

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
Katedra biologických a lékařských věd

**Imunofenotypizace malignit ze zralých B-buněk**

Rigorózní práce

Vedoucí práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

**Hradec Králové 2016**

**Mgr. Eva Babuňková**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

4. 1. 2016

Touto cestou bych ráda poděkovala PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. a prim. MUDr. Martinu Špačkovi, PhD. za pomoc, cenné připomínky, trpělivost a velkou ochotu při realizaci práce.

## **ABSTRAKT**

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Autor: Mgr. Eva Babuňková

Školitel: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Název rigorózní práce: Imunofenotypizace malignit ze zralých B-buněk

Rigorózní práce se zabývá stanovením fenotypu B-lymfoproliferativních onemocnění metodou průtokové cytometrie, která v současné době přispívá k určení diagnózy a klasifikace těchto onemocnění. Kromě diagnostiky je průtokové cytometrie v současné době stále více využívána po léčbě některých hematologických malignit k monitorování minimální reziduální nemoci (např. chronická lymfocytární leukemie). Velkou výhodou průtokové cytometrie je možnost vyšetřit různé druhy materiálů. V práci se konkrétně jedná o periferní krev a kostní dřeň. Cílem práce bylo porovnat expresi vybraných povrchových znaků u pacientů s odlišným B-lymfoproliferativním onemocněním v periferní krvi a v kostní dřeni. Celkem bylo analyzováno 171 vzorků (79 vzorků periferní krve a 92 vzorků kostní dřene), které byly měřeny na průtokovém cytometru BD FACS Canto II. Soubor tvořilo celkem 75 žen a 96 mužů. Vzorky periferní krve i kostní dřene byly dle četnosti rozděleny na skupiny: CLL, MCL, B-NHL NOS a ostatní B lymfoproliferace.

Diagnostika B-lymfoproliferativních onemocnění je založena na charakteristické expresi znaků CD45, CD19, CD20, CD22 a určení klonality (určeno expresí lehkých řetězců KAPPA nebo LAMBDA). Ostatní znaky jsou využívány k určení konkrétního typu B-lymfoproliferativního onemocnění. Jedná se především o znaky CD5, CD10, CD23, CD43, CD200, CD103, CD79b, CD38 a IgM. Nově by se mohlo jednat i o znaky CD81 a CD49d.

## **ABSTRACT**

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Author: Mgr. Eva Babuňková

Supervisor: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Title of rigorous thesis: Immunophenotyping of mature B-cell neoplasms

This thesis focuses on the B-lymphoproliferative diseases immunophenotype assessed by flow cytometry, which is a method currently used for the diagnosis and classification of these diseases. Apart from the diagnostic value, flow cytometry can be used for minimal residual disease monitoring after the treatment of hematological malignancies (e.g. chronic lymphocytic leukemia). A great advantage of flow cytometry is the possibility of analysing virtually any biological material. In our work we investigated peripheral blood and bone marrow. The aim of the study was to compare the expression of selected surface markers in patients suffering from different B-lymphoproliferative disorders in peripheral blood and bone marrow. We analysed 171 samples (79 peripheral blood samples and 92 bone marrow samples), which were measured on a flow cytometer BD FACS Canto II. Seventy-five women and ninety-six men we included in the study. Peripheral blood samples and bone marrow samples were sorted into the following groups: CLL, MCL, B-NHL NOS and other B lymphoproliferation disorders.

Diagnosis of B-lymphoproliferative diseases is based on the characteristic expression of CD45, CD19, CD20, CD22 and detection of monoclonal B-cell expansion (determined by the expression of the light chain KAPPA or LAMBDA). Additional markers are used to further classify the type of B-lymphoproliferative disease. The essential markers are CD5, CD10, CD23, CD43, CD200, CD103, CD79b, CD38 and IgM. Recently a diagnostic value of CD81 and CD49d have been showed as well.

## Obsah

Seznam zkratek .....	8
1 Úvod a cíl práce .....	12
1.1 Úvod práce .....	13
1.2 Cíl a popis zadání práce .....	14
2 Teoretická část.....	15
2.1 Průtoková cytometrie .....	16
2.1.1 Historie.....	16
2.1.2 Základní komponenty průtokového cytometru.....	17
2.1.3 Měřené parametry .....	22
2.1.4 Fluorochromy, fluorescence, spektrum .....	23
2.1.5 Využití průtokové cytometrie .....	26
2.1.6 CD znaky .....	28
2.1.7 EuroFlow .....	29
2.2 Malignity ze zralých B-buněk.....	30
2.2.1 Chronická lymfocytární leukemie / lymfom z malých lymfocytů (CLL/SLL).....	32
2.2.2 B prolymfocytární leukemie (B-PLL) .....	35
2.2.3 Leukémie z vlasatých buněk (HCL).....	35
2.2.4 Lymfoplazmocytární lymfom (LPL) / Waldenströmova makroglobulinemie .....	37
2.2.5 Malignity z plazmatických buněk.....	38
2.2.6 Folikulární lymfom (FL).....	38
2.2.7 Lymfom z pláštěvých buněk (MCL).....	39
2.2.8 Difuzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL).....	40
2.2.9 Mediastinální velkobuněčný B-lymfom (MLBCL).....	41
2.2.10 Intravaskulární velkobuněčný B-lymfom .....	41
2.2.11 Primární exsudativní lymfom (PEL).....	41
2.2.12 Burkittův lymfom (BL).....	42
2.2.13 Lymfom z marginální zóny (MZL) .....	43
2.2.14 Splenický lymfom z B buněk marginální zóny (SMZL).....	43

2.2.15	Extranodální lymfom z B-buněk marginální zóny ze slizniční lymfatické tkáně (MALT lymfom) .....	43
2.2.16	Nodální lymfom z B-buněk marginální zóny (NMZL) .....	44
2.2.17	Lymfomatoidní granulomatóza (LYG).....	44
3	Praktická část.....	45
3.1	Použité přístroje, chemikálie a příprava vzorků.....	46
3.1.1	Použité přístroje a pomůcky .....	46
3.1.2	Použité chemikálie a příprava.....	46
3.1.3	Použitý biologický materiál, příprava materiálu.....	47
3.1.4	Postup značení monoklonálními protilátkami .....	47
3.2	Gatovací strategie.....	48
3.3	Charakteristika souboru pacientů.....	49
4	Výsledky.....	50
4.1	Skupina pacientů s chronickou lymfocytární leukemií, nálezy v periferní krvi a kostní dřeni.....	51
4.2	Skupina pacientů s lymfomem z buněk pláštěvé zóny, nálezy v periferní krvi a kostní dřeni.....	53
4.3	Skupina pacientů s B non-hodgkinským lymfomem nespecifického fenotypu, nálezy v periferní krvi a kostní dřeni .....	55
4.4	Skupina pacientů s ostatními B lymfoproliferacemi, nálezy v periferní krvi a kostní dřeni.....	57
4.5	Skupina pacientů s folikulárním lymfomem, nálezy v kostní dřeni.....	59
4.6	Porovnání exprese znaků u jednotlivých skupin onemocnění v periferní krvi	60
5	Diskuse .....	67
6	Závěr.....	72
7	Literatura .....	75
	Seznam obrázků.....	79
	Seznam tabulek .....	80

## Seznam zkratek

AIDS	syndrom získaného selhání imunity (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
ALL	akutní lymfatická leukemie (Acute Lymphoblastic Leukemia)
APC	allophycocyanin
Arg	argon
BAL	bronchoalveolární laváž (Bronchoalveolar Lavage)
BL	Burkittův lymfom (Burkitt Lymphoma)
B-NHL NOS	B buněčný non-hodgkinský lymfom nespecifického fenotypu (B cell Non-Hodgkin Lymphoma Not Otherwise Specified)
B-PLL	B-prolymfocytární leukemie (B-cell Prolymphocytic Leukemia)
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumine)
CD	CD znak (Cluster of Differentiation/ Dedication)
Cd	kadmium
CLL	chronická lymfocytární leukemie (Chronic Lymphocytic Leukemia)
CNS	centrální nervový systém (Central Nervous System)
CT	počítačová tomografie (Computed Tomography)
Cy	cyanin
DLBCL	difuzní velkobuněčný lymfom (Diffuse Large B-Cell Lymphoma)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
EBV	virus Epstein-Barrové (Epstein-Barr Virus)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
EHA	Evropská hematologická společnost (European Hematology Association)
ESLHO	Evropská vědecká nadace pro laboratorní hematologii (European Scientific foundation for Laboratory HematoOncology)
FACS	buněčné třídění průtokovým cytometrem (Fluorescence Activated Cell Sorter)
FCM	průtoková cytometrie (Flow Cytometry)
FITC	fluorescein isothiocyane
FL	folikulární lymfom (Follicular Lymphoma)
FRET	přenos fluorescenční energie (Fluorescence Energy Transfer)
FSC	kanál přímého rozptylu (Forward Scatter Channel)



HCDM	lidské molekuly buněčně diferenciaci (Human Cell Differentiation Molecules)
HCL	leukemie z vlasatých buněk (Hairy Cell Leukemia)
HCV	hepatitida C (Hepatitis C)
He	helium
HHV-8	humanní herpesvirus 8 (Human Herpesvirus 8)
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency Virus)
HLA	lidské antigeny leukocytů (Human Leukocyte Antigen)
HLDA	lidské antigeny leukocytární diferenciaci (Human Leukocyte Differentiation Antigens)
IR	infračervené záření (InfraRed)
ITP	idiopatická trombocytopenická purpura (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura)
KD	kostní dřevina
KHSV	Kaposiho sarkom (Kaposi Sarcoma Herpesvirus)
Kr	krypton
LC	lehké řetězce (Light Chains)
LDH	laktátdehydrogenáza
LPL	lymfoplazmocytární lymfom (Lymphoplasmacytic Lymphoma)
LST	zkumavka lymfoidního screeningu (Lymphoid Screening Tube)
LYG	lymfomatoidní granulomatóza (Lymphomatoid Granulomatosis)
MALT	extranodální lymfom z B-buněk marginální zóny ze slizniční lymfatické tkáně (Mucosa Associated Lymphoid Tissue)
MCL	lymfom z buněk plášťové zóny (Mantle Cell Lymphoma)
MESF	Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrom
MFI	průměrná fluorescenční intenzita (Median Fluorescence Intensity)
MGUS	monoklonální gamapatie nejasného významu (Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance)
MRD	minimální reziduální nemoc (Minimal Residual Disease)
MZL	lymfom z marginální zóny (Marginal Zone Lymphomas)
N/C	nukleocytoplazmatický poměr jádra/ cytoplazmě (Nucleus/ Cytoplasm)
NC	jaderná buňka (Nucleated Cell)

Ne	neon
NEC	non-eytroidní buňka (Non-Eythroid Cell)
NK	přirození zabíječi (Natural Killer Cells)
NMZL	nodální lymfom marginální zóny (Nodal Marginal Zone Lymphoma)
PB	pacific blue
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PE	phycoerytrin
PET	pozitronová emisní tomografie (Positron Emission Tomography)
PK	periferní krev
PMT	fotonásobič (Photomultiplier)
PNH	paroxysmální noční hemoglobinurie (Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria)
PO	pacific orange
REAL	revidovaná evropsko-americká klasifikace lymfomů (Revised European-American Lymphoma)
sABC	vazebná kapacita protilátky (Specific Antibody Binding Capacity)
SLL	lymfom z malých buněk (Small Lymphocytic Lymphoma)
SLVL	splenický lymfom s vilózními lymfocyty (Splenic Lymphoma with Villous Lymphocytes)
SME	malé a střední podniky (Small Medium Enterprise)
SMZL	splenický lymfom z marginální zóny (Splenic Marginal Zone Lymphoma)
SOP	standardní operační postup (Standard Operating Procedures)
SSC	kanál bočního rozptylu (Side Scatter Channel)
THRCL	velkobuněčný B-lymfom bohatý na T-lymfocyty/ histiocyty (T-cell/Histiocyte Rich large B-cell Lymphoma)
TP53	nádorový protein (Tumor Protein)
TRAP	tartarát rezistentní kyselá fosfatáza (Tartrate Resistant Acid Phosphatase)
TVV	trubička pro vstříkávání
UV	ultrafialové záření (UltraViolet)
v-HCL	leukemie z vlasatých buněk-variantní forma (variant-Hairy Cell Leukemia)

WBC leukocyty/ bílé krvinky (White Blood Cells)  
WHO světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

# **1 Úvod a cíl práce**

## 1.1 Úvod práce

Průtoková cytometrie je metoda, která byla v dřívějších dobách zapojena spíše do výzkumných prací. V současné době je využívána nejenom pro výzkumné účely, ale i pro klinickou praxi. V klinické praxi slouží průtoková cytometrie především k imunofenotypizaci hematologických onemocnění (B, T-lymfoproliferativní onemocnění, mnohočetné myelomy, akutní leukemie, myelodysplastické syndromy) a v imunologii k posouzení buněčné imunity. Průtoková cytometrie spolu s ostatními laboratorními metodami přispívá k určení diagnózy zmíněných onemocnění. V současnosti se využívá také po léčbě některých hematologických malignit k monitorování minimální reziduální nemoci. Výhodou metody je poměrně rychlé provedení ve srovnání s ostatními metodami (molekulární genetika, histologie), výsledky mohou být dostupné v den odběru vzorku. Další nespornou výhodou metody je velké množství buněk, které je metodou analyzováno. Analýzu je možné provést z různých druhů biologického materiálu např. z periferní krve, kostní dřeně, uzlin, likvoru nebo z jiných tělních tekutin (ascites, BAL...). Nevýhodou metody je vyšší finanční náročnost a nutnost dlouholetých zkušeností v oboru nejenom pro interpretaci získaných dat, ale i pro správné provedení a nastavení analýzy vzorků.

Rigorózní práce se zabývá stanovením imunofenotypu B-lymfoproliferativních onemocnění. Naměřená data jsou získána v rámci účasti v projektu Euroflow (skupina zabývající se standardizací průtokové cytometrie). Vzorky jsou dle druhu biologického materiálu rozděleny na vzorky periferní krve a kostní dřeně. Tyto skupiny jsou dle charakteristických imunofenotypů rozděleny na jednotlivé typy onemocnění.

