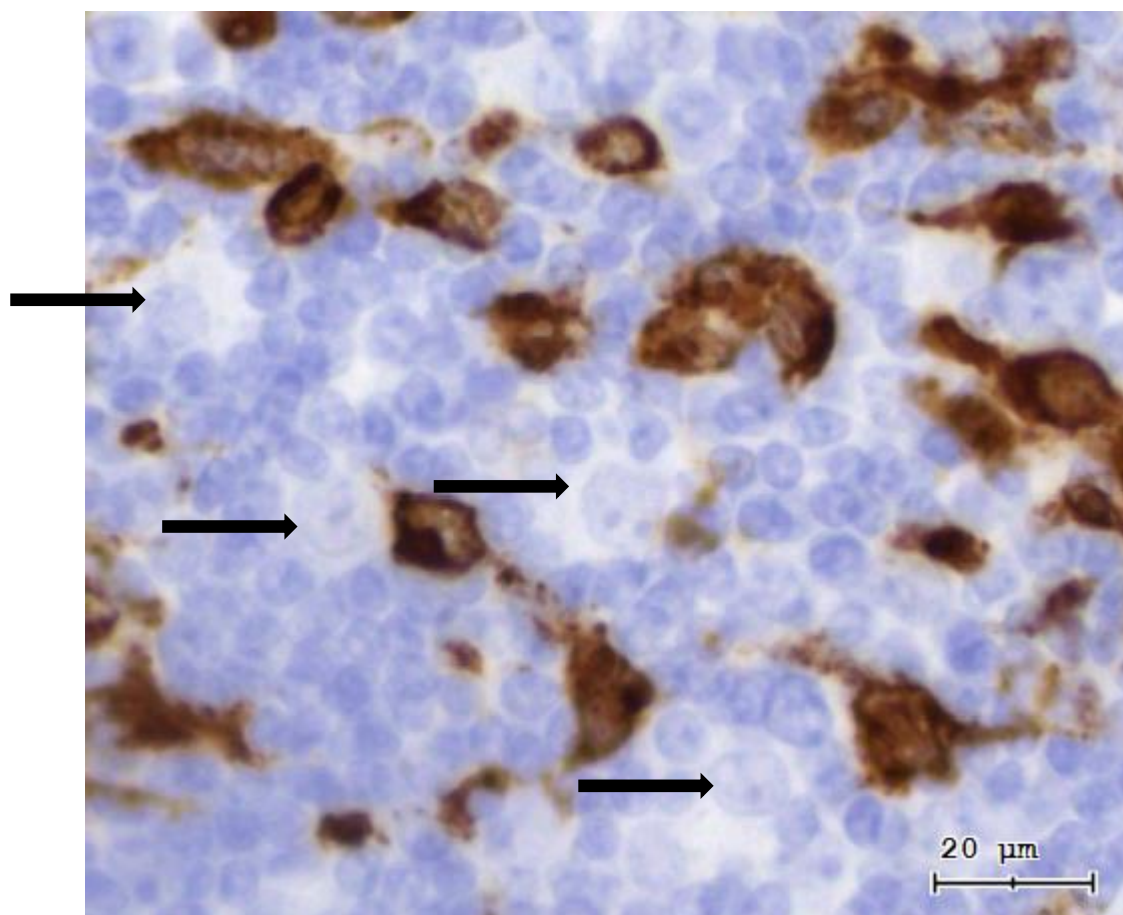
S rostoucím porozuměním vzájemné závislosti mezi zhoubnými HRS buňkami a jejich zánětlivým mikroprostředím roste také snaha o identifikaci biomarkerů odpovědi na léčbu, které mohou samozřejmě příznivě ovlivnit klinickou praxi. Vyhodnocení těchto biomarkerů a objevení nových prediktorů léčby může mít obrovský terapeutický prospěch (Diefenbach et al., 2013). Jak již bylo zmíněno dříve (viz 3.1.4.2. Klasický HL [CHL]), CHL se vyznačuje přítomností typických nádorových HRS buněk, jež jsou obklopeny hustým imunitním mikroprostředím nezbytným pro jejich přežití. O tom, že HRS buňky jsou závislé na signálech přijatých z okolí, svědčí různá pozorování: je obtížné pěstovat kultury HRS buněk, HRS buňky nepřežívají v imunodeficientních myších, zřídka se nachází v periferní krvi, a i když metastázuji do nelymfoidních orgánů, vždy se vyskytují ve svém typickém mikroprostředí. Nedávno bylo zjištěno, že komunikace mezi HRS buňkou a jejím bezprostředním okolím může probíhat prostřednictvím extracelulárních vezikul (Hansen et al., 2016). Nicméně úloha mikroprostředí, zejména pak T- a B-lymfocytů, v iniciaci či omezování nádorového růstu zůstává neobjasněna (Kuppers et al., 2008; Vardhana et al., 2016).

Předpokládá se, že T-lymfocyty potlačují rozvoj a růst lymfomu; zvýšený výskyt lymfomů u pacientů dlouhodobě pobírajících imunosupresiva pak podporuje tuto hypotézu (Imai et al., 2000; Penn et al., 1973). T-lymfocyty, jež se v mikroprostředí CHL akumuluje, mají tendenci se diferencovat buď na Th2 buňky nebo na regulační T-lymfocyty (Treg). HRS buňky produkují různé Th2 a Treg chemoatraktanty (cytokiny), například CCL17/TARC, CCL22, CCL5, IL-4, IL-5, IL-10 a IL-13. Výskyt těchto chemoatraktantů je spojován se sníženou odpovědí na léčbu. (Sauer et al., 2013). U efektorových T-lymfocytů v CHL existuje fenomén známý jako T-buněčná únava. Jedná se o chronickou neefektivní vazbu na antigen, která je charakterizována zvýšenou expresí negativního regulačního receptoru PD-1 (buněčný povrchový receptor s primární funkcí omezit aktivaci T-lymfocytů), jehož exprese na T-lymfocytech je řízena ligandy PD-L1 a PD-L2 na HRS buňkách. Přítomnost PD-1+ T-lymfocytů (jak v mikroprostředí u CHL, tak v periferní krvi) je negativním prognostickým faktorem (Chemnitz et al., 2007).

Vliv nemaligních B-lymfocytů na mikroprostředí u CHL zůstává dosud neobjasněn. IL-10 produkovaný B-lymfocyty může potlačit protinádorovou T-buněčnou odpověď, avšak na druhé straně jsou B-lymfocyty schopny také účinně redukovat růst HRS buněk. Obecně

je peritumorální CD20+ B-buněčné pozadí asociováno s příznivými výsledky léčby (Diefenbach et al., 2013; Steidl et al., 2010).

Velká pozornost se dnes věnuje především s lymfomem asociovaným makrofágům (LAM, CD68+, viz Obrázek 4), jejichž přítomnost v postižených lymfatických uzlinách ve vysokém počtu koreluje s nepříznivým výsledkem léčby u pacientů s HL bez ohledu na klinická stádia a histologické podtypy HL (Greaves et al., 2013; Kamper et al., 2011; Touati et al., 2014). Existuje stále více experimentálních důkazů popisujících, že LAM podporují progresi nádorů stimulací angiogeneze a migrace nádorových buněk a potlačením protinádorové imunity. LAM mohou totiž obejít kontrolní mechanismy imunitního systému a účinně tak negovat protinádorovou odpověď (Kamper et al., 2011; Vardhana et al., 2016). Ovšem principy těchto mechanismů a souvislosti mezi LAM a HRS buňkami a způsobem, jakým ovlivňují rezistenci k léčbě, zůstávají neobjasněné (Touati et al., 2014).



Obrázek 4: S lymfomem asociované makrofágy (hnědě). Šipkou jsou označeny Hodgkinovy a Reed-Sternbergovy buňky.

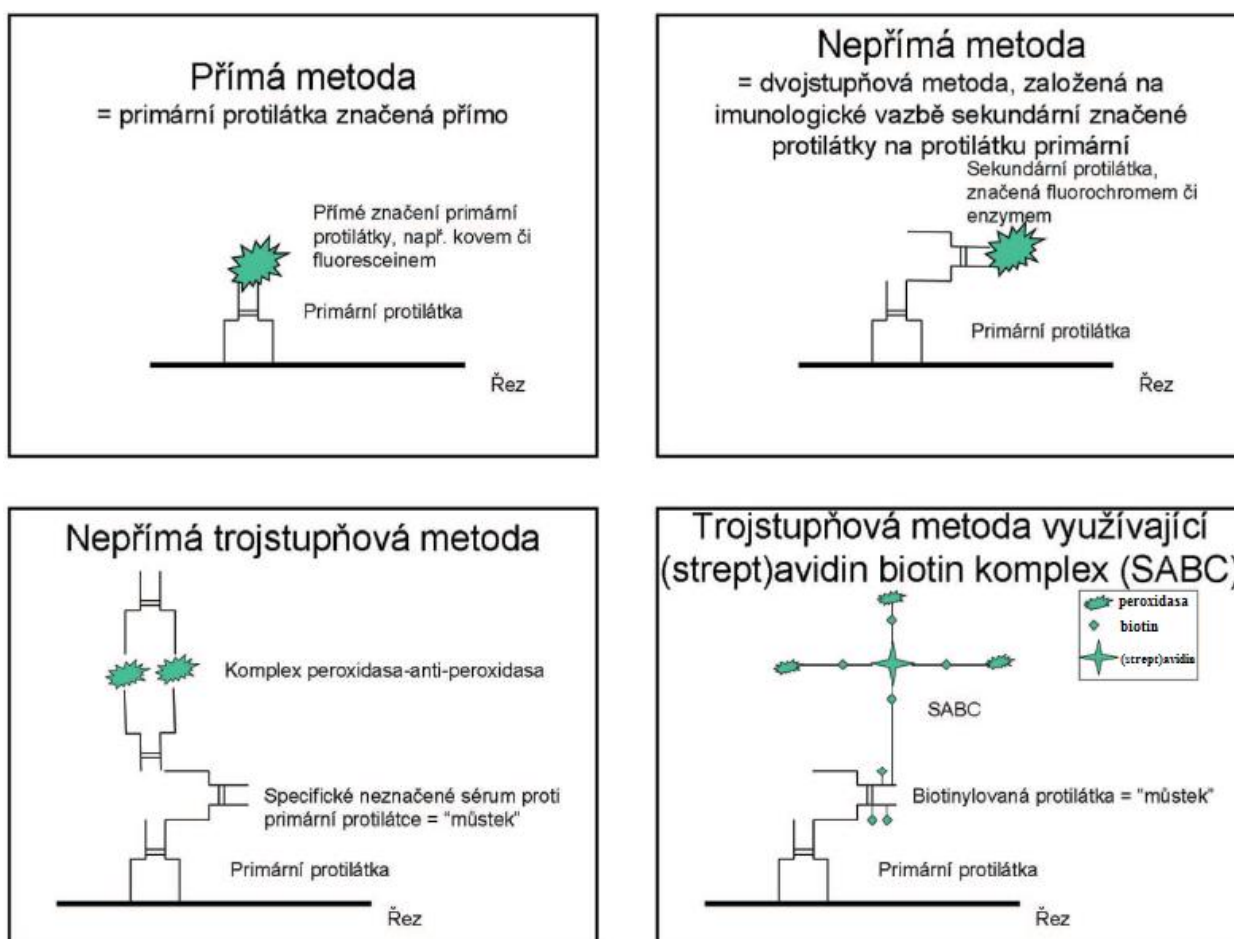
4. Principy metod

4.1. Imunohistochemické metody

Imunohistochemie je speciální technika, která využívá detekce jednotlivých antigenních determinant pomocí specifických primárních protilátek na základě imunologické vazby antigen-protilátka. V případě pozitivní reakce dochází k jejímu zvýraznění v podobě barevného produktu. Tato metoda se používá k diagnostickým i prognostickým účelům (Lukáš et al., 1997).

Existují 3 základní imunohistochemické metody (viz Obrázek 5):

- Přímá metoda
- Nepřímá dvoustupňová metoda
- Nepřímá trojstupňová metoda
 - Trojstupňová metoda využívající (strept)avidin-biotin komplex



Obrázek 5: Schémata imunohistochemických metod (převzato z <https://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node8.html>, navštíveno dne 22. 6. 2016)

4.1.1. Přímá metoda

Metoda, při které je primární protilátka značená přímo (např. kovem, fluoresceinem nebo enzymem). Jedná se o nejjednodušší metodu pro lokalizaci antigenního determinantu v tkáni, a to zejména v nativních řezech (Beranová et al., 2002; Gomolčák, 1997).

4.1.2. Nepřímá dvoustupňová metoda

Při použití této metody se v prvním kroku aplikuje na řez tkáně neznačená primární protilátka proti specifické antigenní determinantě. V druhém kroku se používá proti primární protilátce sekundární protilátka, která nese značku v podobě fluorochromu nebo enzymu. Tato metoda je složitější než metoda přímá, ale daleko citlivější (Beranová et al., 2002; Gomolčák, 1997).

4.1.3. Nepřímá trojstupňová metoda

V prvním kroku této metody dochází k reakci primárního specifického antiséra s prokazovanou antigenní determinantou. Druhý krok představuje aplikace neznačené specifické protilátky proti imunoglobulinům zvířete, jehož protilátky se používají v prvním a třetím kroku. Sekundární protilátce se také říká protilátka spojovací, protože tvoří můstek. Ve třetím kroku se přidává značený PAP komplex, tj. peroxidáza-anti-peroxidázový komplex (Beranová et al., 2002; Gomolčák, 1997).

4.1.3.1. Trojstupňová metoda využívající (strept)avidin-biotin komplex

Tato metoda je principiálně velmi podobná té předchozí. Zde se ovšem sekundární protilátka značí biotinem a poté dochází k vazbě se (strept)avidin-biotinovým komplexem značeným křenovou peroxidázou. Tato metoda je ze všech nejcitlivější, ale časově nejnáročnější (Beranová et al., 2002; Gomolčák, 1997).

4.2. Imunohistochemické barvení tkáňových preparátů

Při přípravě imunohistochemických preparátů se zkoumaná tkáň získaná biopsií v první řadě odvodní za pomoci alkoholů se zvyšující se koncentrací a poté prosytí parafinem. Následně dochází k zalití tkáně do rozehřátého parafinu v komůrce, čímž se tkáň zpevní a je možné ji krájet na tenké řezy v mikrotomu (tloušťka řezů bývá zpravidla 5-10 μm). V další fázi se řezy přesunou na vodní hladinu, aby došlo k jejich napnutí, a následně na podložní sklíčko, které vložíme do termostatu. V termostatu řezy zasychají.

Z takto připraveného řezu je třeba odstranit parafin rozpuštěním v xylolu (Beranová et al., 2002).

Dalším protažením preparátů alkoholovou řadou, tentokrát se snižující se koncentrací, zajistíme rehydrataci tkáně. Odparafinování a rehydratace tkáně jsou nezbytné, protože inkubace tkáně s protilátkou a dobarvení jader probíhá ve vodním prostředí. V další fázi výroby dochází k enzymatickému natravování, čímž se revitalizuje přístupnost tkáňových antigenních determinantů pro další reakce. Po oplachu preparátů v destilované vodě následuje blokování endogenní peroxidázy přítomné v tkáni za použití peroxidu vodíku. K vizualizaci se používá peroxidáza, je nutné tedy vysytit endogenní peroxidázu jejím substrátem, aby se zabránilo falešné pozitivitě. Dalším krokem je nespecifické vysycení tkáně bílkoviny. Tento proces brání nebo minimalizuje vznik nespecifického zbarvení pozadí. Preparát se poté inkubuje s primární protilátkou. Koncentraci primární protilátky je nutné optimalizovat vhodným ředěním. Po oplachu preparátu příslušným pufrům dochází k jeho inkubaci se sekundární značenou protilátkou, která slouží k vizualizaci. Použije se příslušný substrát s chromogenem a dojde ke vzniku barevného stabilního produktu zobrazujícího místa, kde proběhla specifická imunohistochemická reakce. Výroba preparátu pokračuje dobarvením buněčných jader hematoxylinem. Preparát se opět odvodní vzestupnou alkoholovou řadou, acetonem a xylenem a na závěr montuje např. do solakrylu, umělé pryskyřice nebo kanadského balzámu, přikryje krycím sklíčkem a nechá zaschnout (Lukáš et al., 1997).

4.3. Automatický obrazový analyzační systém TissueFAXS

Automatický obrazový analyzační systém TissueFAXS (TissueGnostics, Austria) se skládá ze dvou softwarových modulů TissueFAXS a HistoQuest. Jedná se o unikátní analytický nástroj kombinující základní principy mikroskopování s automatickým skenováním obrázků ve fluorescenčním módu či ve světlém poli při vysokém rozlišení (viz Obrázek 6). TissueFAXS se využívá především ke skenování tkáňových řezů získaných biopsií, buněčných preparátů a kultur v imunohistochemii nebo histologii a je schopen skenovat až 8 podložních sklíček v řadě. Výsledné skeny preparátů jsou pak připraveny pro softwarovou analýzu pomocí HistoQuest.

HistoQuest je software, který slouží pro cytometrickou analýzu tkáňových řezů. Ve své podstatě využívá složitý patentovaný algoritmus pro nukleární segmentaci, a proto je možno jej využívat pro počítání pozitivních a negativních buněk a pro standardizaci tkáňových analýz při imunohistochemickém a imunofluorescenčním barvení. Analýza barvení může být zaměřena na oblast jádra i na oblast cytoplazmy. Výsledkem analýzy jsou numerické hodnoty, které mohou být vizualizovány pomocí scattergramů a histogramů, se

kterými lze nadále pracovat a statisticky je vyhodnocovat (<http://www.bga.su/info/TissueFAXS.pdf>, navštíveno 23. 6. 2016).



Obrázek 6: Automatický skenovací mikroskop TissueFAXS (TissueGnostics, Austria)

5. Materiál a metodika

5.1. Materiál a vybavení

- **Biologický materiál:**

Podložní sklíčka s tkáňovými řezy lymfatických uzlin pacientů s Hodgkinovým lymfomem.