Téma práce jsem si zvolila z důvodu zájmu o oblast průtokové cytometrie. Průtoková cytometrie je velice přínosnou metodou k určení typu onemocnění. Zajímá mě spojení průtokové cytometrie s ostatními metodami, jako je např. morfologie buněk. Toto spojení může velice rychle a přesně určit cílovou diagnózu, která je dále potvrzena metodami molekulární genetiky či histologií. Téma je mi blízké i z hlediska každodenní činnosti, jelikož pracuji v hematologické laboratoři a tyto metody tvoří mou hlavní pracovní náplň.

## **1.2 Cíl a popis zadání práce**

Cílem práce je provést souhrn B-lymfoproliferativních onemocnění, sepsat charakteristické imunofenotypy pro jednotlivá onemocnění. Dále potvrdit z naměřených dat programu Euroflow jednotlivé charakteristické znaky pro dané skupiny onemocnění a porovnat expresi povrchových znaků v periferní krvi a v kostní dřeni.

Mimo ověření charakteristických znaků pro jednotlivé skupiny onemocnění je cílem práce najít znaky, které se běžně v diagnostice B-lymfoproliferativních onemocnění nepoužívají a které by mohly dále přispět k určení typu B-lymfoproliferace. V případě objevení takového znaku, je cílem práce zhodnotit, zda by bylo zařazení znaku do panelu určujícího typ B-lymfoproliferace přínosné.

## **2 Teoretická část**

## 2.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (FCM-flow cytometry) je považována za metodu analýzy částic (většinou buněk) v suspenzi (Šinkorová, 2008). Umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu fyzikálních (optických) a chemických (fluorescenčních) vlastností buněk (Marinov, 2008).

### 2.1.1 Historie

První práce věnovaná popisu průtokové cytometrie byla publikována v roce 1934 v časopisu Science (Shapiro, 2003). V 30. letech 19. století byly vyvíjeny nejstarší verze průtokových cytometrů T. Casperssonem a kolegy ve Stockholmu (Shapiro, 2004). Polovina 50. let 19. století se dá považovat za počátek „klasického období dějin průtokové cytometrie“ (Shapiro, 2003). V roce 1956 došlo v průtokové cytometrii k průlomům, americký elektrotechnik WH Coulter vynalezl nový typ analyzátoru, kde krevní buňky v roztoku prochází jedna za druhou malým otvorem a jsou detekovány pomocí změny elektrické vodivosti (impedance). Uvedený typ analyzátoru se dá označit za předka moderních průtokových cytometrů vyvinutých téměř současně v USA a Evropě v letech 1965 až 1970 (Giaretti, 1997). Leonard Herzenberger a kolegové v roce 1972 ve Stanfordu vynalezli průtokový cytometr FACS (fluorescence-activated-cell-sorter) (Shapiro, 2003), který byl v roce 1974 komercializován firmou Becton-Dickinson, firma Coulter zavedla první produkt v této oblasti v roce 1975 (Shapiro, 2004). První aplikací průtokových cytometrů bylo měření jaderné DNA a buněčných povrchových antigenů (Giaretti, 1997). V 70-80 letech bylo klinické využití průtokových cytometrů zaměřeno a omezeno převážně na monitorování počtu CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů u HIV pozitivních pacientů (Marinov, 2008). Starší a nejnovější průtokové cytometry jsou si velmi podobné, rozdíl spočívá ve výkonnějších počítačích, které pomáhají v optimalizaci všech měření, umožňují automatické ukládání dat a mají dokonalejší grafické znázornění. Dřívější cytometry vyžadovaly zásahy kvalifikovaných pracovníků v mnoha krocích měřicího procesu. Vývoj metod a aplikací byl v průtokové cytometrii mnohem rychlejší, než vývoj přístrojového vybavení cytometrů (Giaretti, 1997).



## 2.1.2 Základní komponenty průtokového cytometru

System průtokového cytometru je možné rozdělit na 3 základní komponenty:

1. Fluidní systém
2. Optický systém
3. Elektronický systém

### 1. Fluidní systém

Úlohou fluidního systému je transportovat buňky ve vzorku přes měřicí místo v průtokovém cytometru. Pro získání uspokojivých dat jsou buňky transportovány po téměř identické trajektorii s téměř stejnou rychlostí (Shapiro, 2003). Fluidní systém je složen z centrálního kanálu (jádra), který je obklopen vnějším pláštěm (obalem) obsahující rychlejší tzv. nosnou kapalinu (sheath fluid) (Rahman, 2005), kterou může být PBS nebo komerční tekutiny jako FACSSFlow, IsoFlow, Bioton, Unisol (Internet 1). Po umístění zkumavek do prostoru pro nasátí vzorku, dojde k natlakování přetlakové komory, která dodává zmíněnou nosnou kapalinu. Ve stejný okamžik dochází k natlakování zkumavky se vzorkem, který je vytlačen do TVV (trubička pro vstřikování) a následně do průtokové kyvety (flow chambre) (Becton, Dickinson, 2006). Jelikož jsou buňky náhodně rozptýleny v prostoru (Marinov, 2008), je nutné, aby byl vzorek uspořádán do proudu jednotlivých částic, které jsou vystaveny snímání signálu. Potřebné uspořádání částic je způsobeno laminárním průtokem nosné kapaliny v kyvetě (Rahman, 2005), zajišťující tzv. hydrodynamickou fokusaci (průtok částic v jedné řadě za sebou) (Marinov, 2008). Největší rychlost proudění je ve středu toku, nulová rychlost proudění je po stěnách, což zabraňuje smísení kapalin. Bez hydrodynamické fokusace by docházelo ke špatnému snímání signálu z částic a k ucpávání trysky přístroje (Rahman, 2005).

Charakteristika průtoku/ proudění kapaliny může být odhadnuta užitím Reynoldsova čísla ( $R_e$ ):

$$R_e = \rho v d / \eta$$

d - průměr trubice

v - střední rychlost kapaliny

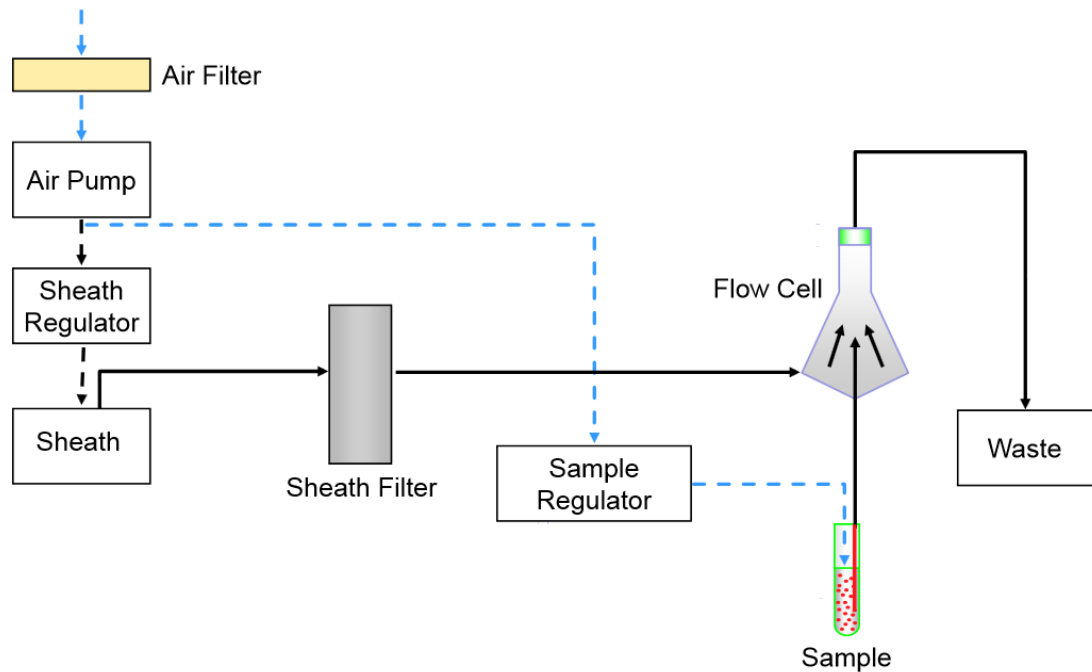
$\rho$  - hustota kapaliny

$\eta$  - viskozita kapaliny

$Re < 2300$  - průtok je vždy laminární,  $Re > 2300$  - průtok může být turbulentní (urychluje šíření) (Rahman, 2005).

Obrázek č. 1: Znárodnění fluidního systému v průtokovém cytometru

## Fluidics



Zdroj: Internet 2

## 2. Optický systém

Optický systém je možné dělit na část excitační a sběrnou. Excitační část je tvořena zdrojem světla, soustavou čoček (zaostřovací čočka) a hranolů usměrňující světelný paprsek. Pro zaměření laserového paprsku na hlavní proud v průtokové kyvetě jsou využívány tzv. zkřížené cylindrické čočky (Shapiro, 2003). Sběrná část je tvořena systémem čoček (sběrná čočka), zrcadel a optických filtrů zachycujících fluorescenční a rozptýlené záření, umožňující detekci světelných kvant o specifické vlnové délce pomocí detektorů (fotonásobičů a fotodiód) (Marinov, 2008). Detektory je možné označit jako rozhraní mezi dvěma systémy průtokového cytometru (optickým a elektronickým) (Šinkorová, 2008).

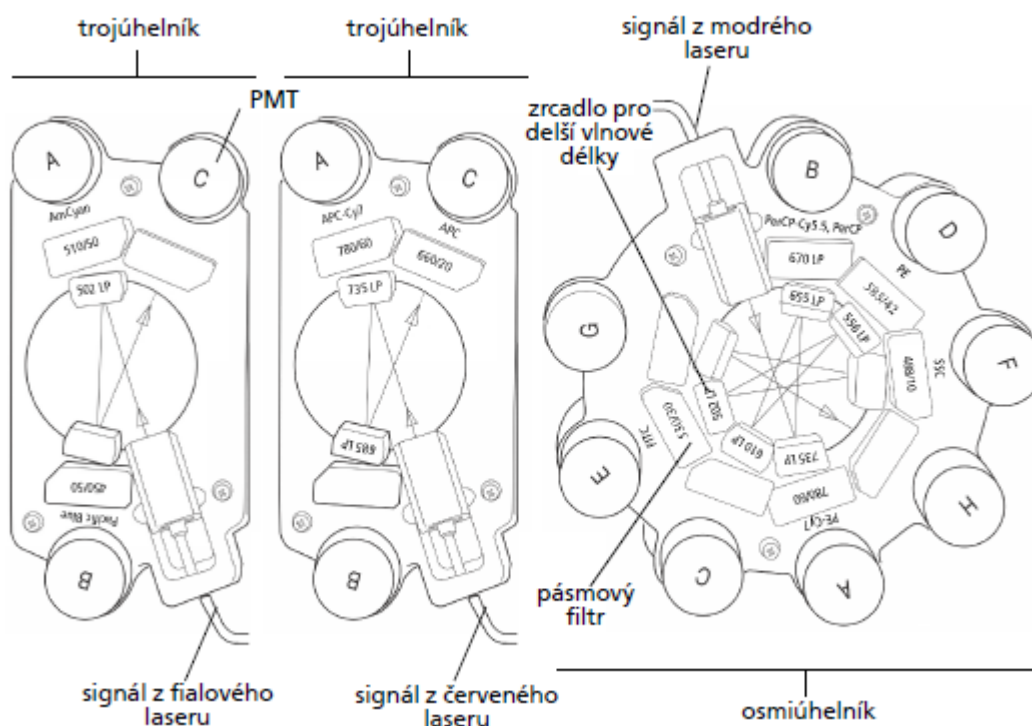
## **Zdroje světla**

Mezi možné zdroje světla v průtokovém cytometru patří lasery, obloukové lampy (xenonové, křemenné-halogenové) (Shapiro, 2003). Zdrojem světla jednoho z prvních cytometrů určeného k měření obsahu DNA byla rtuťová oblouková lampa, drtivá většina dnešních cytometrů využívá laserové světlo (Giaretti, 1997). Existují různé druhy laserů v médiích: plynném (He-Ne), iontovém (Arg-Kr), kovových par (He-Cd). Dalšími druhy jsou pulzní barevné lasery, ve kterých je médiem roztok fluorescenční barvy, pulzní polovodičové lasery, kde médium tvoří tyč z yttria nebo diodové lasery (Shapiro, 2003). Lasery vyzařují jednu vlnovou délku světla (dráha laseru) v jedné nebo více diskrétních frekvencích (tzv. koherentní světlo) (Rahman, 2005). Nejčastěji používané lasery současných cytometrů jsou modrý laser (argonový, vlnová délka 488 nm) a červený laser (helium-neonový, vlnová délka 635 nm) (Shapiro, 2003), u vyšších tříd průtokových cytometrů se využívá laser fialový. Užití fialového (vlnová délka 395-415 nm) diodového laseru v cytometrii bylo poprvé popsáno v roce 2000 (Shapiro, 2004).

## **Detektory**

Jako běžné detektory se používají křemíkové fotodiody (měření FSC), fotonky s násobičem (fotonásobiče-PMT) jsou využívány k měření SSC a signálů fluorescence, jsou citlivější a pro měření zmíněných parametrů ideálnější (Shapiro, 2003). Laserem excitované a rozptýlené světlo je z průtokové kyvety nasměřováno do detektorových polí, která se skládají z fotonásobičů uspořádaných do osmiúhelníku nebo trojúhelníku v různých variantách (závisí na počtu laserů v průtokovém cytometru). Osmiúhelník obsahuje pět - šest PMT detekujících světlo excitované a rozptýlené o vlnové délce 488 nm, jeden PMT v osmiúhelníku snímá signály z bočního rozptylu (SSC). Trojúhelník obsahuje dva - tři PMT a detekuje světlo excitované o vlnové délce 633 nm, další trojúhelník může detekovat světlo excitované o vlnové délce 405 nm (schéma detektorů pro cytometr se 3 lasery viz Obrázek č. 2) (Becton, Dickinson, 2006). Signály fluorescence spektrálně rozdělí dichroická zrcadla a optické filtry (Marinov, 2008), které blokují určité vlnové délky, zatímco prochází ostatní. Existují tři hlavní typů filtrů: „long pass“ filtry povolí projít světlo nad cut-off vlnové délky, „short pass“ filtr povolí projít světlo pod cut-off vlnové délky a „band-pass“ přenášející světlo v určeném úzkém rozmezí vlnových délek, všechny filtry blokují světlo absorpcí (Rahman, 2005).