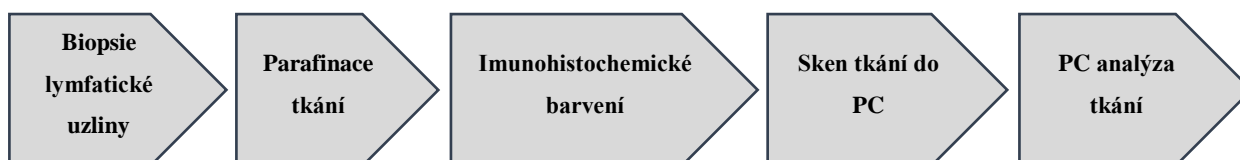
- **Mikroskopování:**

Automatický skenovací mikroskop TissueFAXS (TissueGnostics, Austria).

- **Analýza:**

Speciální software HistoQuest (TissueGnostics, Austria) pro analýzu tkání nadstandardních rozměrů a rozsahu.

5.2. Schéma postupu práce



Sklíčka s tkáňovými řezy byla barvena na Ústavu klinické a molekulární patologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a sloužila k rutinní diagnostice. V naší studii jsme využili tyto tkáňové preparáty k analýze počtů a morfologie buněk u podskupin pacientů s HL dle vývoje onemocnění.

5.3. Soubor pacientů

Do naší studie bylo zařazeno celkem 69 pacientů (viz Tabulka 5). Ti byli rozděleni do 3 skupin: Dg0, Dg1 a R. Skupina Dg0 jsou pacienti, jejichž vzorky tkání lymfatických uzlin pocházejí z doby diagnózy a došlo u nich k remisi onemocnění. Dg1 jsou pacienti, jejichž vzorky jsou z doby diagnózy, ale v době sledování (5 let) došlo k relapsu onemocnění. Skupina R jsou pacienti, jejichž vzorky pocházejí z doby relapsu. Všechny vzorky byly zkoumány retrospektivně.

Tabulka 5: Soubor pacientů

	Dg0	Dg1	R	Celkem
Celkem pacientů	37	19	13	69
Muži/ženy	17/20	6/13	8/5	31/38
Medián věku při diagnóze (min-max)	35 (17-93)	25 (20-72)	29 (19-61)	

5.4. Popis tkáňových preparátů

Preparáty byly poskytnuty z Ústavu klinické a molekulární patologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, kde byly provedeny parafinace tkání, jejich řezy, přenos na podložní sklíčko a následné imunohistochemické barvení. U každého pacienta jsme měli k dispozici preparáty pozitivní na znak CD30 pro identifikaci HRS buněk a znak CD68 pro rozeznání makrofágů. U obou znaků byla pro vizualizaci použita sekundární protilátka konjugovaná enzymem křenovou peroxidázou (HRP). Jako substrát byl použit 3', 3'- diaminobenzidin tetrahydrochlorid. V důsledku navázání substrátu na HRP došlo k hnědému zbarvení buněk pozitivních na hledané znaky. Dále byly u každého pacienta k dispozici také řezy nabarveny hematoxylinem.

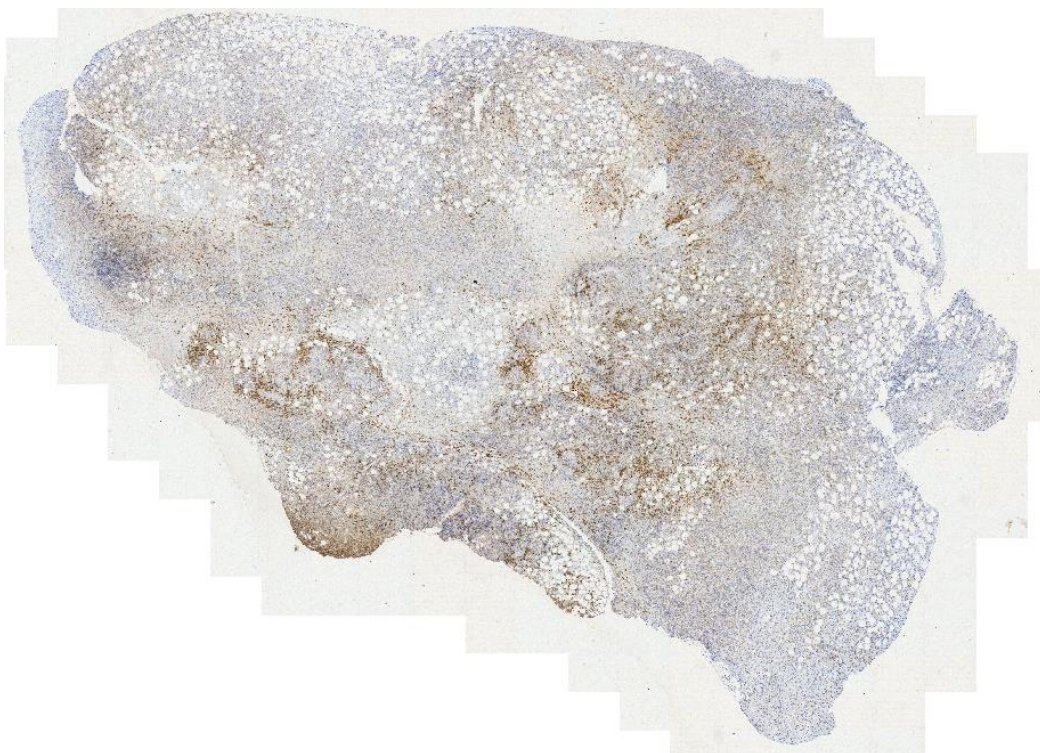
Tloušťka preparátů byla přibližně 5 μm pro snadnou detekci jedné vrstvy buněk. Analyzovaná plocha histologických řezů se pohybovala od 1,2 mm^2 do 56,7 mm^2 . Průměrná plocha tkání byla 26,3 ($\pm 2,1$) mm^2 (viz Tabulka 6).

5.5. Automatický analyzační systém TissueFAXS

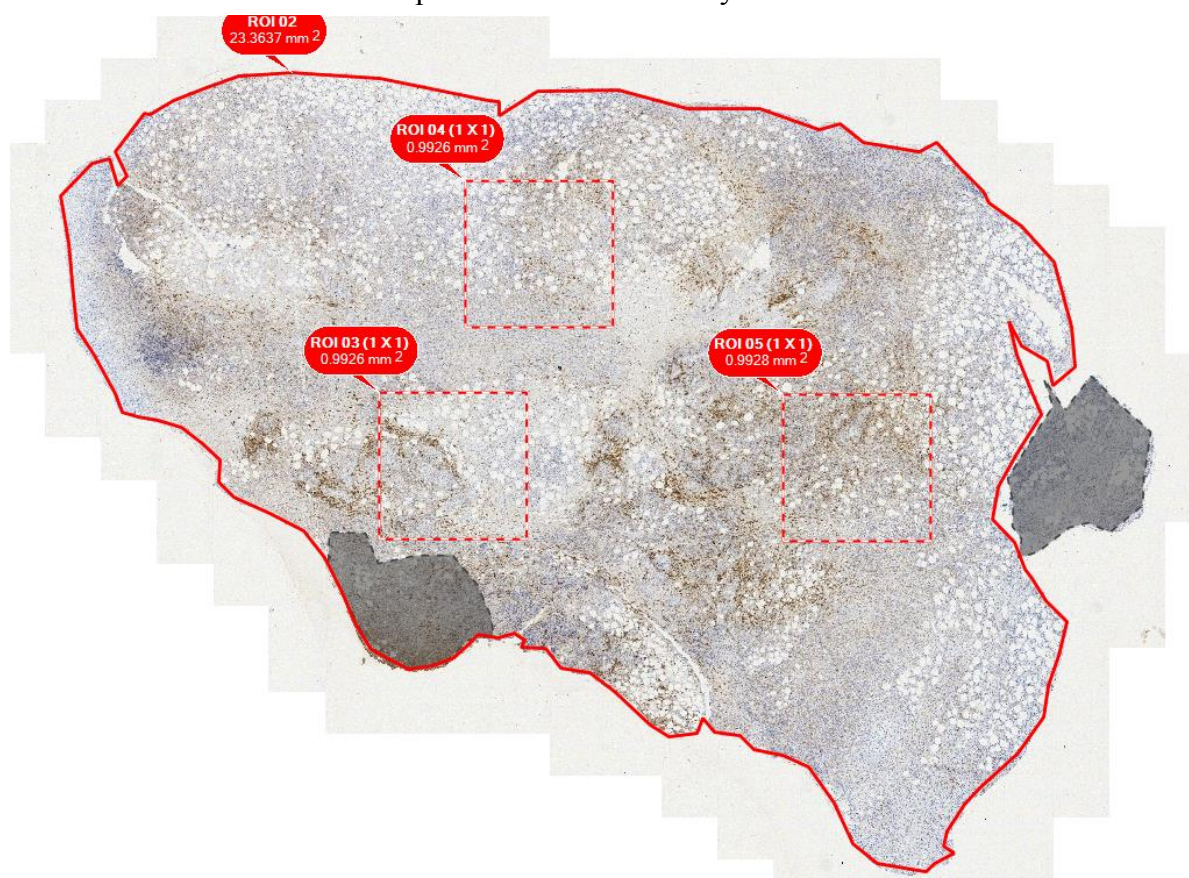
Po vložení podložních sklíček s preparáty do mikroskopu proběhla automatická kalibrace systému TissueFAXS. Následně byl proveden výběr kamery pro mikroskopování ve světlém poli, výběr vhodného objektivu pro vytváření náhledů zkoumaných tkání a nakonec výběr vhodného objektivu pro skenování tkání do PC v maximálním rozlišení.

Po dokončení nastavení mikroskop zobrazil náhledy jednotlivých preparátů, u kterých byly manuálně vybrány zájmové oblasti (ROI – Region Of Interest), jež byly určeny ke skenování. Po následném nastavení optimální saturace světla byly preparáty skenovány do PC při maximálním rozlišení (viz Obrázek 7).

Po naskenování preparátů pomocí TissueFAXS do PC byl prvním krokem analýzy výběr ROI určených k vyhodnocování. Artefakty či jiné oblasti nevhodné pro analýzu (potrhaná tkáň, fibrotická tkáň a nečistoty) byly vyřazeny. U několika vybraných ROI pak byly nastaveny parametry vlastní analýzy (viz Obrázek 8), a to výběr barevného odstínu studovaného markeru, určení velikosti jádra a diskriminované oblasti a nastavení buněčného pozadí. Následně došlo k samotné analýze tkání, jejímž výsledkem byla numerická hodnota, udávající počet buněk pozitivních na sledovaný marker.



Obrázek 7: Snímek řezu lymfatické uzliny pacienta s HL udávající počet buněk pozitivních na sledovaný marker.



Obrázek 8: Snímek řezu lymfatické uzliny pacienta s HL. Červeně ohraničená oblast ROI 02 představuje oblast určenou k analýze. Tmavě šedé oblasti značí tkáň, jež byla vyřazena z analýzy. Oblasti ROI 03, 04 a 05 značí místa, na kterých bylo provedeno nastavení parametrů analýzy.

5.6. Statistické vyhodnocení

Numerické hodnoty získané při analýze tkáňových preparátů byly následně vyhodnoceny pomocí statistického softwaru GraphPad Prism 5.01. Ke srovnání počtů/typů buněk u studovaných podskupin pacientů byl použit neparametrický Mann-Whitney U test, hodnoty $p \leq 0,05$ byly považovány za statisticky signifikantní.

6. Výsledky

6.1. Vyhodnocení počtu HRS buněk a LAM u pacientů s HL

U pacientů s HL byla provedena automatická obrazová analýza pomocí softwaru HistoQuest. Preparáty barvené hematoxylinem sloužily pro stanovení celkového počtu buněk u všech podskupin pacientů. Dále byly vyhodnoceny markery CD30 (marker HRS buněk) a CD68 (marker LAM) a jejich vzájemný poměr. Zjištěné počty buněk byly vztaženy na analyzované plochy tkání, čímž byla získána hustota buněk v tkáňových preparátech (viz Tabulka 6). V Tabulce 6 je také uvedeno procentuální zastoupení HRS buněk a LAM v lymfatických tkáních.

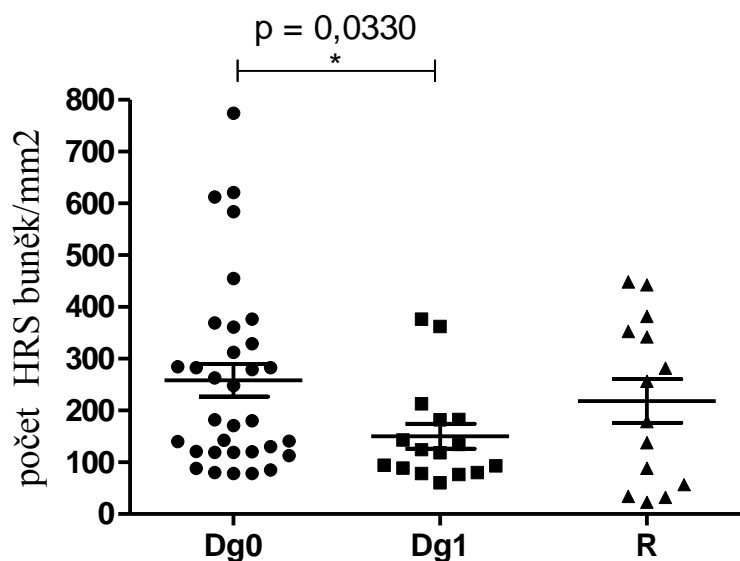
Tabulka 6: Vyhodnocení počtu HRS a LAM buněk u jednotlivých skupin pacientů s HL

	Dg0	Dg1	R
Průměrná analyzovaná plocha (±SD)	25,5 (± 7,0) mm²	31,8 (± 5,6) mm²	21,7 (± 5,7) mm²
Průměrný počet všech buněk (±SD)	446 601 (± 304 891)	489 339 (± 240 284)	322 364 (± 212 106)
Průměrná hustota buněk na 1 mm² (±SD)	17 305 (± 6 644)	15 132 (± 6 355)	14 832 (± 4 936)
Procentuální zastoupení CD30+ HRS buněk (±SD)	1,7 (± 0,8) %	1,1 (± 0,3) %	1,8 (± 0,8) %
Procentuální zastoupení CD68+ LAM (±SD)	9,2 (± 3,0) %	9,3 (± 1,8) %	9,9 (± 2,6) %

Poznámka: SD – směrodatná odchylka.

6.1.1. Vyhodnocení hustoty HRS buněk

Na základě počtu HRS buněk (CD30+) a analyzované plochy tkání byla spočítána hustota HRS buněk v tkáních. U Dg0 podskupiny pacientů s HL bylo pozorováno signifikantně větší zastoupení CD30+ HRS buněk, než u Dg1 podskupiny pacientů ($p=0,0330$; viz Graf 2). Při porovnání hustoty HRS buněk u ostatních podskupin pacientů nebyl pozorován rozdíl (viz Graf 2).

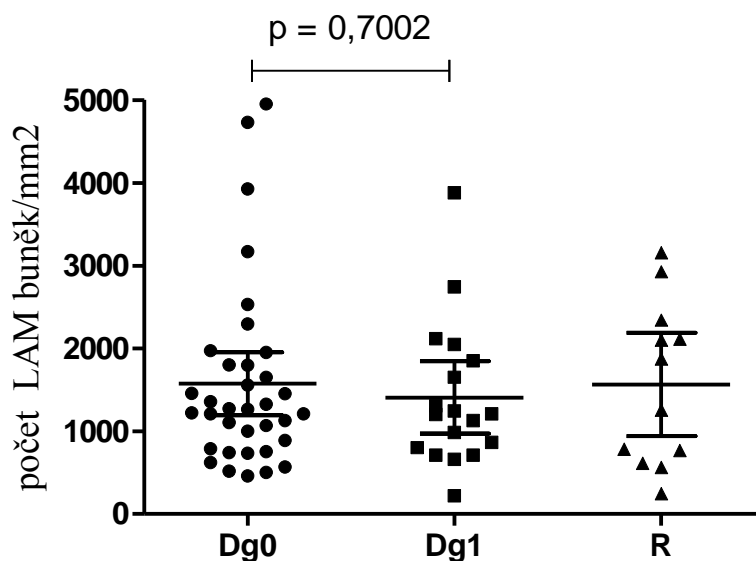


Graf 2: Hustota HRS buněk u jednotlivých skupin pacientů s HL

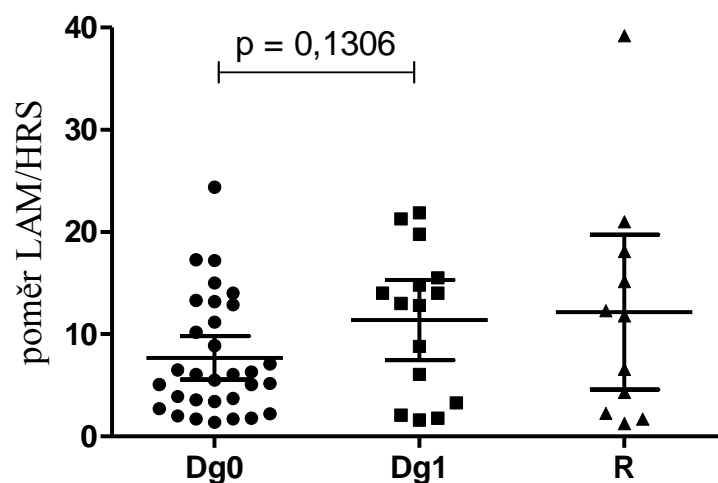
6.1.2. Vyhodnocení hustoty LAM a jejich poměru k HRS buňkám

Na základě počtu LAM (CD68+) v tkáních a analyzované plochy tkání byla spočítána hustota LAM u podskupin pacientů s HL. Rovněž byl u pacientů s HL vyhodnocen poměr LAM a HRS buněk.

Při porovnání podskupin pacientů s HL nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v zastoupení LAM mezi pacienty s remisí a relapsem (Dg0 vs. Dg1: $p=0,7002$; viz Graf 3). Rovněž poměr LAM/HRS se nelišil mezi pacienty s remisí a relapsem (Dg0 vs. Dg1: $p=0,1306$; viz Graf 4). Přestože pacienti v podskupině Dg0 vykazovali menší poměr LAM/HRS, rozdíl nebyl signifikantní (viz Graf 4).