Obrázek č. 2: Detektorové pole průtokového cytometru obsahujícího 3 lasery



Zdroj: Becton, Dickinson, 2006

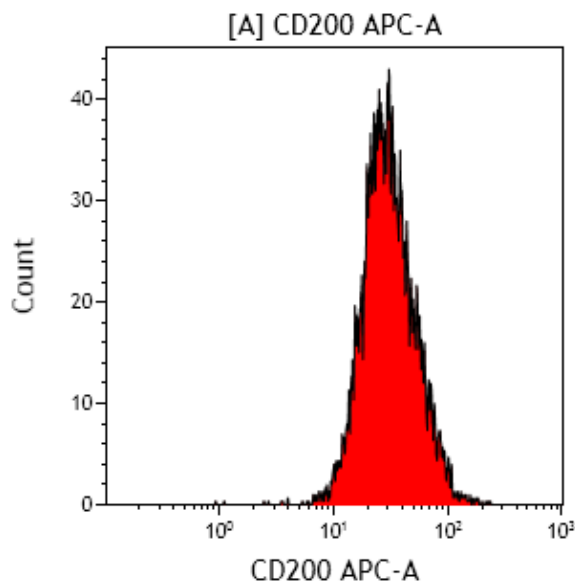
### 3. Počítačový / elektronický systém

Z technického hlediska se dá elektronický systém považovat za nejsložitější systém průtokového cytometru (Šinkorová, 2008). Dochází k lineární nebo logaritmické amplifikaci optických signálů (fluorescence a rozptyl) snímaných detektory na signály elektronické (Marinov, 2008) (dostatečně velké 5-10 V). Signály jsou následně digitalizovány a graficky zpracovány (Rahman, 2005). Všechna získaná data z měření jsou shromážděna a uchována jako datový soubor tzv. "list mode file", který je připravený k následné analýze (Internet 1).

Zobrazení dat může být provedeno mnoha způsoby, nejjednodušším zobrazením je jednoparametrový histogram (viz Obrázek č. 3) používající se k získání intenzity signálu fluorescence dané subpopulace nebo k procentuální kvantifikaci antigenní exprese. Dalším způsobem zobrazení jsou dvouparametrové grafy o různých formátech (vrstevnicové, bodové, hustotní) (Pecka et al., 2010) používající se pro zjištění vzájemného vztahu dvou parametrů, nejpoužívanější je bodový graf tzv. "dot plot" (viz Obrázek č. 4), kde je každá buňka zobrazena jako jedna tečka (překrývání více buněk se v grafu neprojeví). Poslední možností je použití trojrozměrných grafů, které se

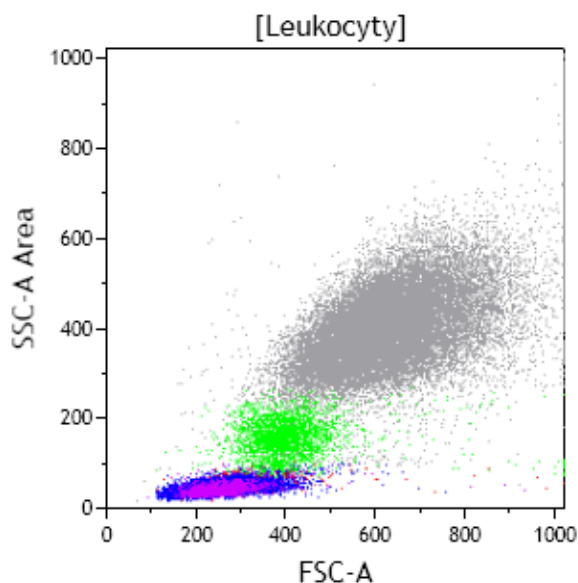
v běžné praxi většinou nevyužívají. Pro vztah tří nebo více parametrů je využívána tzv. gatovací strategie, kdy se vybere část buněk podle jednoho až dvou parametrů (vytvoří se gate „brána“) a z gatu se vytvoří další graf, ukazující zbývající parametry. Pro všechny buňky nebo pro libovolnou subpopulaci můžeme zjistit základní statistická data (četnost, průměrnou intenzitu fluorescence, její medián, modus, standardní odchylku, geometrický průměr apod. (Bartůňková et al., 2005). V současné době existuje několik programů přispívajících k jednodušší a rychlejší analýze dat získaných z průtokových cytometrů (multiparametrická analýza dat), jedná se např. o programy Infinicyt™ (Cytognos) nebo Kaluza (Beckman Coulter).

Obrázek č. 3: Jednparametrový histogram



Zdroj: Vlastní zpracování autorky dle software Kaluza

Obrázek č. 4: Dvouparametrový „dot plot“



Zdroj: Vlastní zpracování autorky dle software Kaluza

### 2.1.3 Měřené parametry

1.) FSC (forward scatter channel, přímý rozptyl) – světlo je rozptýleno v úhlu do 20° (Rahman, 2005), je zachyceno diodou dopředního rozptylu (Marinov, 2008). Parametr vypovídá o velikosti buněk, umožňuje rozlišit buněčnou špínu (debris) a viabilní buňky (Rahman, 2005). Vyšší hodnoty FSC korelují s agresivitou a proliferační aktivitou choroby (Marinov, 2008).

2.) SSC (side scatter channel, boční rozptyl) – světlo je rozptýleno přibližně v úhlu 90° k excitační linii (Rahman, 2005), je zachyceno fotonásobičem (Penka et al., 2011). Parametr odráží vnitřní komplexitu (granularitu) buněk (Šinkorová, 2008).

3.) Fluorescence - měření fluorescence při různých vlnových délkách, poskytuje kvantitativní a kvalitativní údaje o fluorochromech (koncentraci fluorochromu) navázaných na receptorech v buňce nebo na jejich buněčném povrchu. K detekci emitovaného světla je užíván samostatný fluorescenční kanál (Rahman, 2005), fluorescenční světlo je emitováno ve všech směrech, signály jsou obecně poměrně slabé a vyžadují citlivé optické detektory (fotonásobiče) (Haynes, 1988). Fluorescence je zachycena pro každý fluorochrom zvlášť v 90° úhlu od osy laserového paprsku (Marinov, 2008). Díky současnému použití různých monoklonálních protilátek s různými fluorochromy můžeme vyšetřit současně přítomnost několika antigenů

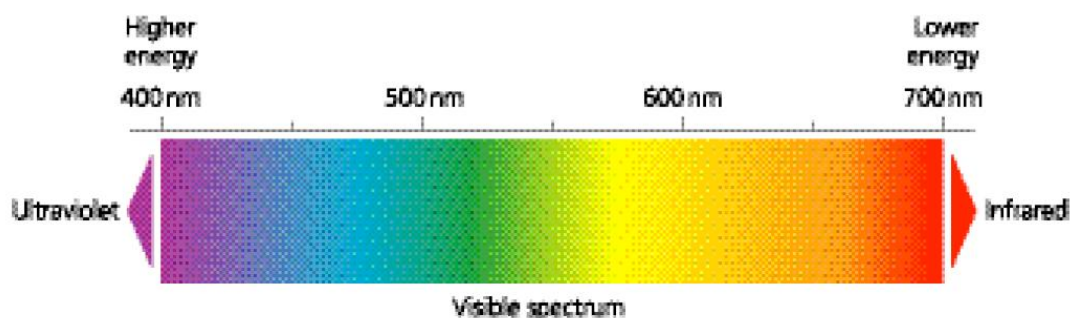
v každé buňce (Bartůňková et al., 2005). Intenzita fluorescence je závislá na použitém fluorochromu, vazebné kapacitě konjugátu fluorochrom-monoklonální protilátka a na množství epitopů na buňce. Fluorescenci je možné hodnotit kvalitativně na základě průměrné fluorescenční intenzity (MFI), která může být slabá (+), přiměřená (++), silná (+++) nebo kvantitativně v arbitrárních jednotkách sABC (specific antibody binding capacity) nebo MESF (molecules of equivalent soluble fluorochrom) (Marinov, 2008).

Měřené parametry poskytují jedinečné informace o každé buňce, kombinace parametrů je používána k rozlišení různých typů buněk v heterogenním vzorku (Marinov, 2008). Signály rozptylu jsou na rozdíl od signálů fluorescence silné a snadno detekovatelné (Haynes, 1988).

#### **2.1.4 Fluorochromy, fluorescence, spektrum**

Monoklonální protilátky se kovalentně váží (konjugují) s různými fluorescenčními molekulami (fluorochromy) (Šinkorová, 2008), barviva, která jsou schopná absorbovat světelnou energii z excitačního zdroje (např. laser) a následně ji vyzařovat v jiné (delší) vlnové délce. Procesy jsou označovány jako excitace a emise (Marinov, 2008). Proces emise následuje velmi rychle, obvykle v pořadí nanosekund a je znám jako fluorescence. Světlo je forma elektrické energie, cestující ve formě vln, vlny mají frekvenci a délku, délka určuje barvu světla. Světlo, které je zachyceno lidským zrakem představuje úzké pásmo vlnové délky (380-700 nm) mezi ultrafialovým (UV) a infračerveným (IR) zářením. Viditelné spektrum (viz Obrázek č. 5) je rozděleno dle barev na červené, oranžové, žluté, zelené modré a fialové. Červené světlo má delší vlnovou délku (nižší energii) a fialové světlo má kratší vlnovou délku (vyšší energii) (Rahman, 2005).

Obrázek č. 5: Elektromagnetické spektrum světla



Zdroj: Rahman, 2005

### Stokesův posun

Elektrony fluorochromů absorbující světlo přechází z klidového stavu na maximální energetickou hladinu zvanou „excitovaný elektronický singletový stav“, trvající pouze 1-10 nanosekund. Fluorochrom prochází vnitřní konformační změnou, dochází k uvolnění části absorbované energie ve formě tepla. U elektronů dojde k poklesu na energeticky stabilnější hladinu tzv. „uvolněný elektronický singletový stav“. Elektrony, které se trvale vrátí do svého základního stavu, uvolňují zbývající energii ( $E_{emise}$ ) jako fluorescenci, obsahující méně energie než bylo původně fluorochromem absorbováno (odlišná barva světla energie excitační). Vlnová délka emise každého fluorochromu bude vždy delší, než excitační vlnová délka. Rozdíl mezi energií excitační a energií emisní se nazývá Stokesův posun - hodnota vlnové délky určuje vhodnost fluorochromu pro fluorescenční studie. Je nutné, aby světlo produkované emisí mohlo být odlišeno od světla použitého pro excitaci. Rozdíl se nejsnadněji zjistí, když mají fluorescenční molekuly velký Stokesův posun. Barva fluorescence se obvykle vztahuje k barvě světla emitovaného fluorochromem jako jeho nejvyšší stabilní excitovaný stav (Rahman, 2005).

Fluorochromy mohou být samostatné nebo tandemové, kde excitace primárního fluorochromu aktivuje excitaci sekundárního fluorochromu, proces je známý jako přenos fluorescenční energie – FRET (fluorescence energy transfer) (Marinov, 2008). Když je první barvivo excitováno a dosahuje maximálního singletového stavu, přenáší všechnu svoji energii do druhého barviva (molekula akceptoru) nacházející se v těsné














blízkosti, aktivuje se druhý fluorochrom produkující fluorescenční emisi, způsob jakým lze dosáhnout vyššího Stokesova posunu (Rahman, 2005).

Komerčně dostupných fluorochromů je celá řada např. FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythrin), APC (allophycocyanin) (Šinkorová, 2008), fluorochromy řady Alexa, představující velkou konkurenci pro fluorochromy, které byly v posledních 30 let využívány nejvíce (např. FITC), nabízí větší foto-stabilitu a zvýšenou fluorescenci (Rahman, 2005). Zářivější fluorochromy (PE, PE-Texas Red, PE-Cy5, PE-Cy5.5, PE-Cy7, APC, APC-Alexa 700, APC-Cy7) jsou používány k detekci antigenů se slabší expresí, např. CD56, CD13, CD117 nebo CD19 (Marinov, 2008).

Ke každému prakticky používanému laseru existuje celá skupina fluorochromů s dostatečně silnou absorpcí v dané oblasti spektra a rozdílnou emisní charakteristikou, fluorescence je odlišitelná pomocí zmiňované soustavy optických filtrů uzpůsobených k odrazu nebo prostupu fotonů s definovanou vlnovou délkou (Šinkorová, 2008).









Obrázek č. 6: Přehled samostatných fluorochromů

#### Single dyes

Dye	Laser excitation line (nm)	Maximal absorbance (nm)	Maximal emission (nm)	Fluorescence colour
Alexa Fluor 405	405, 407	401	421	
Alexa Fluor 430	405, 407	433	541	
Alexa Fluor 488	488	495	519	
Alexa Fluor 633	633, 635, 647	632	647	
Alexa Fluor 647	633, 635, 647	650	665	
Alexa Fluor 660	633, 635, 647	663	690	
Alexa Fluor 680	633, 635, 647	679	702	
APC	633, 635, 647	650	661	
FITC	488	490	525	
PerCP	488	490	675	
Phycoerythrin	488	490, 565	578	

Zdroj: Rahman, 2005

Obrázek č. 7: Přehled tandemových fluorochromů

Tandem dyes				
Dye	Laser excitation line (nm)	Maximal absorbance (nm)	Maximal emission (nm)	Fluorescence colour
APC-Alexa Fluor 750	633, 635, 647	650	779	Infra Red
APC-Cy5.5	633, 635, 647	650	695	
APC-Cy7	633, 635, 647	650	785	Infra Red
PerCP-Cy5.5	488	496, 546	695	
PE-Alexa Fluor 610	488	496, 546	627	
PE-Alexa Fluor 647	488	496, 546	667	
PE-Alexa Fluor 680	488	496, 546	702	
PE-Alexa Fluor 700	488	496, 546	723	Infra Red
PE-Alexa Fluor 750	488	496, 546	779	Infra Red
PE-Cy5.5	488	496, 546	695	
PE-Cy5	488	496, 546	667	
PE-Cy7	488	496, 546	785	Infra Red
PE-Texas Red	488	496, 546	615	

Zdroj: Rahman, 2005

### 2.1.5 Využití průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie nachází uplatnění v mnoha oborech, využívá se nejenom ve výzkumných, ale i v klinických laboratořích. Nejčastěji je průtoková cytometrie využívána v imunologii a hematologii. V imunologii se využívá např. ke stanovení zastoupení lymfocytárních subpopulací (monitorování pacientů s imunodeficity, s AIDS), k ověření exprese řady molekul (deficit adherence leukocytů), k detekci vázaných protilátek (ITP), k zjištění HLA haplotypu, k detekci koncentrace intracelulárních cytokinů, k řadě funkčních testů (oxidační vzplanutí, stanovení cytotoxické aktivity, mikrobicidie, fagocytóza) a k měření koncentrace vápenatých iontů uvnitř buňky (Bartůňková et al., 2005).