Graf 3: Hustota LAM u jednotlivých skupin pacientů s HL



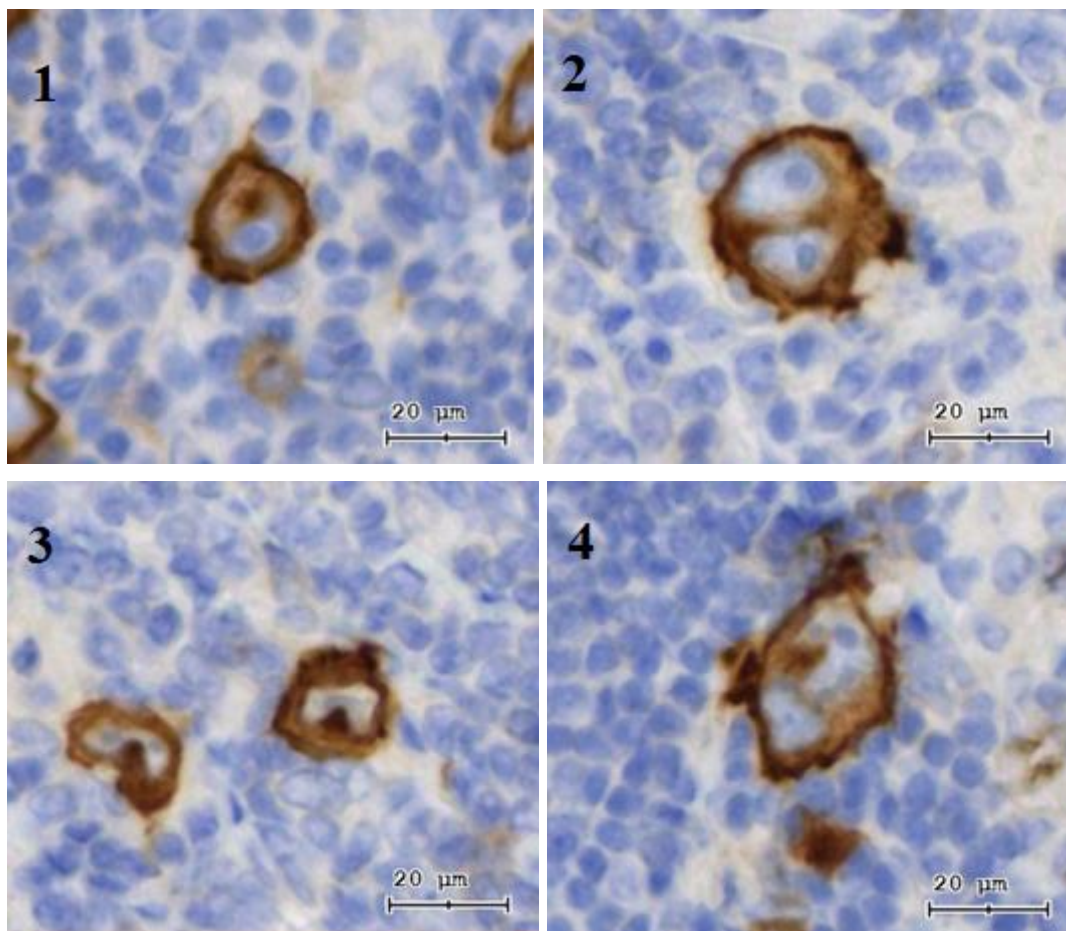
Graf 4: Poměr LAM/HRS buněk u jednotlivých skupin pacientů s HL

6.2. Vyhodnocení morfologie HRS buněk

Vedle hustoty HRS buněk a jejich poměru s LAM byla hodnocena také morfologie HRS buněk. Bylo vyhodnoceno procentuální zastoupení jednojaderných HRS buněk a také distribuce velikostí HRS buněk u podskupin pacientů s HL.

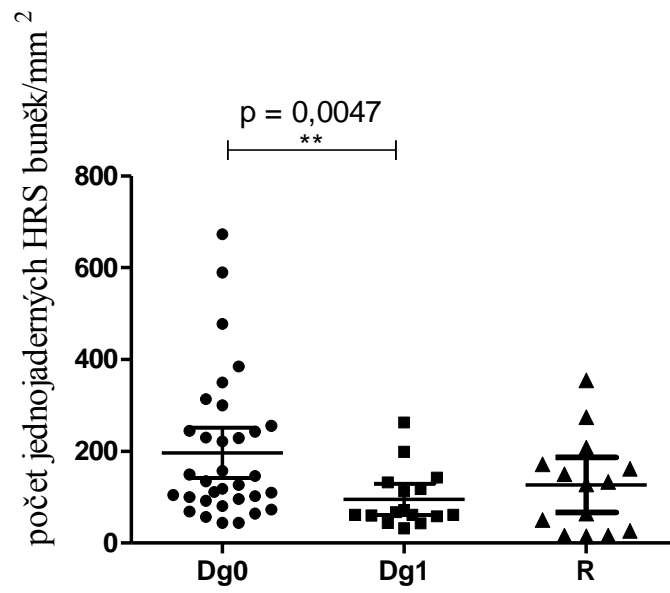
6.2.1. Vyhodnocení počtu a tvaru jader HRS buněk

U preparátů barvených na znak CD30 jsme pozorovali odlišné typy buněk (podle tvaru a počtu jader): buňky s 1 jádrem, buňky se 2 jádry (tzv. soví oči), buňky s ledvinovitými „kidney“ jádry a vícejaderné HRS buňky (viz Obrázek 9).

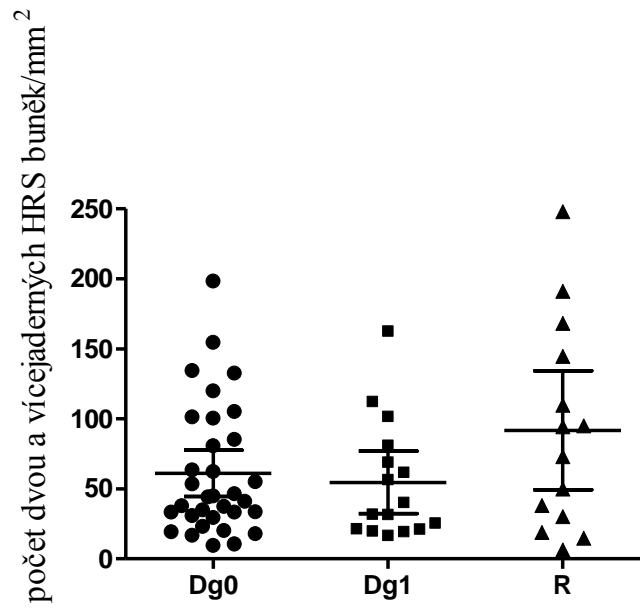


Obrázek 9: Morfologické typy HRS buněk. 1. Jednojaderná Hodgkinova buňka, 2. Dvoujaderná Reed-Sternbergova buňka (soví oči), 3. HRS buňka s jádrem ledvinovitého tvaru (kidney), 4. Vícejaderná HRS buňka

Při porovnání jednotlivých typů HRS buněk u podskupin HL pacientů byla pozorována vyšší hustota jednojaderných HRS buněk u pacientů s remisí než u pacientů s relapsem (Dg0 vs. Dg1: $p=0,0047$; viz Graf 5). Při porovnání ostatních podskupin pacientů nebyl pozorován rozdíl v hustotě jednojaderných HRS buněk (viz Graf 5). Při porovnání hustoty dvou a vícejaderných HRS buněk u studovaných podskupin HL pacientů nebyl pozorován signifikantní rozdíl (viz Graf 6).

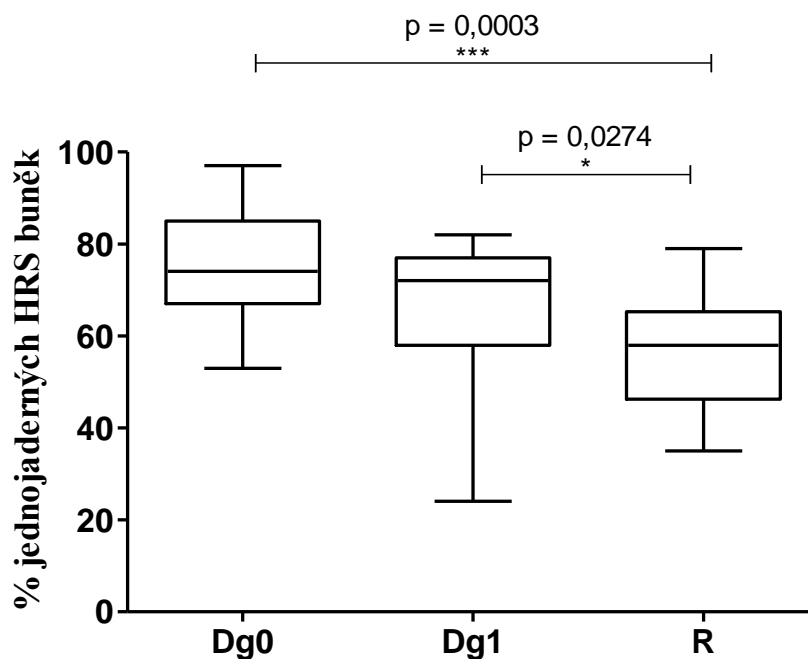


Graf 5: Hustota jednojaderných HRS buněk u jednotlivých skupin pacientů s HL



Graf 6: Hustota dvou a vícejaderných HRS buněk u jednotlivých skupin pacientů s HL

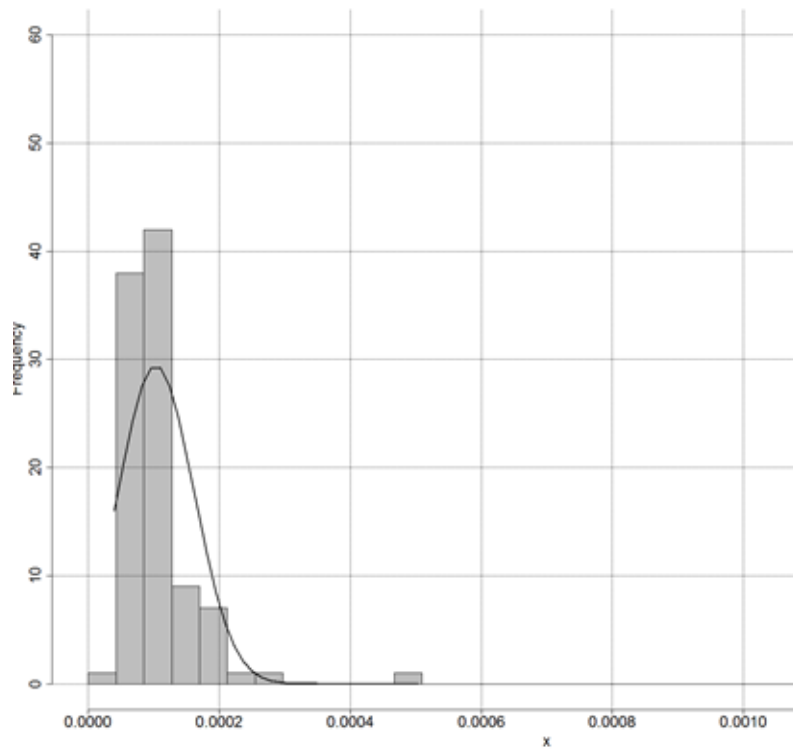
Dále bylo vyhodnoceno procentuální zastoupení jednojaderných HRS buněk v jednotlivých podskupinách pacientů s HL. Vyšší procentuální zastoupení jednojaderných HRS buněk bylo pozorováno u Dg0 pacientů v porovnání s R podskupinou pacientů ($p=0,0003$; viz Graf 7). Při porovnání Dg1 a R podskupin pacientů jsme pozorovali vyšší procentuální zastoupení u Dg1 pacientů ($p=0,0274$; viz Graf 7).



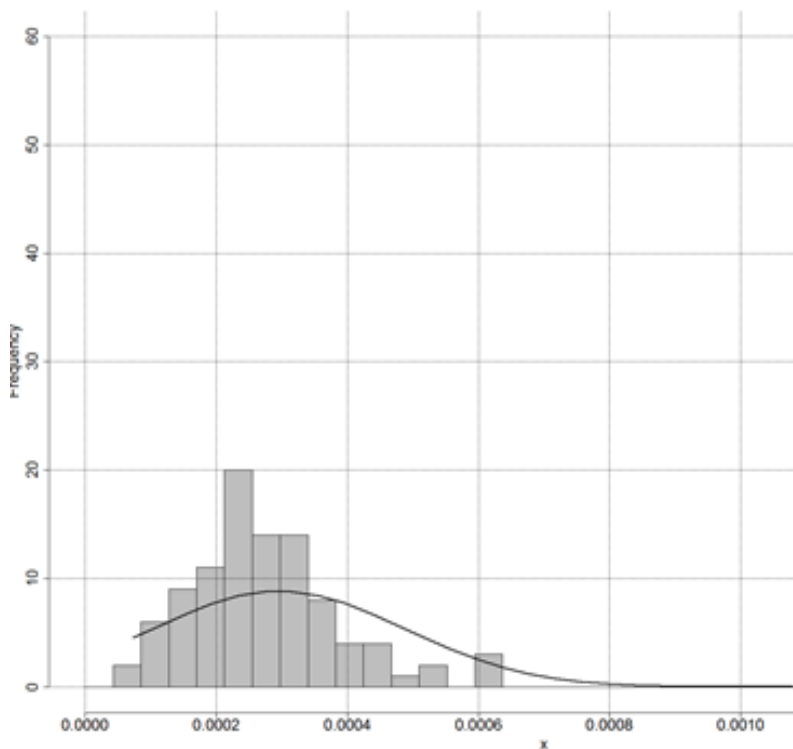
Graf 7: Procentuální zastoupení jednojaderných HRS buněk v jednotlivých skupinách pacientů s HL

6.2.2. Vyhodnocení distribuce velikostí HRS buněk

Bylo také provedeno vyhodnocení distribuce velikostí buněk, jak je znázorněno u dvou reprezentativních pacientů z podskupin Dg0 a Dg1 (viz Graf 8 a 9). U podskupiny Dg0 byl prokázán častější výskyt menších jednojaderných HRS buněk než u Dg1 podskupiny pacientů, u kterých se častěji vyskytovaly větší HRS buňky zpravidla s více jádry (viz Graf 8 a 9).



Graf 8: Distribuce velikostí HRS buněk u pacienta skupiny Dg0 vyhodnocena pomocí softwaru Kernel. Na ose x je znázorněna velikost HRS buněk v mm^2 . Na ose y je znázorněna četnost výskytu HRS buněk.



Graf 9: Distribuce velikostí HRS buněk u pacienta skupiny Dg1 vyhodnocena pomocí softwaru Kernel. Na ose x je znázorněna velikost HRS buněk v mm^2 . Na ose y je znázorněna četnost výskytu HRS buněk.

7. Diskuse

Hodgkinův lymfom (HL) je lymfoproliferativní maligní onemocnění vyznačující se proliferací CD15+ a CD30+ B-lymfocytů u podtypu CHL a CD20+ B-lymfocytů u NLPHL podtypu této nemoci. Pro HL je charakteristický také výskyt gigantických nádorových HRS buněk (Diefenbach et al., 2013; Rengstl et al., 2014). V současné době neexistují spolehlivé prognostické markery, které by uměly určit skupinu rizikových nemocných s velkou pravděpodobností relapsu. U těchto rizikových pacientů by se pak nabízela léčba novými léky typu Brentuximabu vedotinu (Diefenbach et al., 2013), který se specificky váže na protein CD30, jež je vysoce exprimován na povrchu HRS buněk.

Cílem této bakalářské práce bylo vyhodnocení počtu HRS buněk (CD30+) a s lymfomem asociovaných makrofágů (LAM, CD68+) u biopsií lymfatických uzlin odebraných pacientům s HL, kteří byli dále rozřazeni do podskupin dle vývoje onemocnění. Zaměřili jsme se na studium odlišností v počtu a morfologii nádorových HRS buněk v rámci srovnávaných podskupin pacientů s HL pomocí automatického obrazového analyzačního systému TissueFAXS a na studium počtu LAM a jejich poměr k HRS buňkám u podskupin pacientů dle vývoje onemocnění.

Ve srovnání s popsányými studiiemi náš přístup umožňuje analýzu velkých oblastí bioptovaného materiálu. Do této doby byly u podobných typů prací analyzovány pouze 2-3 výseče o velikosti 1 mm² (Greaves et al., 2013; Kamper et al., 2011). U pacientů s HL se však setkáváme s velkou heterogenitou výskytu HRS buněk v bioptovaných tkáních. Proto analýzy malých oblastí mohou vést k podhodnocení příp. nadhodnocení výskytu HRS buněk i dalších buněk mikroprostředí. V naší práci byl použit automatický analyzační systém TissueFAXS, který je schopen analyzovat tkáň nadstandardních rozměrů. Průměrné námi hodnocené velikosti ploch se pohybovaly od 21,7 mm² do 31,8 mm².

Prvním zkoumaným parametrem bylo zastoupení HRS buněk v tkáních lymfatických uzlin u pacientů s HL. Signifikantně větší hustota těchto nádorových buněk v tkáních byla prokázána u podskupiny pacientů, u nichž došlo k remisi onemocnění, v porovnání s pacienty, u kterých došlo v době sledování k relapsu onemocnění. Dle našich znalostí nebyl tento parametr zatím u tkání pacientů s HL studován. Pro diagnostické účely stačí identifikovat několik HRS buněk v lymfatických uzlinách pacientů. V předkládané práci se nám podařilo kvantifikovat počty HRS buněk na studovaných tkáních a odhalit rozdíly v zastoupení HRS buněk mezi pacienty s remisí a relapsem onemocnění.

Dalším zkoumaným parametrem byla hustota výskytu buněk mikroprostředí, konkrétně makrofágů asociovaných s lymfomem (LAM) a jejich poměr k HRS buňkám. Existují studie popisující vztah mezi nepříznivým výsledkem léčby a vysokým počtem CD68+ LAM (Greaves et al., 2013; Kamper et al., 2011). Tuto hypotézu potvrzuje i Touati ve své studii z roku 2014. Do ní bylo zařazeno 158 pacientů s HL rozdělených do dvou skupin: skupina s nízkým počtem CD68+ LAM (121 pacientů) a skupina s vysokým počtem CD68+ LAM (37 pacientů). Celkové přežití během sledované doby (5 let) bylo významně vyšší u skupiny s nízkým počtem LAM (88,4 % vs. 62,3 %, $p=0,015$). V naší studii jsme však nepozorovali rozdíl v zastoupení LAM ani v poměru LAM/HRS u studovaných podskupin pacientů. Jedním z důvodů dosažení rozdílných výsledků může být právě odlišná velikost analyzované plochy tkání lymfatických uzlin.