V hematologii je průtoková cytometrie nejvíce využívána k diagnostice hematologických malignit. Určení imunofenotypu (určení povrchových a cytoplazmatických antigenů) maligních buněk je zásadní např. pro diagnostiku lymfoproliferativních onemocnění, ale významné je uplatnění i u mnohočetného myelomu, akutních leukémií a v poslední době i myelodysplastického syndromu či myeloproliferací. S vyšší účinností léčby se také více uplatňuje monitorování

tzv. minimální reziduální nemoci (MRD). Neonkologickou aplikací průtokové cytometrie v hematologii je diagnostika PNH (paroxysmální noční hemoglobinurie), hereditární sférocytózy, detekce defektů v expresi povrchových markerů trombocytů, analýza protilátek proti trombocytům (potransfuzní reakce, ITP), detekce fetálního hemoglobinu v krvi matky či stanovení zastoupení hematopoetických progenitorů (CD34+ buněk).

K aplikacím průtokové cytometrie patří také stanovení obsahu jaderné DNA u nádorového bujení (benigní a maligní lidská neoplazmata často obsahují subklony s abnormálním obsahem DNA), u nádorového bujení se hodnotí proliferace, kinetika buněčného cyklu a stanovují se apoptotické buňky (Giaretti, 1997). Určení ploidie, studium genové exprese, detekce a charakterizace mikroorganismů jsou další možnosti využití průtokové cytometrie (Pecka et. al., 2010).

### **Třídíče (sortery)**

Za speciální aplikaci průtokové cytometrie je možné označit buněčné třídění (cell sorting) (Internet 1). Jedná se o schopnost třídít (sortovat) buňky na základě předem známých parametrů. Proud tekutiny s buněčnou suspenzí je rozdělen do kapiček, které jsou rozděleny (tříděny) do zkumavek k dalšímu použití nebo přímo do odpadu (Bartůňková et al., 2005). Dochází k využití dat získaných při průchodu buněk laserovými paprsky, získávají se buňky s vybranými vlastnostmi. Tímto způsobem lze získat velice čisté suspenze požadovaného typu buněk (Pecka et al., 2010). Mechanické třídící systémy jsou plně izolované, čímž se eliminuje riziko tvorby aerosolu. Do dneška byly vyvinuty dva systémy, původní systém FACS-Calibur, (Becton Dickinson, NJ) pracuje se zachytávací trubičkou/ zkumavkou v horní části průtokové kyvety. V případě, že je buňka rozpoznána jako cíl třídění, mechanická jednotka ji přesune do proudu, zachytí buňku a směřuje ji do samostatné zkumavky. Pokud je přístroj nastaven správně, řadí cílové buňky s vysokou čistotou. Nicméně, rychlost třídění je nízká a během cyklu může být sbírána pouze jedna populace buněk, což lze považovat za nevýhodu k sběru vzácných buněk. Moderní mechanické třídící systémy pracují s kyvetou tvaru Y (odpad a sortovací rameno), kde dvě třetiny proudu prochází odpadovým ramenem a jedna třetina prochází sortovacím ramenem. Rychlost sortování je v řádu 1000 buněk za sekundu, jednu populaci lze během cyklu třídít s vysokou

čistotou. Roztříděné buňky jsou v dobrém stavu a jsou obvykle životaschopné, nicméně, nízká rychlost třídění a velký objem sběru omezuje její použití pro sběr vzácných buněk. Všechny průtokové cytometry na bázi sortovacích systémů vyžadují vynikající vyrovnání obou jednotek (detekční a třídící) (Greve et al., 2012).

### **2.1.6 CD znaky**

HCDM Council (human cell differentiation molecules) je organizace pořádající HLDA (human leukocyte differentiation antigens) semináře, kde pojmenovává a charakterizuje CD molekuly. Hlavním cílem organizace je charakterizovat strukturu, funkci a distribuci povrchových molekul leukocytů a ostatních molekul imunitního systému (Internet 3).

Skupina imunologů klasifikovala nejprve povrchové leukocytární antigeny na základě multilaboratorní statistické analýzy. Výsledky byly zveřejněny na první pracovní konferenci HLDA v Paříži v roce 1982. Bylo zde klasifikováno pouhých 15 antigenů a byla založena tzv. Cluster of differentiation /dedication (CD) nomenklatura, která se stala celosvětově uznávanou (Marinov, 2008). CD nomenklatura tvoří skupinu protilátek, které rozpoznávají specifický epitop daného antigenu, byla a je na mezinárodních pracovních konferencích HCDM neustále doplňována a aktualizována (Pecka et al., 2010).

V roce 2004 byly radou HLDA upraveny cíle organizace, spolu se změnou jména na HCDM. Cílem workshopu v květnu roku 2006 bylo definovat CD znaky usilovněji, než to učinil předchozí workshop HLDA. Cíle HCDM jsou následující: 1.) objasnit a přinést aktuální CD označení 2.) zaplnit některé z čísel CD, které byly dříve vyhrazeny pro členy molekulové rodiny, jako jsou chemokinové receptory 3.) přidělit CD čísla novým protilátkám a novým molekulám, kde byly předloženy odpovídající údaje 4.) iniciovat multi-laboratorní studie důležitých odlišných markerů, bez ohledu na jejich buněčné umístění. HCDM rada již dříve rozhodla, že intracelulární molekuly, které jsou používány jako markery diferenciací by měly být workshopy také studovány, ale pouze povrchovým membránovým molekulám bude přidělen CD znak (Zola et al., 2007). 9. mezinárodní konference zaměřená na lidské leukocytární diferenciací antigeny (HLDA9) se konala v Barceloně v březnu 2010. Konference se zúčastnilo více než 200 vědců a kliniků z 18 různých zemí. Výsledkem konference bylo rozšíření CD

znaků na počet 364 (Internet 4). Přehled CD znaků lze najít na stránkách [www.hcdm.org](http://www.hcdm.org). Poslední 10. workshop HLDA proběhl ve spojení s Australskou společností pro imunologii ve Wollongongu, Austrálie v prosinci 2014, workshop navazoval na tradici workshopů-charakterizace protilátek vázající se na povrchové molekuly leukocytů se zvláštním důrazem na ty, které identifikují lidské dendritické buňky, došlo k rozšíření CD znaků na 371 (Internet 5).

### **2.1.7 EuroFlow**

Konsorcium EuroFlow je složeno z 20 diagnostických výzkumných skupin a z jedné firmy zařazené do segmentu malých a středních podniků (SME), skupiny jsou považovány za odborníky v oblasti průtokové cytometrie a molekulární diagnostiky. Hlavním cílem EuroFlow je rozvoj a standardizace rychlých, přesných a vysoce citlivých testů průtokové cytometrie pro diagnostiku a prognostickou (sub)klasifikaci hematologických malignit, jakož i pro hodnocení účinnosti léčby během sledování. EuroFlow je divize ESLHO (European Scientific foundation for Laboratory HematoOncology, Evropská vědecká nadace pro laboratorní hematoonkologii), ESLHO je oficiální vědecká pracovní skupina EHA (European Hematology Association) (Internet 6).

## 2.2 Malignity ze zralých B-buněk

Lymfoproliferativní onemocnění jsou klonální nádorová onemocnění, která vychází z různých stádií vývoje lymfocytů B či T buněčné linie, případně z NK buněk. Nádorová populace může u zralých lymfoidních neoplázií (častěji u B buněčných) napodobovat morfologicky, ale i imunofenotypem určitá stadia normálního vývoje lymfocytů (Penka et al., 2011).

Lymfoproliferativní stavy postihují lymfatické tkáně (uzliny, lymfatickou tkáň střev, játra, slezinu, kostní dřeň), případně mohou vznikat i v extralymfatických orgánech (lymfomy). Pokud jsou nádorové buňky od počátku onemocnění přítomny v periferní krvi, stav může být označen jako leukémie. V případě postižení PK, jako výsledku progredující choroby lze označit stav za leukemizovaný lymfom (Penka et al., 2011).

K určení typu lymfoproliferativního onemocnění je nezbytná komplexní diagnostika zahrnující histologické vyšetření, cytologii, imunofenotypizaci, cytogenetiku, případně molekulární genetiku. Stanovení diagnózy se opírá o korelaci všech vyšetření (Kačírková et al., 2007). Základní diagnostika lymfomů se obvykle provádí z reprezentativní tkáně (dostatečné množství). Pro správné stanovení diagnózy je důležitá exstirpace zasažené uzliny (Adam et al., 2008), výsledky vyšetření kostní dřeně se mohou odlišovat od nálezu v primárním ložisku. U každého prokázaného lymfoproliferativního onemocnění dochází k tzv. stážování (staging) – určení rozsahu nemoci (Penka et al., 2011). Mimo standardní laboratorní vyšetření (např. zvýšení LDH koreluje s rychlou proliferací a nepříznivou prognózou) se využívají i zobrazovací metody (CT nebo PET/CT), vyšetření mozkomíšního moku (u vysoce agresivních nádorů) a v neposlední řadě klinické vyšetření (Adam et al., 2008).

V roce 1993 byla vytvořena skupinou evropských a amerických patologů (International Lymphoma Study Group) nová klasifikace, která se nazývá A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms označována jako REAL. Klasifikace REAL vychází stejně jako Kielská klasifikace z cytologické analogie patologické tkáně. Na rozdíl od Kielské klasifikace a všech předchozích klasifikací

přidala další kritéria, mimo morfologických také imunologická, topografická, cytogenetická a kritérium klinické manifestace a průběhu. Světová zdravotnická organizace (WHO) vytvořila platnou klasifikaci krevních chorob, která v knižní podobě vyšla poprvé v roce 2001 (Adam et al., 2008).

Výskyt non-hodgkinských lymfomů je častější v asociaci s chronickým zánětlivým onemocněním (Sjögrenův syndrom, celiakie, revmatoidní artritida), u nemocných s infekčním onemocněním, u virových infekcí HIV (maligní lymfom), EBV (endemický Burkittův lymfom), HCV (velkobuněčný nebo splenický lymfom), bakteriální infekce *Helicobacter pylori* (MALT lymfom žaludku) (Adam et al., 2008), *Borrelia burgdoferi*, *Chlamydia psittaci* (pneumonie, trachomatis), případně *Campylobacter jejuni*. Z vlivů prostředí je dávana u těchto nádorů vina zejména expozicím herbicidů a pesticidů (Penka et al., 2011). Imunosupresivní léčba také výrazně zvyšuje riziko vzniku lymfomu (pacienti po transplantaci), incidence maligních non-hodgkinským lymfomů se zvyšuje s věkem a existuje i dědičná zátěž (Adam et al., 2008).

Klinické příznaky u pacientů s lymfoproliferativním onemocněním: lymfadenopatie, splenomegalie, hepatomegalie - infiltrace orgánu lymfomem, systémové B-symptomy – teploty či horečky neinfekčního původu, hmotnostní úbytek, noční pocení. Produkce monoklonálních imunoglobulinů (incidence tohoto jevu nepřesahuje 5-10 %, s výjimkou lymfoplazmocytárního lymfomu), osteolytická destrukce skeletu (Adam et al., 2008). Infekční komplikace jsou nejčastěji způsobeny chyběním normálních imunokompetentních buněk při převládnutí nádorové populace (Penka et al., 2011). Klinická stádia dle Ann Arbor klasifikace jsou 4 (Adam et al., 2008).

Léčba lymfomů – u indolentních typů se mnohdy zprvu volí strategie pozorování (Penka et al., 2011), chirurgie je používána pouze v případě lokalizovaných MALT lymfomů žaludku nebo primárního splenického lymfomu, radioterapie hraje důležitou roli v lokalizovaném stadiu lymfomu. Nejpoužívanějším typem léčby je chemoterapie (Adam et al., 2008), většinou v kombinaci s monoklonálními protilátkami (např. anti-CD20), někdy doplněná radioterapií, event. autologní transplantací hemopoetických buněk (Penka et al., 2011).