Dále jsme se zaměřili na studium morfolgie nádorových HRS buněk. Díky námi použité vysoce inovativní technologii TissueFAXS bylo možné sledovat nádorové buňky ve vysokém rozlišení a snadno tak rozpoznat jednotlivé morfologické typy buněk, hodnotit počet jader a měřit velikost HRS. V literatuře byly již roku 1988 popsány dva typy buněk charakteristických pro HL, tedy Hodgkinovy a Reed-Sternbergovy (HRS) buňky. Odlišovaly se např. expresí proliferačního markeru Ki-67 a samozřejmě počtem jader (Hsu et al., 1988): Hodgkinovy buňky mají jedno jádro, Reed-Sternbergovy buňky dvě a více jader (Küppers et al., 1995; Rengstl et al., 2014; Thomas et al., 2004). Existoval předpoklad, že i původ těchto buněk je odlišný. Původní hypotéza o původu RS buněk předpokládala, že vznikají fúzí dvou a více Hodgkinových buněk. Toto však bylo vyvráceno například v práci z roku 2001, v níž Re et. al. popsal, že velké vícejaderné RS buňky nevznikají fúzí, nýbrž endomitoticky z B-lymfocytů. Tuto hypotézu potvrzují také další studie (Matsuki et al., 2015; Pileri et al., 2002; Rengstl et al., 2014). Avšak byly popsány i vzácné případy, kdy RS buňky vznikly z T-lymfocytů (Kuppers, 2002).

V rámci naší studie jsme pozorovali několik různých typů HRS buněk (podle tvaru a počtu jader): jednojaderné, dvoujaderné (soví oči), buňky s ledvinovitými „kidney“ jádry a vícejaderné HRS buňky. Prokázali jsme vyšší hustotu jednojaderných HRS buněk v tkáních pacientů, u kterých došlo k remisi onemocnění, v porovnání s pacienty, u kterých v průběhu sledování došlo k relapsu. Naše studie tak poukazuje na souvislost hustoty jednojaderných HRS buněk u pacientů s remisí s možnou dobrou prognózou onemocnění.

Dále byla hodnocena také velikost HRS buněk. V literatuře se velikost HRS buněk pohybuje okolo 50 μm diametrálně (Amini, 2002; Kuppers et al, 2005). Velikost námi

měřených HRS buněk byla u pacientů, u kterých došlo k remisi onemocnění, v podstatě shodná s literaturou, ovšem u relabujících pacientů jsme pozorovali častější výskyt větších HRS buněk, jejichž průměr byl ve výjimečných případech i mnohonásobně větší. V souladu s tím byl při vyhodnocení distribuce velikostí buněk prokázán častější výskyt menších jednojaderných HRS buněk u pacientů s remisí v porovnání s pacienty, u kterých došlo k relapsu onemocnění.

Velmi zajímavá je také skupina pacientů, u nichž jsme měli k dispozici vzorky z doby relapsu. U těchto pacientů jsme našli větší HRS buňky s více jádry. Ačkoli je potřeba naše nálezy potvrdit na větším souboru nemocných, ukazuje se, že přítomnost větších HRS buněk s více jádry je negativním prognostickým markerem HL onemocnění.

Použitím automatického obrazového analyzačního systému TissueFAXS jsme pozorovali rozdíly v zastoupení HRS buněk i v počtu jejich jader a velikostí u studovaných podskupin pacientů s HL. Naše nálezy poukazují na využitelnost automatické analýzy velkých oblastí bioptované tkáně pomocí systému TissueFAXS.

8. Závěr

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována rešerše na téma Hodgkinův lymfom (HL) se zaměřením na roli mikroprostředí v jeho patogenezi. Jak naznačují poslední výzkumy, mikroprostředí je nezbytné pro přežití nádorových HRS buněk a jeho pochopení tedy může mít výrazný dopad do klinické praxe.

Experimentální část práce byla zaměřena na analýzu tkání lymfatických uzlin u pacientů s (HL), u kterých došlo v době sledování k remisi nebo relapsu onemocnění. U podskupiny pacientů, u kterých došlo k remisi, bylo pozorováno větší zastoupení CD30+ HRS buněk než u podskupin relabujících pacientů. V rámci studia mikroprostředí bylo studováno také zastoupení s lymfomem asociovaných makrofágů (LAM) v okolí nádorových HRS buněk. Při porovnání počtu LAM a poměru LAM/HRS nebyl pozorován rozdíl u studovaných podskupin HL pacientů.

V další části práce jsme se zaměřili na vyhodnocení počtu jader a velikosti HRS buněk. U pacientů, u kterých došlo k remisi onemocnění, byla pozorována vyšší hustota jednojaderných HRS buněk ve srovnání s pacienty, u kterých došlo v době sledování k relapsu onemocnění. Analýza distribuce velikostí HRS buněk u HL pacientů pak prokázala častější výskyt menších jednojaderných HRS buněk u pacientů s remisí, zatímco u pacientů s relapsem bylo pozorováno vyšší zastoupení větších vícejaderných HRS buněk.

Naše studie prokázala rozdíly v počtu i morfologii nádorových HRS buněk u podskupin pacientů s HL dle vývoje onemocnění. Přestože je potřeba naše výsledky potvrdit na větších počtech pacientů, ukazuje se, že vyhodnocení počtu jader a velikostí HRS buněk by mohlo být vhodným prognostickým markerem u pacientů s HL. Naše nálezy také potvrzují využitelnost automatické analýzy velkých oblastí bioptované tkáně pomocí systému TissueFAXS.

Výsledky získané v naší studii byly prezentovány na mezinárodní konferenci „21st Congress of the European Hematology Association“ pořádané v červnu 2016 v Dánsku, a také na XXX. Olomouckých hematologických dnech, probíhajících v květnu 2016 v Olomouci.

9. Seznam použité literatury

- ALEXANDER, F.E., JARRETT, R.F., LAWRENCE, D., ARMSTRONG, A.A., FREELAND, J., GOKHALE, D. A., KANE, E., TAYLOR, G.M., WRIGHT, D.M., CARTWRIGHT, R.A. (2000): Risk factors for Hodgkin's disease by Epstein-Barr virus (EBV) status: prior infection by EBV and other agents. *British Journal of Cancer*, 82(5): 1117–1121.
- AMINI, R.M. (2002): Hodgkin lymphoma. Studies of advanced stages, relapses and the relation to non-Hodgkin lymphomas. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine* 1132. 64pp. Uppsala. ISBN 91-554-5265-5.
- BALLOVÁ, V. (2008): Hodgkinov lymfóm. *Onkológia*, 3(2): 89-92.
- BERANOVÁ, M., TONAR, Z. (2002): Principy a příklady imunohistochemie. Příručka pro studenty.
- DIEFENBACH, C., STEIDL, CH. (2013): New Strategies in Hodgkin Lymphoma: Better Risk Profiling and Novel Treatments. *Clin Cancer Res*, 19(11): 2797-803.
- DIEHL, V. (2003): Advanced and relapsed Hodgkin,s disease (HD): treatment strategies and future directions. *The Hematology Journal*, 4(3): 222–230.
- DIEHL, V. (2004): Ten years after REAL classification: Hodgkin's lymphoma in the European perspective. *Haematologica*, 89(9): 78-79.
- FERMÉ, CH. (2003): Hodgkin's lymphoma: place of radiation therapy. *The Hematology Journal*, 4(3): 212-217.
- GLASER, S.L., CHANG, E.T., CLARKE, C.A., ET AL. (2011): Epidemiology. In: Engert A, Horning SJ, eds. *Hematologic Malignancies: Hodgkin Lymphoma*. PA: Springer – Verlag Berlin Heidelberg: 3–20.
- GOMOLČÁK, P. (1997): *Základy imunohistochemie v patologii*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně. ISBN 80-7013-239-6.
- GREAVES, P., CLEAR, A., COUTINHO, R., WILSON, A., MATTHEWS, J., OWEN, A., SHANYINDE, M., LISTER, T.A., CALAMINICI, M., GRIBBEN, J.G. (2013): Expression of FOXP3, CD68, and CD20 at diagnosis in the microenvironment of classical Hodgkin lymphoma is predictive of outcome. *J Clin Oncol*, 31(2): 256-62.
- HANSEN, H.P., TRAD, A., DAMS, M., ZIGRINO, P., MOSS, M., TATOR, M., SCHÖN, G., GRENZI, P.C., BACHURSKI, D., AQUINO, B., DÜRKOP, H., REINERS, R.S., BERGWELT-BAILDON, M. VON, HALLER, M., GRÖTRZINGER, J.,