Tabulka č. 1: Dělení lymfomů - zralé B buněčné neoplazie

Chronická lymfocytární leukemie / lymfom z malých lymfocytů (CLL/SLL)
B-prolymfocytární leukemie (B-PLL)
Burkittův lymfom / leukemie (BL)
Difuzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL)
Extranodální lymfom z B-buněk marginální zóny ze slizniční lymfatické tkáně (MALT lymfom)
Folikulární lymfom (FL)
Imunoproliferace z B-řady s nejistým maligním významem
Intravaskulární velkobuněčný B-lymfom
Leukemie z vlasatých buněk (HCL)
Lymfom z plášt'ových buněk (MCL)
Lymfomatoidní granulomatóza (LYG)
Lymfoplazmocytární lymfom (LPL) / Waldenströмова makroglobulie
Malignity z plazmatických buněk (mnohočetný myelom / plazmocytom)
Mediastinální (tymický) velkobuněčný B-lymfom
Nodální lymfom z B-buněk marginální zóny (NMZL)
Primární exsudativní lymfom
Splenický lymfom z B-buněk marginální zóny (SMZL)

Zdroj: Vlastní zpracování autorky dle Penka et al., 2011; Kačírková et al., 2007; Adam et al., 2008

### **2.2.1 Chronická lymfocytární leukemie / lymfom z malých lymfocytů (CLL/SLL)**

Nízce agresivní (Adam et al., 2008) klonální proliferace malých, zralých B lymfocytů primárně v PK, KD, lymfatických uzlinách (Penka et al., 2011) (termín SLL je užíván pro „aleukemickou“ formu CLL primárně uzlinovou (Kačírková et al., 2007)), v játrech, slezině či jiných orgánech (Penka et al., 2011). Příčinou nemoci může být nejen nekontrolovatelná klonální proliferace, ale i porucha apoptózy (zřejmě podíl zvýšené exprese genu BCL2) (Adam et al., 2008). Předpokládána je i genetická predispozice (Penka et al., 2011). Jedná se o nejčastější leukémii dospělých v Evropě a Severní Americe, kde tvoří 25-30 % všech leukémií, medián věku stanovení diagnózy



je 65 let (Adam et al., 2008). V PK je přítomna lymfocytóza  $> 5 \times 10^9/l$ , která může přesahovat hodnoty  $500 \times 10^9/l$  (Penka et al., 2011), lymfocytóza je relativní i absolutní (Kačírková et al., 2007).

Z cytologického pohledu rozlišujeme formu **typickou** -nádorová populace je představována uniformními lymfocyty se zralými rysy (Penka et al., 2011) – malé (maximálně dvojnásobek velikosti erytrocytu) s kulatým či mírně oválným tvarem, jádro je většinou excentricky uložené s hutným, kondenzovaným chromatinem, nukleoly nejsou patrné, cytoplazma tvoří úzký lem a bývá velmi světlá, většinou agranulární, jen vzácně může obsahovat vakuoly. Buňky CLL jsou velmi fragilní, v nátěru jsou přítomny četné jaderné stíny a rozpadající se buňky – struktury v rámci CLL nazýváme Gumprechtovy stíny. Populace leukemických lymfocytů bývá u jednotlivých pacientů morfologicky homogenní, monotónní. Podíl prolymfocytů ze všech lymfoidních buněk PK je u této formy maximálně 10 % (Kačírková et al., 2007). Druhou formou je forma **atypická**-smíšeně buněčná, existují dvě varianty: **dimorfní** varianta – dochází k navýšení počtu prolymfocytů nad 10 %, nicméně jich je méně než 55 %. Prolymfocyty jsou větší buňky mající kondenzovaný chromatin a nápadné jádérko, objemnější cytoplazmu, která je slabě či středně bazofilní, bez granulace (Penka et al., 2011). U **pleomorfní** varianty je nápadná polymorfní populace nádorových buněk – různě velké lymfocyty s různě objemnou cytoplazmou, bez typické mozaikovitě kondenzace chromatinu s nepravidelnostmi tvaru jádra, prolymfocytů je méně než u varianty dimorfní. Aspirát KD bývá u CLL hypercelulární s infiltrací malými lymfocyty identickými jako v PK. Jejich zastoupení je zpravidla více než 30 % NC (nebo více než 50 % NEC v případě hyperplazie erytropoezy). V počátečních stádiích onemocnění je většinou normální trilineární hematopoéza zachována (Kačírková et al., 2007).

Pro CLL je typická lymfadenopatie, splenomegalie, hepatomegalie je méně častá, cytopenie způsobená insuficiencí KD se vyvíjí s progresí choroby, relativně častý je i výskyt autoimunitní hemolytické anemie, nemocní s pokročilou chorobou mají nízkou frakci gamaglobulinů a nízkou koncentraci jednotlivých imunoglobulinů, plazmatická hladina imunoglobulinů odráží vývoj nemoci, poruchy imunity (infekční komplikace) (Adam et al., 2008). Imunofenotyp je specifický, buňky jsou CD19+, CD5+, CD23+,

CD43+ (Kačírková et al., 2007), CD24+, CD37+, CD40+, CD45RA+ (Adam et al., 2008), variabilní exprese CD11c+, CD25+, CD79a+, CD22-/+(slabě), CD21+(slabě), slabá exprese CD20 a povrchových lehkých řetězců kappa nebo lambda, stejně tak i těžké řetězce (IgM nebo IgD) jsou exprimovány slabě, aberantně CD2+, CD8+, CD79b-, FMC7- (nebo oba znaky slabě +), CD10-, CD103-, TdT- (Kačírková et al., 2007), CD138-, CD35- (Adam et al., 2008). U morfologicky atypických forem je silná exprese CD20, CD22, lehkých a těžkých řetězců Ig, případně jsou buňky CD79b+, FMC7+ (Kačírková et al., 2007) nebo se objevuje atypický fenotyp CD5-, CD23-, CD11c+, sIg silně+ (Swerdlow et al., 2008). Pozitivita znaků CD38 a ZAP-70 svědčí o agresivnějším průběhu nemoci (Adam et al., 2008) (v současnosti se od znaku ZAP-70 upouští). Taktéž cytogenetický, respektive molekulárně genetický nález je prognosticky důležitý. Chromozomální abnormality: del(13)(q14), trizomie 12, del(17)(p13), del(6)(q21), del(11)(q23), poslední tři abnormality jsou prognosticky nepříznivé (Kačírková et al., 2007). U 2-8 % nemocných může dojít k transformaci do agresivnější formy onemocnění (prolymfocytární leukemie, difúzní velkobuněčný lymfom (DLBCL), raritně je popsán přechod do prekurzorové B-lymfoblastické leukemie, možný je přechod do Hodgkinova lymfomu) (Penka et al., 2011).

Skórovací systém Matutes z roku 1994 a jeho pozdější modifikace podle Moreau z roku 1997 napomáhá diferenciální diagnostice s ostatními imunoproliferativními onemocněními z B-řady (Marinov, 2008).

Tabulka č. 2: Skórovací systém pro CLL/SLL

Marker	CLL/SLL	Skóre *
smIg	slabá	1
CD5	pozitivní	1
CD23	pozitivní	1
FMC7	negativní	1
CD79b	slabě pozitivní/ negativní	1

\*typická CLL/SLL má skóre 4 (31%) nebo 5 (61%). Skóre 0-2 vylučuje CLL/SLL (0%). Skóre 3 znamená CLL/SLL v 7 % případů (Marinov, 2008).

### **2.2.2 B prolymfocytární leukemie (B-PLL)**

Extrémně vzácné onemocnění (Adam et al., 2008). Jedná se o maligní proliferaci středně velkých B-prolymfocytů (Marinov, 2008), onemocnění postihuje PK, KD, slezinu (Kačírková et al., 2007). Převážně postihuje starší lidi (starší 60 let), poměr mužů a žen je 1,6:1 (Adam et al., 2008). Může vzniknout samostatně (de novo B-PLL), nebo se může jednat o transformaci CLL/SLL, mající většinou i horší prognózu (Marinov, 2008). U onemocnění se vyskytuje splenomegalie, lymfadenopatie, anémie, trombocytopenie (Adam et al., 2008) či neutropenie. Prolymfocyty tvoří více než 55 % buněk v diferenciálním počtu PK, nápadná leukocytóza ( $> 100 \times 10^9/l$ ) (Penka et al., 2011), výrazná lymfocytóza ( $> 100 \times 10^9/l$ ). Prolymfocyty jsou středně velké lymfoidní buňky (dvojnásobek malého lymfocytu) mající kulaté jádro, výrazný nukleolus, který zřetelně vystupuje v důsledku ohraničení hutnějším chromatinem, jaderný chromatin je o něco méně kondenzovaným než u lymfocytů CLL, cytoplazma je objemnější než u lymfocytů CLL a je mírně bazofilní, agranulární (Kačírková et al., 2007). Imunofenotyp: pozitivita B buněčných antigenů CD19+, CD20+, CD22+ a silná exprese povrchových těžkých řetězců IgM nebo IgD a lehkých řetězců (kappa nebo lambda) (Penka et al., 2011), CD79a+ (Swerdlow et al., 2008), CD79b+, FMC7+, CD24+, CD37+, CD43+, CD10-, CD23-, CD25- (Kačírková et al., 2007), CD11c-, CD103- (Adam et al., 2008), CD5+ u transformace z B-CLL, CD5- u de novo B-PLL (Marinov, 2008). Chromozomální abnormality většinou postihují chromozom 14 (14q,32), u 25 % případů byla zjištěna translokace t(11;14)(q13;q32) (Adam et al., 2008).

### **2.2.3 Leukémie z vlasatých buněk (HCL)**

Neoplazie z B-lymfoidních buněk s „vlasatými“ výběžky cytoplazmy (Kačírková et al., 2007). Výrazná splenomegalie a pancytopenie (Marinov, 2008). Postihuje KD, PK a červenou pulpu sleziny (Kačírková et al., 2007), méně často postihuje uzliny (Marinov, 2008). Hepatomegalie je neobvyklá, ačkoliv jsou játra pravidelně infiltrována (Adam et al., 2008). Jedná se o vzácné onemocnění (2 % lymfoidních neoplázií) (Penka et al., 2011). Leukopenie je daná především monocytopenií a neutropenií (Kačírková et al., 2007), patologické vlasaté lymfoidní buňky produkují četné cytokiny, jejichž tlumivý vliv na krvetvorbu je hlavní příčinou pancytopenie. Nemoc bývá často asociována s autoimunitními chorobami (Adam et al., 2008). Medián věku postižených

pacientů je zhruba 50 let, častěji se choroba vyskytuje u mužů. Nádorové buňky bývají přítomny i v periferní krvi téměř u všech nemocných, není obvykle absolutní lymfocytóza (Penka et al., 2011). Buňky jsou menší či středně velké s centrálně nebo lehce excentricky uloženým jádrem. Tvar jádra je většinou oválný, kulatý, či ledvinovitý, může však mít tvar činky nebo může být prstenčité či lobulované (Kačírková et al., 2007), jaderný chromatin je jemnější, vzácně jsou patrné drobné nukleoly (Penka et al., 2011). Cytoplazma je většinou objemná, světlá či lehce bazofilní a na periferii neohraničená, vyběhající v jemné vlasovité projekce (po celém obvodu buňky). KD je většinou obtížně získatelná z důvodu fibrózy, punkce je buď úplně „suchá“ nebo může být kontaminována PK, nachází se redukce normální hematopoézy a neoplastické vlasaté lymfoidní buňky, které jsou TRAP+ (tartarát rezistentní kyselá fosfatáza) (Kačírková et al., 2007). Specifický imunofenotyp, silná exprese CD20 a povrchových imunoglobulinů, CD11c+, CD22+, CD25+, CD103+ (Marinov, 2008), CD123+, CD19+, CD79a+ (Kačírková et al., 2007), CD43-/+, CD10-/+ (Marinov, 2008), CD5-, CD21-, CD23-, CD24-, exprese znaku CD79b je variabilní, IgM+ (ostatní typy IgD, IgG, IgA jsou méně časté), CD38- nebo jen slabě +. Neprokazují se reciproké translokace, u malé části případů se zastihne +5q a del(7q) (Kačírková et al., 2007). Nově je pro diagnostiku HCL používána i objevená mutace BRAF-V600E, která onemocnění jasně určuje (Tiacci et al., 2012).

Tabulka č. 3: Skórovací systém pro HCL

Marker	Charakter exprese	Skóre
CD103	slabá	1
CD25	pozitivní	1
CD11c	pozitivní	1
FMC7	negativní	1

HCL má skóre 3-4, vHCL a SLVL mají skóre 0-2 (Marinov, 2008).

Dle WHO z roku 2008 je variantní leukemie z vlasatých buněk (**v-HCL**) zařazena jako podjednotka neklasifikovaného splenického B- buněčného lymfomu. U v-HCL je významná lymfocytóza, hodnoty lymfocytů mohou dosáhnout  $100 \times 10^9/l$  (Penka et al., 2011) bez monocytopenie, u buněk v-HCL je morfologicky charakteristický zřetelný nukleolus (analogie prolymfocytů) s objemnou mírně bazofilní cytoplazmou,

cytoplazmatické projekce jsou kratší a méně časté, obvykle TRAP- (Kačírková et al., 2007). U v-HCL je fenotyp CD103+ (není tak silný jako u klasické formy), CD11c+ (slabší), CD25- a CD123-, IgM+ a lehké řetězce lambda+ (Kačírková et al., 2007), FMC7+ (Swerdlow et al., 2008). Mutace BRAF-V600E není u v-HCL přítomna (Cornet et al., 2014).

#### **2.2.4 Lymfoplazmocytární lymfom (LPL) / Waldenströмова makroglobulinemie**

Neoplazie z malých B-lymfocytů, plazmocytoidních lymfocytů a plazmatických buněk, postihující KD (možná pancytopenie), lymfatické uzliny a slezinu (splenomegalie), případně PK. Charakteristická je tvorba monoklonálního proteinu (nejčastěji třídy IgM v koncentraci 30g/l) s hyperviskozitou či kryoglobulinemií (Kačírková et al., 2007), předpokládány jsou genetické vlivy, některé případy jsou asociovány s výskytem HCV, postihuje starší pacienty, častěji muže (Penka et al., 2011). V PK může být lymfocytóza s přítomností malých lymfocytů, plazmocytů a plazmocytoidních lymfocytů, poslední z nich jsou lymfoidní buňky, které již mají některé znaky plazmocytů - excentricita jádra, hrubší struktura chromatinu, objemná a bazofilní cytoplazma s naznačeným projasněním v oblasti Golgiho zóny (Kačírková et al., 2007). Přítomnost IgM může způsobovat rouleaux (penízkovatění) erytrocytů nebo jejich aglutinaci (Penka et al., 2011). Buňky mohou, ale nemusejí být nalezeny i v aspirátu KD, který je často v důsledku fibrózy hypocelulární a mnohdy obsahuje kromě atypických lymfocytů také zmnožené mastocyty (Kačírková et al., 2007). Zatím nebyla popsána cytogenetická změna, která by jednoznačně tuto chorobu definovala (Adam et al., 2008), častá je delece (6)(q21q23), trizomie chromozomu 3 nebo 12, vzácně lze detekovat t(9;14)(p13;q32) (Kačírková et al., 2007), dle Marinova, 2008 se tato translokace nevyskytuje. Imunofenotyp je nespecifický, nízký FSC (Marinov, 2008), CD19+, CD20+ (pozitivita může s postupující plazmocytoidní diferenciací slábnout), CD22+, CD79a+, FMC7+, CD38+, povrchové lehké řetězce kappa nebo lambda a těžké řetězce nejčastěji typu IgM (občas IgG, vzácně IgA, nikoliv IgD), CD27+ (Kačírková et al., 2007), CD52+ (Adam et al., 2008), CD5-, CD10-, CD11c, CD23-, CD25-, CD43-/+ (Marinov, 2008), CD103-, CD138-, CD79b-/+ , CD75- někdy odchylky CD10+, CD23+, CD11c+, CD25+ (Adam et al., 2008).