- ENGERT, A., PAES LEME, A.F., STRANDMANN, E.P. VON. (2016): CD30 on extracellular vesicles from malignant Hodgkin cells supports damaging of CD30 ligand-expressing bystander cells with Brentuximab-Vedotin, in vitro. *Oncotarget*.
- HASENCLEVER, D., DIEHL, V. (1998): A prognostic score for advanced Hodgkin's disease: international prognostic factors project on advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med*, 339: 1506–14.
- HAYBITTLE, J.L., HAYHOE, F.G., EASTERLING, M.J., ET AL. (1985): Review of British National Lymphoma Investigation studies of Hodgkin's disease and development of prognostic index. *Lancet*, 1: 967–72.
- HODGKIN, T. (1832): On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med. Chir. Trans*, 17: 68–114.
- HUDEČEK, J. (2006): Hodgkinovy lymfomy – současná diagnostika a léčba. *Onkolog*ia, 1(2): 118-121.
- CHEMNITZ, J.M., EGGLE, D., DRIESEN, J., ET AL. (2007): RNA fingerprints provide direct evidence for the inhibitory role of TGFbeta and PD-1 on CD4+ T cells in Hodgkin lymphoma. *Blood*, 110(9): 3226-3233.
- IMAI, K., MATSUYAMA, S., MIYAKE, S., SUGA, K., NAKACHI, K. (2000): Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*, 356(9244): 1795-1799.
- INDRÁK, K. (2006): Hodgkinův lymfom, Hematologie. ISBN 8072548689.
- JAFFE, E., HARRIS, N.L., STEIN, H., ET AL. (2001): Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France, IARC Press, pp 240-243.
- KAMPER, P., BENDIX, K., HAMILTON-DUTOIT, S., HONORE, B., NYENGAARD, J.R., D'AMORE, F. (2011): Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, 96: 269–76.
- KRÁL, Z. (2014): Léčba lokalizovaného stadia Hodgkinova lymfomu. *Onkologie*, 8(3): 112-116.
- KÜPPERS, R., HANSMANN, M.L. (2005): The Hodgkin and Reed/Sternberg cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37.3: 511-517.
- KÜPPERS, R., HANSMANN, M.L., DIEHL, V., RAJEWSKY, K. (1995): Molecular single-cell analysis of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Molecular Medicine Today*, 1: 26-30.

- KÜPPERS, R., RAJEWSKY, K. (1998): The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol*, 16: 471–93.
- LISTER, T.A., CROWTHER, D., SUTCLIFFE, S.B., ET AL. (1989): Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol*, 7: 1630–36.
- LUKÁŠ, Z., DRÁBEROVÁ, E., FEIT, J., VOJTĚŠEK, B. (1997): *Imunohistochemické metody v biologii a v biotické diagnostice*. Brno: Masarykova universita v Brně. ISBN 80-210-0620-X.
- MARKOVÁ, J. (2011): Redukce toxicity primární léčby pokročilého Hodgkinova lymfomu. *Onkologie*, 5(5): 295-297.
- MARKOVÁ, J. (2013): Pokroky v léčbě Hodgkinova lymfomu. *Postgraduální medicína*, 5: 67-73.
- MATSUKI, E., YOUNES, A. (2015): Lymphomagenesis in Hodgkin lymphoma, *Seminars in Cancer Biology*, 34: 14-21.
- MAUCH, P.M., ARMITAGE, J.O., DIEHL, V., ET AL. (1999): *Hodgkin's disease*, Lippincott Williams & Wilkins, 1-802.
- NOGOVA, L., REINEKE, T., BRILLANT, C., ET AL. (2008): Lymphocyte-predominant and classical Hodgkin's lymphoma: a comprehensive analysis from the German Hodgkin Study Group. *J Clin Oncol*, 26, p. 434-439.
- PENN, I., STARZL, T.E. (1973): Immunosuppression and cancer. *Transplant Proc.* 5(1): 943-947.
- PILERI, S.A., ASCANI, S., LEONCINI, L., ET AL. (2002): Hodgkin's lymphoma: The pathologist's viewpoint. *J Clin Pathol*, 55: 162-176.
- RENGSTL, B., RIEGER, M.A., NEWRZELA, S. (2014): On the origin of giant cells in Hodgkin lymphoma. *communicative & integrative Biology*, 7:e 28602.
- SAUER, M., PLUTSCHOW, A., JACHIMOWICZ, R.D., ET AL. (2013): Baseline serum TARC levels predict therapy outcome in patients with Hodgkin lymphoma. *Am J Hematol*, 88(2): 113-115.
- STEIDL, C., CONNORS, J.M., GASCOYNE, R.D. (2011): Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. *J Clin Oncol.* 2011, 29(14): 1812-26.
- STEIDL, C., LEE, T., SHAH, S.P., ET AL. (2010): Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 362(10): 875-885.

- STEIN, H., DELSOL, G., PILERI, S., ET AL. Hodgkin lymphoma: 237-253. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H., et al. Pathology and genetics of tumours and haematopoietic and lymphoid tissues (World Health Organization classification of tumours), IARC Press, Lyon, 2001.
- STEIN, H., HUMMEL, M. (1999): Hodgkin's disease: biology and origin of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Cancer Treatment Reviews*, 25: 161-168.
- THOMAS, R.K., RE, D., WOLF, J., DIEHL, V. (2004): Part I: Hodgkin's lymphoma – molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Lancet Oncol*, 5: 11-18.
- TOUATI, M., DELAGE-CORRE, M., MONTEIL, J., ABRAHAM, J., MOREAU, S., REMENIERAS, L., GOURIN, M.P., DMYTRUK, N., OLIVRIE, A., TURLURE, P., GIRAULT, S., LABROUSSE, F., PREUX, P.M., JACCARD, A., BORDESSOULE, D. (2014): CD68-positive tumor-associated macrophages predict unfavorable treatment outcomes in classical Hodgkin lymphoma in correlation with interim fluorodeoxyglucose-positron emission tomography assessment. *Leuk Lymphoma*, 56(2): 332-41.
- VAN DEN NESTE, E., CASASNOVAS, O., ANDRÉ, M., TOUATI, M., SENEAL, D., EDELINE, V. STAMATOULLAS, A., FORNECKER, L., DEAU, B., GASTINNE, T., REMAN, O., GAILLARD, I., BOREL, C., BRICE, P., FERMÉ, C. (2013): Classical Hodgkin's lymphoma: the Lymphoma Study Association guidelines for relapsed and refractory adult patients eligible for transplant. *Haematologica*, 98(8), 1185–1195.
- VARDHANA, S., YOUNES, A. (2016): The immune microenvironment in Hodgkin lymphoma: T cells, B cells, and immune checkpoints. *Haematologica*, 101(7): 794-802.
- YUNG, L., LINCH, D. (2003): Hodgkin's Lymphoma. *Lancet*, 361: 943-51.
- ŽIKAVSKÁ, Ľ., MARKOVÁ, J. (2010): Pozdní následky léčby Hodgkinova lymfomu. *Onkologie*, 4(3): 164-166.
- <http://www.ascopost.com/issues/december-15-2011/how-should-we-treat-nodular-lymphocyte-predominant-hodgkin-lymphoma.aspx>, navštíveno dne 18. 6. 2016.
- <http://www.bga.su/info/TissueFAXS.pdf>, navštíveno dne 23. 6. 2016.
- <http://www.hodgkin.cz/diagnostika/>, navštíveno dne 17. 6. 2016.
- http://www.pathpedia.com/education/eatlas/histopathology/lymph_node/hodgkin_lymphoma_mixed_cellularity_subtype.aspx, navštíveno dne 17. 6. 2016.

<https://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node8.html>, navštíveno dne 17. 6. 2016.

10. Seznam použitých zkratek

AP1 – Aktivátor protein 1	IPS – Mezinárodní prognostické skóre
BNLI – The British National Lymphoma Investigation	L&H – Lymfocytární a histiocytární buňky
CCL5 – Chemokine (C-C motif) ligand 5	LAM – S lymfomem asociované makrofágy
CCL17/TARC – Chemokine (C-C motif) ligand 17	LDCHL – Lymfocytární deplece
CCL22 – Chemokine (C-C motif) ligand 22	LMP1 – Latent membrane protein 1
CD15 – Cluster of differentiation 15	LMP2 – Latent membrane protein 2
CD20 – Cluster of differentiation 20	LRCHL – Klasický Hodgkinův lymfom bohatý na lymfocyty
CD30 – Cluster of differentiation 30	MCCHL – Smíšená buněčnost
CD68 – Cluster of differentiation 68	NF- κ B – Nuclear factor-kappa B
c-FLIP – Cellular FLICE-like inhibitory protein	NLPHL – Nodulární Hodgkinův lymfom s lymfocytární predominancí
EBV – Epstein-Barr virus	NSCHL – Nodulární skleróza
EORTC – European Organisation for the Research and Treatment of Cancer	Oct2 – Octamer transcription factor 2
GHSB – German Hodgkin's Study Group	PAP – Peroxidáza-anti-peroxidázový komplex
HL – Hodgkinův lymfom	PC – Personal computer
HRP – Křenová peroxidáza	PD-1 – Programmed cell death protein 1
HRS – Hodgkinova a Reed-Sternbergova buňka	PD-L1 – Programmed death-ligand 1
CHL – Klasický Hodgkinův lymfom	PD-L2 – Programmed death-ligand 2
IL-2 – Interleukin 2	ROI – Region of interest
IL-4 – Interleukin 4	SABC – Streptavidin-biotin complex
IL-5 – Interleukin 5	SD – Směrodatná odchylka
IL-6 – Interleukin 6	STAT – Signal transducer and activator of transcription protein
IL-7 – Interleukin 7	Th2 – Helper T-lymphocyte 2
IL-9 – Interleukin 9	Treg – Regulační T-lymfocyt
IL-10 – Interleukin 10	WHO – World Health Organization
IL-13 – Interleukin 13	