### **2.2.5 Malignity z plazmatických buněk**

Multifaktoriální neoplastická proliferace z plazmatických buněk (Marinov, 2008), nebo plazmocytoidních lymfocytů, které jsou charakterizovány sekrecí jednoho homogenního imunoglobulinového produktu (monoklonální-M-komponenta, paraprotein) (Kačírková et al., 2007). Jedná se o imunoglobulin produkovaný z buněk klonálního původu, bílkovina má monoklonální charakteristiku, vytvořený imunoglobulin je naprosto identický, má stejné chemické a fyzikální vlastnosti, jev nazýváme monoklonální gamapatie. Malignity z plazmatických buněk se dělí na řadu klinicko-patologických jednotek např.: monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS), plazmocelulární myelom (asymptomatický, nesekretující, plazmocelulární leukemie), plazmocytom (solidní nádor z plazmatických buněk), choroba z depozice imunoglobulinu (postižení měkkých tkání depozicí monoklonálního imunoglobulinu), osteosklerotický myelom (Penka et al., 2011). Klinický průběh může být indolentní nebo agresivní s rychlou leukemizací (Marinov, 2008). Skupina je uvedena z důvodu zařazení mezi neoplazie ze zralých B-buněk, nicméně se práce této rozsáhlé tématice blíže nevěnuje.

### **2.2.6 Folikulární lymfom (FL)**

Lymfom z B-buněk zárodečného centra, tedy z centrocytů a centroblastů, který si zachovává alespoň částečně folikulární strukturu (Penka et al., 2011). Patří k častým lymfomům (cca 70 % všech případů non-hodgkinských lymfomů nízkého stupně malignity) (Marinov, 2008), postihuje především uzliny, slezinu, KD a PK, vzácněji je postižen zažívací trakt, měkké tkáně a kůže (Penka et al., 2011) (kožní forma FL je nejčastějším kožním lymfomem z B-řady (Marinov, 2008)). Obě pohlaví jsou postižena stejně, nejčastěji je diagnostikován mezi 55-60 lety, nemoc začíná asymptoticky (zvětšením periferních či centrálně uložených uzlin, zpočátku může docházet i k spontánnímu zmenšení), biologické chování nemoci je individuální, choroba pravidelně relabuje, může přejít v agresivní DLBCL. Diagnóza nemoci je stanovena na základě histologie postižené uzliny (Adam et al., 2008). Postižení KD je relativně časté (40-70 %) (Penka et al., 2011), v PK u leukemických forem onemocnění bývá mírná leukocytóza, může však být i značná (až stovkové hodnoty WBC). Neoplastické lymfoidní buňky mohou být nalezeny i u normálního počtu leukocytů. Typické

lymfoidní buňky FL jsou malé buňky-centrocyty (menší než lymfocyty CLL, někdy i menší než erytrocyt), cytoplazma tvoří úzký lem (téměř neviditelná), vysoký N/C poměr. Chromatin je homogenně kondenzovaný, nukleolus není patrný. Jádro je kulaté, často rozštěpené, někdy až tak hluboce, že je téměř přepůleno, tvarem připomíná kávové zrno. U agresivnějších forem mohou být přítomny i větší lymfoidní buňky s jemnější strukturou chromatinu či vysloveně blastické lymfoidní elementy s nukleoly-centroblasty. Vyskytuje se anemie, trombocytopenie, nebo neutropenie. Imunofenotyp: CD19+(spíše slabě), CD20+(silně), CD21+, CD22+ (silně), CD24+, FMC7+(silně), CD79a+, CD79b+, sIg(silně), IgM+, IgD+, IgG+, vzácněji IgA+, CD10+, CD38+ (Kačírková et al., 2007), CD23-/+ , CD11c-/+ , CD5-, CD43- (Marinov, 2008), CD103-, CD25-. Cytogenetický nále: t(14;18) (q32;q21) spojeno s expresí BCL2, časně jsou změny v oblasti 6q, pozdní změny např. 12q+ či del(1p) a del(17p) spojené s transformací lymfomu (Kačírková et al., 2007).

### **2.2.7 Lymfom z pláštěvých buněk (MCL)**

Maligní proliferace malých až středně velkých monomorfních B-lymfocytů (Marinov, 2008), z buněk pláštěvé zóny lymfatického folikulu, které jsou charakterizovány expresí cyklinu D1 spojenou s translokací t(11;14) (Penka et al., 2011). Translokace t(11;14) způsobuje poruchu regulace proliferace (Adam et al., 2008) a má za následek neregulovanou zvýšenou expresi genů a tvorbu proteinu cyklinu D1 (Penka et al., 2011), což vede k expanzi buněk pláštěvé zóny. V Evropě tvoří MCL jen 7-9 % ze všech non-hodgkinských lymfomů, jedná se o agresivní onemocnění postihující pacienty staršího věku (65-70 let), častěji muže (Adam et al., 2008). MCL postihuje uzliny, většina nemocných je diagnostikována v pokročilých stádiích choroby (III až IV stadium (Adam et al., 2008)) s postižením jater, sleziny, KD (Penka et al., 2011). Nález v PK může být normální, často dochází k leukemizaci, počet lymfomových buněk v PK nebývá velký. Buňky MCL jsou polymorfní od malých, přes středně velké, až po velké, s nepravidelným tvarem jádra (široké zářezy, lobulizace apod.) (Kačírková et al., 2007), jaderný chromatin je jemněji kondenzován, mohou být nalezeny neprominující nukleoly, různě objemná cytoplazma (Penka et al., 2011). V případě blastoidní varianty MCL jsou lymfomové buňky spíše větší, s jemným jaderným chromatinem, často se zřetelnými nukleoly, blastoidní varianta může být

monomorfní (připomínající ALL) nebo pleomorfní s nápadnějšími nukleoly. Těžší infiltrace KD se projevuje anémií, trombocytopenií nebo neutropenií. Infiltrace KD je u přibližně 65 % případů. Imunofenotypizačně CD19+, CD20+(silně), CD5+, sIg(silně), CD22+, CD24+, CD79a+, CD79b+, FMC7+(silně), CD43+, CD38+, většinou Lambda+ (Kačírková et al., 2007), CD23- /+, CD10- /+, CD11c- (Marinov, 2008), CD25-, CD103- (Kačírková et al., 2007).

### **2.2.8 Difuzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL)**

Neoplazie z velkých lymfoidních buněk z B řady (Penka et al., 2011) vyznačující se difuzní proliferací (Kačírková et al., 2007), postihující uzliny nebo extranodální tkáň (Penka et al., 2011). Objevuje se v každém věku (Adam et al., 2008). Tvoří 30-40 % všech maligních lymfomů z B řady u dospělých (Marinov, 2008). Příčina vzniku lymfomu není známá, může vznikat de novo (primární) nebo progresí, respektive transformací z jiných lymfoproliferativních chorob (CLL, FL, lymfomu z marginální zóny) – sekundární. Až 40 % DLBCL vzniká v extranodálních tkáních – zažívací trakt, kosti, slezina, slinné žlázy, štítná žláza, ledviny, játra, nadledviny, kůže (Penka et al., 2011), CNS (Adam et al., 2008). Primární infiltrace KD je vzácná (11-27 % případů) (Penka et al., 2011). Nepříznivá prognóza u primárních lymfomů varlat, CNS, kostí (Adam et al., 2008). Klasifikace WHO uvádí několik variant DLBCL. Nejčastěji se vyskytuje tzv. centroblastická varianta, častou variantou DLBCL je i varianta imunoblastická (Kačírková et al., 2007) (více než 90 % buněk tvoří imunoblasty (Penka et al., 2011)), další varianta je anaplastická a jsou definovány i další subtypy např. varianta bohatá na T-buňky/ histiocyty (THRBCL), plazmablastická varianta (vzácná). V PK může být v případě infiltrace KD přítomna cytopenie (anemie, trombocytopenie, neutropenie) z insuficience KD. V případě leukemizace se mohou do PK vyplavovat lymfomové blastické buňky – ojedinělé či velmi četné, někdy způsobující výraznou leukocytózu. Buňky DLBCL jsou velmi polymorfní (velikost buňky, jádra, N/C poměr, tvar jádra, počet nukleolů, objem a bazofilie cytoplazmy), postižení KD je obvykle spojeno s výraznou fibrotizací, nádorové buňky jsou velké a většinou podobně jako extramedulárně nabývají charakteru centroblastů či imunoblastů. Rozdílnost mezi výsledky průtokové cytometrie a histologií bývá až u třetiny případů, jednou z možných příčin je pravděpodobně schopnost lymfomové populace „ztrácet“ expresi jinak



obvyklých B-lymfocytárních znaků včetně sIg (Kačírková et al., 2007). Imunofenotyp je nespecifický, vysoký FSC (Marinov, 2008), CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, CD79b+, FMC7+, CD21- (Kačírková et al., 2007), CD5-/+ , CD10+/-, CD11c-/+ , CD23-/+ , CD25-/+ , CD43-/+ (Marinov, 2008), povrchový imunoglobulin (IgM, IgG, IgA) je prokázán u 50-75 % případů, anaplastická varianta je CD30+. Cytogenetická abnormalita 3q27 postihující gen BCL6, translokace t(14;18) s přestavbou BCL2 (Kačírková et al., 2007).

### **2.2.9 Mediastinální velkobuněčný B-lymfom (MLBCL)**

MLBCL je subtyp DLBCL vznikající z B-buněk thymu (Kačírková et al., 2007), postihuje převážně mladé ženy, agresivní choroba (Adam et al., 2008) se specifickými klinickými a genotypovými rysy (Kačírková et al., 2007) (negativním prognostickým faktorem je přítomnost perikardiálního výpotku a snížení celkové fyzické zdatnosti (Adam et al., 2008)). Imunofenotyp: CD19+, CD20+, CD22+, CD21-, CD10-, sIg-, CD23+/-, CD30+/-, KD ani PK obvykle nebývají postiženy (Kačírková et al., 2007).

### **2.2.10 Intravaskulární velkobuněčný B-lymfom**

Vzácný, extrémně agresivní subtyp extranodálního DLBCL (dle genového expresního profilu obvykle z aktivovaných B-buněk), charakteristická je přítomnost lymfomových buněk pouze v lumen malých cév, zvláště kapilár (Kačírková et al., 2007). Intravaskulární lymfomy neinfiltrují stěny cév a nezpůsobují nekrózy, nejčastěji se manifestuje na kůži a v CNS, mohou postihovat kterýkoliv orgán a způsobovat poruchu jeho funkce (Adam et al., 2008). Postižení cév KD je možné, histologicky se často prokáže až postmortálně (Kačírková et al., 2007). Buňky exprimují znak CD44 (Adam et al., 2008).

### **2.2.11 Primární exsudativní lymfom (PEL)**

Neoplazie z velkých B-buněk (Kačírková et al., 2007), klinicky se prezentující patologickým výpotkem (Adam et al., 2008) bez detekovatelné nádorové masy (Kačírková et al., 2007). Vzniká v souvislosti s infekcí humánním herpesvirem 8 (HHV-8)/Kaposi sarcoma herpes virus (KHSV) (Adam et al., 2008), většinou postihuje nemocné s imunodeficitem (infekce HIV, potransplantační stavy). KD ani PK nebývají

postiženy (Kačírková et al., 2007), klinický průběh je velmi agresivní (medián přežití je 6 měsíců) (Adam et al., 2008).

### 2.2.12 Burkittův lymfom (BL)

Vysoce agresivní B buněčný lymfom s rychlým růstem, který se může manifestovat jako akutní leukemie (charakterizován vysokou mitotickou aktivitou a častým postižením genu MYC) (Penka et al., 2011). Vyskytuje se převážně u dětí a dospívajících. Lymfom se vyskytuje v několika formách (Marinov, 2008). **Endemická** varianta často spojená s antigenní stimulací virem EBV (Kačírková et al., 2007), roli zřejmě hraje i Plasmodium falciparum, vyskytuje se převážně u malých dětí (4-7 let), častěji chlapců v rovníkové Africe či Papua, Nová Guinea. Až u 50 % nemocných se projevuje postižením čelisti, PK či KD je postižena vzácně, nedochází k leukemizaci. Forma **sporadická** je spojena s infekcí EBV asi ve 30 % případů (Penka et al., 2011), je možná leukemizace, vzácněji se jedná o formu akutní leukemie s postižením KD a PK (Kačírková et al., 2007). Forma sporadická se nachází u dětí a mladých dospělých, častěji jsou postiženi chlapci (Penka et al., 2011) (výskyt spíše v Evropě), forma se projevuje mimouzlinovým postižením, nejčastěji v dutině břišní (Adam et al., 2008). Může infiltrovat do PK, KD a CNS (obvykle u pacientů s infiltrací KD – 2/3 z nich) (Adam et al., 2008) postižení prsou, uzlin (Penka et al., 2011). Další forma **asociovaná s imunodeficity** je popsána především ve spojení s infekcí HIV (Kačírková et al., 2007), postižení KD je časté, stejně jako postižení uzlin. Nádorové buňky Burkittova lymfomu jsou středně velké lymfoidní elementy uniformního vzhledu, mají kulaté či oválné jádro (Penka et al., 2011) s jemně granulární strukturou jaderného chromatinu se zřetelnými nukleoly, se silně bazofilní cytoplazmou, která je často vakuolizovaná. Někdy lze ve vakuolách prokázat přítomnost tuků, barvením olejovou červení O. Imunofenotypizačně jsou nádorové buňky CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, CD10+, CD77+, CD45+(silně) (Kačírková et al., 2007), CD43+(silně), sIg+(silně), CD38+ (Penka et al., 2011), cyCD79a, cyCD22+, IgM+, variabilně jsou CD11a+, CD54+, CD39+, CD70+, u endemické formy je znak CD21+, dále jsou buňky CD34-, TdT-, CD5-, CD23- (Kačírková et al., 2007), CD11c- a CD25- (Marinov, 2008). Cytogeneticky je typická deregulace genu c-MYC translokací t(8;14)(q24;q32) (Kačírková et al., 2007), méně často se vyskytuje t(2;8)(p12;q24) nebo t(8;22)(q24;q11)

(Marinov, 2008), prognosticky nepříznivé jsou mutace 17p(gen TP53) u dospělých a změny 13q a 22q u dětí (Kačírková et al., 2007).

### **2.2.13 Lymfom z marginální zóny (MZL)**

Lymfom z marginální zóny je maligní proliferace malých lymfocytů o nízkém stupni malignity. Postihuje slezinu (splenický lymfom z marginální zóny – SMZL), lymfatické uzliny (nodální lymfom z marginální zóny – NMZL) nebo extranodální lokalizace (MALT lymfom) (Marinov, 2008).

### **2.2.14 Splenický lymfom z B buněk marginální zóny (SMZL)**

Vzácný lymfom s pozvolným (indolentním) průběhem (Penka et al., 2011), výskyt u osob kolem 70. roku života (Adam et al., 2008), postihuje často slezinu, PK (leukemizace) a KD. Počet leukocytů obvykle přesahuje  $10 \times 10^9/l$  spolu s lymfocytózou (více než 50 %) (Penka et al., 2011), u 30 % pacientů bývá anemie, u 10 % je trombocytopenie, transformace v agresivní lymfom je vzácná (Adam et al., 2008). Nádorové buňky jsou často oválné, s kulatým či oválným jádrem, s kondenzovaným chromatinem, polovina případů má zřetelný nukleolus, cytoplazma je středně objemná, může vybíhat do jemných vlásků na jednom či obou pólech buňky (rozdíl od HCL). Nález těchto buněk v PK označujeme jako splenický lymfom s vilózními lymfocyty (SLVL) (Penka et al., 2011). Monoklonální gamapatie, hladina monoklonálního imunoglobulinu okolo 20 g/l (často IgM, vzácně IgG) (Adam et al., 2008), u pacientů přítomné rouleaux (penízkovatění) erytrocytů (Penka et al., 2011). Nespecifický imunofenotyp CD19+, CD20+, CD21+, CD22+, CD24+, CD79a+, CD79b+, FMC7+, CD11c + (Kačírková et al., 2007), exprese povrchových imunoglobulinů (IgM, méně často IgD) (Penka et al., 2011), CD5-, CD10-, CD23-, CD43-, CD103-, CD38 a CD25 jsou převážně negativní (Kačírková et al., 2007). V cytogenetice prokázána nejčastěji delece 7q (Penka et al., 2011), častá je trizomie 3, translokace t(11;18) (Marinov, 2008).

### **2.2.15 Extranodální lymfom z B-buněk marginální zóny ze slizniční lymfatické tkáně (MALT lymfom)**

Extranodální lymfom z B buněk marginální zóny ze slizniční lymfatické tkáně vzniká často na podkladě chronických změn. MALT většinou infiltruje zažívací trakt (Kačírková et al., 2007) – žaludek (74,6 %) (Adam et al., 2008), slinné žlázy, kůži, plíce

(Kačirková et al., 2007), štítnou žlázu a jiné měkké tkáně (Marinov, 2008), postižení KD či PK je vzácné, nádorové buňky jsou morfologicky heterogenní (Kačirková et al., 2007). Neléčené lymfomy jsou v neustálé dynamické proměně – přechod v DLBCL (Adam et al., 2008). Nespecifický imunofenotyp viz SMZL, variabilní pozitivita znaku CD43, IgM+, méně často IgA+, IgG+. Geneticky trizomie 3 a translokace t(11;18)(q21;q21), t(1;14)(p22;q32) s deregulací genu BCL10 a t(14;18)(q32;q21) s ovlivněním genu MALT1. Dále je popsána t(3;14)(p14.1;q32) s deregulací genu FOXP1 (Kačirková et al., 2007).

### **2.2.16 Nodální lymfom z B-buněk marginální zóny (NMZL)**

Morfologicky podobný SMZL a MALT lymfomu (Kačirková et al., 2007), postižení sleziny či měkkých tkání není časté, převážná infiltrace lymfatických uzlin (Marinov, 2008), vyskytuje se u osob kolem 65 let (Adam et al., 2008). Postižení KD a PK není časté, v případě postižení se nachází velké „monocytoidní“ lymfomové buňky s kulatým či ledvinovitým jádrem s homogenním chromatinem a relativně objemnou, světle bazofilní cytoplazmou (Kačirková et al., 2007), nepravidelně ohraničenou (Penka et al., 2011). Infiltrace KD se prokazuje přibližně u třetiny případů, avšak histologicky ani imunofenotypizačně nelze odlišit postižení dřeně od častějšího MALT lymfomu. U nádoru nebyly zjištěny specifické cytogenetické změny, byla popsána trizomie 12 (Kačirková et al., 2007), trizomie 13, translokace t(11;18)(q21;p21) (Marinov, 2008) či trizomie 3 (Kačirková et al., 2007).

### **2.2.17 Lymfomatoidní granulomatóza (LYG)**

Je angiocentrické a angiodestruktivní lymfoproliferativní onemocnění tvořené EBV pozitivními B-buňkami smíšenými s reaktivními T-buňkami. KD a PK nebývají postiženy (Kačirková et al., 2007).

### **3 Praktická část**

## 3.1 Použité přístroje, chemikálie a příprava vzorků

### 3.1.1 Použité přístroje a pomůcky

- průtokový cytometr BD FACS Canto II
- centrifuga Hettich
- automatické pipety Eppendorf, Biohit
- třepačka IKA
- jednorázové zkumavky
- jednorázové filtry CellTrics
- špičky na automatické pipety

### 3.1.2 Použité chemikálie a příprava

- DAKO - fosfátový pufr s bovinním albuminem (BSA)

Příprava: do 1 l roztoku PBS přidat 20 ml 22% BSA a 10 ml 10% roztoku azidu sodného

- lyzační roztok BD FACS Lysing solution

Příprava: naředit 1:10 destilovanou vodou, roztok připravovat každý den čerstvý

- LST-Cytognos (lymphoid screening tube)-koktejl 11 konjugovaných protilátek

(koktejl obsahuje protilátky: CD20 PB, CD4 PB, CD45 PO, CD8 FITC, sIgλ FITC, CD56 PE, sIgκ PE, CD5 PerCP-Cy5.5, CD19 PC7, TCRγδ PC7, sCD3 APC, CD38 APCH7) (50 μl)

Příprava: rozpustit v 300 μl destilované vody, roztok je stabilní 1 měsíc při 2-8 °C

- monoklonální protilátky

Příprava: připraveny k použití

CD20 PB, CD45 PO, CD19 PC7, CD23 FITC, CD10 PE, CD79b PerCP-Cy5.5, CD200 APC, CD43 APCH7, CD31 FITC, LAIR1 (CD305) PE, CD11c PerCP-Cy5.5, sIgM APC, CD81 APCH7, CD103 FITC, CD95 PE, CD22 PerCP-Cy5.5, CXCR5 (CD185) APC, CD49d APCH7, CD62L FITC, CD39 PE, CD27 APC, HLA-DR PerCP-Cy5.5

### 3.1.3 Použitý biologický materiál, příprava materiálu

- periferní krev (EDTA), stabilita vzorku 24 hod.

Příprava: bez úpravy, plná krev

- aspirát kostí dřeně (EDTA), stabilita vzorku 24 hod.

Příprava: přefiltrovat kostní dřeně přes filtr CellTrics (50  $\mu$ m) do předem označené zkumavky

Pozn.: V případě panelů obsahujících sIg $\kappa$ , sIg $\lambda$  a IgM je nutné 50  $\mu$ l materiálu před značením protilátkou 2x promýt ve 2 ml PBS (DAKO), centrifugace 5 minut při 540 $\times$ g, odstranit supernatant.

### 3.1.4 Postup značení monoklonálními protilátkami

1. označit zkumavky (jméno, materiál, panel)
2. na dno označených zkumavek pipetovat odpovídající množství příslušných protilátek nebo koktejlů protilátek
3. do všech zkumavek přidat 50  $\mu$ l vzorku, dobře protřepat
4. inkubovat 15 minut ve tmě za laboratorní teploty
5. po inkubaci přidat 2 ml připraveného lyzačního roztoku, dobře promíchat
6. inkubovat 10 minut ve tmě za laboratorní teploty
7. zkumavky centrifugovat 5 minut při 540 $\times$ g
8. odstranit supernatant
9. promýt ve 2 ml DAKO, centrifugace 5 minut při 540 $\times$ g
10. odstranit supernatant
11. přidat 200  $\mu$ l DAKO
12. měření vzorků na průtokovém cytometru, do analýzy vzorky skladovat při 2 – 8  $^{\circ}$ C (maximálně 1 hodinu)

Jednotlivé zkumavky obsahovaly následující kombinace protilátek:

**LST** CD20 PB (1  $\mu$ l), CD4 PB (0,5  $\mu$ l), CD45 PO (5  $\mu$ l), CD8 FITC (20  $\mu$ l), sIg $\lambda$  FITC (20  $\mu$ l), CD56 PE (20  $\mu$ l), sIg $\kappa$  PE (20  $\mu$ l), CD5 PerCPCy5.5 (15  $\mu$ l), CD19 PC7, TCR $\gamma\delta$  PC7 (1  $\mu$ l), sCD3 APC (2,5  $\mu$ l), CD38 APCH7 (3  $\mu$ l).

1. zkumavka CD20 PB (1  $\mu$ l), CD45 PO (5  $\mu$ l), CD19 PC7 (5  $\mu$ l), CD23 FITC (2,5  $\mu$ l), CD10 PE (20  $\mu$ l), CD79b PerCP-Cy5.5 (5  $\mu$ l), CD200 APC (1,25  $\mu$ l), CD43 APCH7 (5  $\mu$ l)
2. zkumavka CD20 PB (1  $\mu$ l), CD45 PO (5  $\mu$ l), CD19 PC7 (5  $\mu$ l), CD31 FITC (10  $\mu$ l), LAIR1 (CD305) PE (10  $\mu$ l), CD11c PerCP-Cy5.5 (5  $\mu$ l), sIgM APC (10  $\mu$ l), CD81 APCH7 (5  $\mu$ l)
3. zkumavka CD20 PB (1  $\mu$ l), CD45 PO (5  $\mu$ l), CD19 PC7 (5  $\mu$ l), CD103 FITC (2  $\mu$ l), CD95 PE (20  $\mu$ l), CD22 PerCP-Cy5.5 (2  $\mu$ l), CXCR5 (CD185) APC (10  $\mu$ l), CD49d APCH7 (2  $\mu$ l)
4. zkumavka CD20 PB (1  $\mu$ l), CD45 PO (5  $\mu$ l), CD19 PC7 ( $\mu$ l), CD62L FITC (2,5  $\mu$ l), CD39 PE (10  $\mu$ l), CD27 APC (2,5  $\mu$ l), HLA-DR PerCP-Cy5.5 (10  $\mu$ l)

Zmíněné panely byly sestaveny na základě účasti v programu EuroFlow, panely (kombinace protilátek) byly uveřejněny v článku Van Dongen et al., 2012, příprava vzorků proběhla podle *Detailed EuroFlow Standard Operating Procedures (SOPs) for sample preparation and staining* (Internet 6).

Na základě účasti v projektu EuroFlow, bylo provedeno i nastavení průtokového cytometru (kontrolováno před každým měřením pomocí kontrolního materiálu Rainbow), včetně zvolených kompenzací, vytvoření protokolů měření a počtu událostí, které byly průtokovým cytometrem při měření načteny. Provedeno dle *EuroFlow Standard Operating Protocol (SOP) for Instrument Setup and Compensation* (Internet 6).

### **3.2 Gatovací strategie**

Základní screeningová zkumavka LST určující klonalitu vzorku:

Zobrazení populací SSC/FSC. Základem je gate na populaci leukocytů (CD45), následně vytvoření gateu lymfocytů (45/SSC), rozdělení lymfocytů na T lymfocyty (CD3+), B lymfocyty (CD19+), NK buňky (CD3-,CD56+,CD16+), zjištění klonality B lymfocytů (sIg $\kappa$ , sIg $\lambda$ ), exprese znaků CD5, CD38, CD20, TCR $\gamma\delta$ .



Jednotlivé zkumavky k určení typu B-lymfoproliferace:

Zobrazení SSC/FSC, ve všech 4 zkumavkách zobrazení populace leukocytů (45/SSC) zobrazení exprese CD19, CD20, gate vytvořený na B lymfocytech (CD19+), vyjádření exprese jednotlivých znaků na populaci B lymfocytů (vyjádřeny jednotlivé znaky, které zkumavka obsahuje).

Naměřená data byla vyhodnocena v softwaru DIVA.

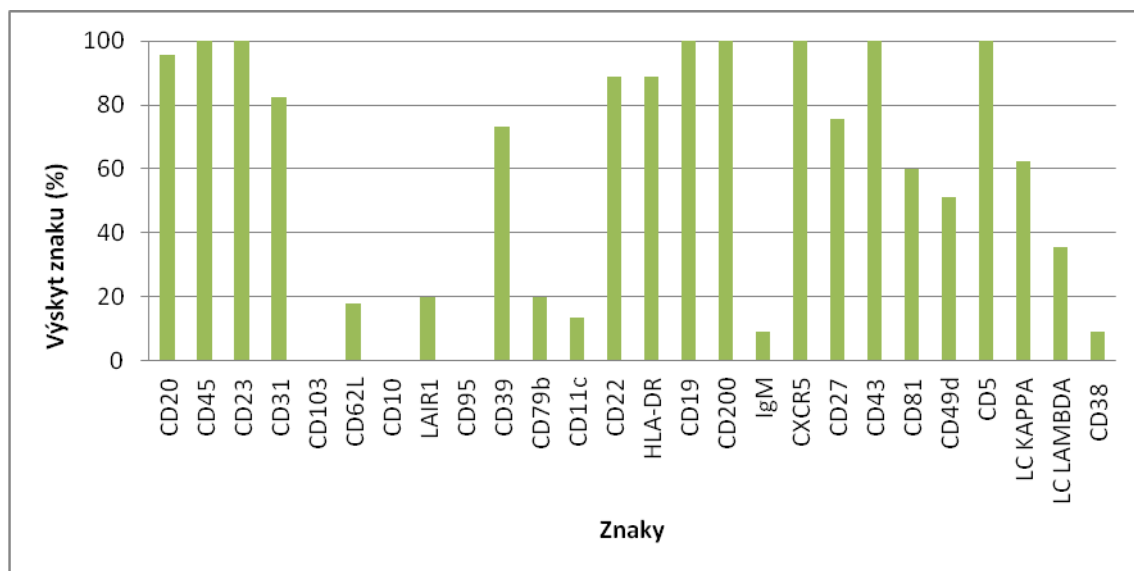
### **3.3 Charakteristika souboru pacientů**

Celkem bylo do studie zařazeno 171 vzorků, které byly rozděleny na základě druhu materiálu, na periferní krev a kostní dřeň. Data byla naměřena v období od 06/2013 do 02/2014. Pacienti zařazení ve studii jsou převážně z interních hematologických ambulancí, věkový medián pacientů je 67 let (rozsah 32 - 90 let). Soubor tvořilo celkem 75 žen a 96 mužů (u PK bylo 33 žen a 46 mužů, u KD bylo 42 žen a 50 mužů). Na základě vyšetřenoého fenotypu a počtu měření byly vzorky rozděleny do jednotlivých skupin onemocnění. Vzorky PK byly rozděleny celkem na 4 charakteristické skupiny: CLL, MCL, B-NHL NOS a ostatní B lymfoproliferace, do této skupiny byly zařazeny všechny skupiny fenotypu s nízkou četností výskytu (pod 3 měření), konkrétně se jednalo o MZL, SMZL, atyp. CLL, FL, HCL, vHCL. Vzorky KD byly rozděleny na celkem 5 skupin: CLL, MCL, FL, B-NHL NOS a ostatní B lymfoproliferace, kam patřily vzorky s fenotypem LPL, MZL, atyp. CLL, HCL, DLBCL s četností výskytu pod 3 měření. Naměřená data byla vyhodnocena v programu Excel.

## **4 Výsledky**

## 4.1 Skupina pacientů s chronickou lymfocytární leukemií, nálezy v periferní krvi a kostní dřeni

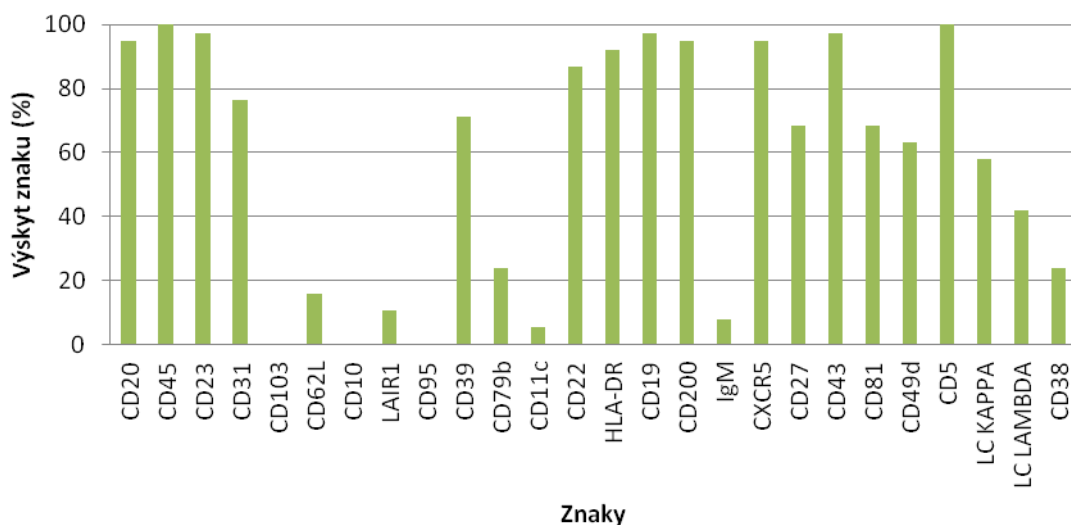
Obrázek č. 8: Exprese znaků u pacientů s chronickou lymfocytární leukemií v periferní krvi



Zdroj: Vlastní zpracování autorky

Skupina vzorků u CLL v periferní krvi obsahuje 46 měření (19 žen a 27 mužů). Z grafu je patrná 100% exprese znaků CD45, CD23, CD19, CD200, CXCR5, CD43 a CD5, negativní exprese znaků CD103, CD10, CD95, tyto znaky by dle zařazené skupiny neměly buňky CLL exprimovat. Znaky CD20, CD31, CD22, HLA-DR jsou exprimovány u více než 80 % vzorků. Mezi znaky, které jsou exprimovány u více než 50 % vzorků patří CD39, CD27, CD81, CD49d a LC KAPPA. Ostatní znaky jsou u vzorků CLL exprimovány v PK pod 50 %.

Obrázek č. 9: Expresí znaků u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií v kostní dřeni

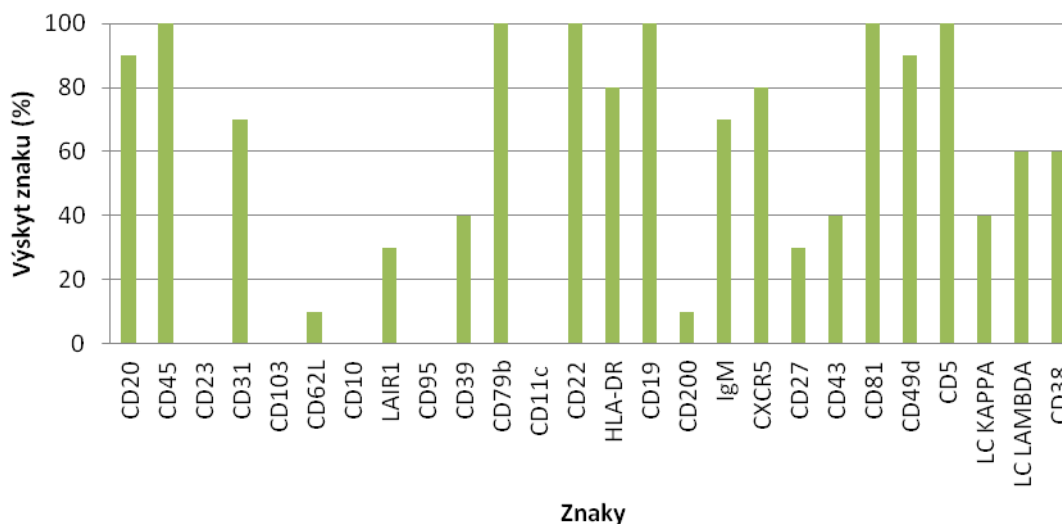


Zdroj: Vlastní zpracování autorky

Do skupiny CLL bylo v kostní dřeni zařazeno 38 vzorků (13 žen a 25 mužů). 100% exprese je patrná pouze u znaků CD45 a CD5 (tyto znaky se vyskytují u všech vzorků i v PK), negativní exprese je zřejmá u znaků CD103, CD10 a CD95 (stejně jako v PK). Expresí nad 80 % je patrná u znaků CD20, CD23, CD22, HLA-DR, CD19, CD200, CXCR5 a CD43. Kromě znaků CD20, CD22 a HLA-DR jsou všechny ostatní znaky exprimovány v PK ve 100 %. Nad 50 % vzorků CLL v kostní dřeni exprimuje znaky CD31, CD39, CD27, CD81, CD49d a LC KAPPA, kromě znaku CD31 je úplná shoda s periferní krví. Ostatní znaky jsou exprimovány pod 50 %.

## 4.2 Skupina pacientů s lymfomem z buněk pláštěvé zóny, nálezy v periferní krvi a kostní dřeni

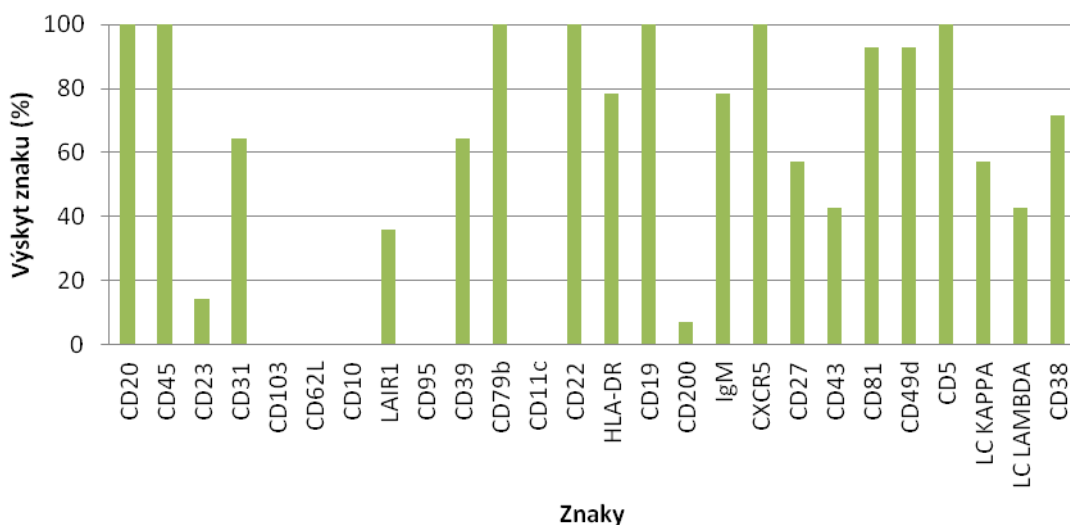
Obrázek č. 10: Expresí znaků u pacientů s lymfomem z buněk pláštěvé zóny v periferní krvi



Zdroj: Vlastní zpracování autorky

Vzorků skupiny MCL v periferní krvi bylo celkem 10 (3 ženy a 7 mužů). Z grafu vyplývá 100% exprese znaků CD45, CD79b, CD22, CD19, CD81 a CD5. Vzorky neexprimují znaky CD23, CD103, CD10, CD95 a CD11c. Nad 80 % je exprimován znak CD20 a CD49d, znaky HLA-DR a CXCR5 jsou exprimovány u 80 % vzorků. Znaky CD31, IgM, LC LAMBDA a CD38 jsou u MCL v PK exprimovány ve více než 50 %. Ostatní znaky jsou exprimovány pod 50 %.

Obrázek č. 11: Exprese znaků u pacientů s lymfomem z buněk pláštěvé zóny v kostní dřeni

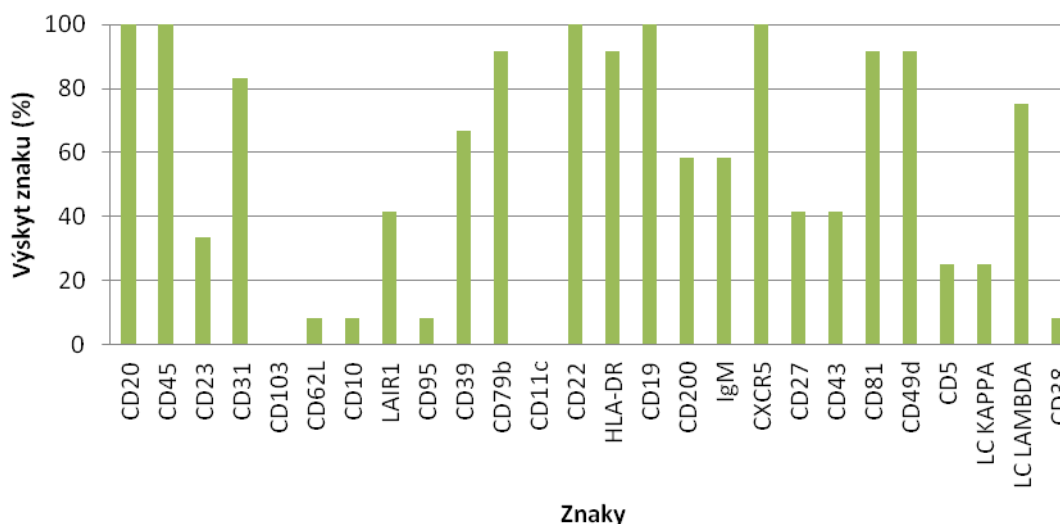


Zdroj: Vlastní zpracování autorky

Ve skupině MCL v kostní dřeni bylo změřeno celkem 14 vzorků (5 žen a 9 mužů). U skupiny je 100% exprese znaků CD20, CD45, CD79b, CD22, CD19, CXCR5 a CD5. U znaků CD45, CD79b, CD22, CD19 a CD5 je shoda s periferní krví. Vzorky neexprimovaly znaky CD103, CD62L, CD10, CD95, CD11c, což je stejné jako v PK s rozdílem v expresi znaku CD62L, který byl v periferní krvi exprimován (pouze u 10 % vzorků). Nad 80 % je exprimován v kostní dřeni znak CD81 (v PK exprimován u všech vzorků) a CD49d (shoda s PK). Nad 50 % jsou exprimovány znaky CD31, CD39, HLA-DR, IgM, CD27, LC KAPPA a CD38, u znaků CD31, IgM a CD38 je shoda s PK. Ostatní znaky jsou exprimovány u méně než poloviny vzorků.

### 4.3 Skupina pacientů s B non-hodgkinským lymfomem nespecifického fenotypu, nálezy v periferní krvi a kostní dřeni

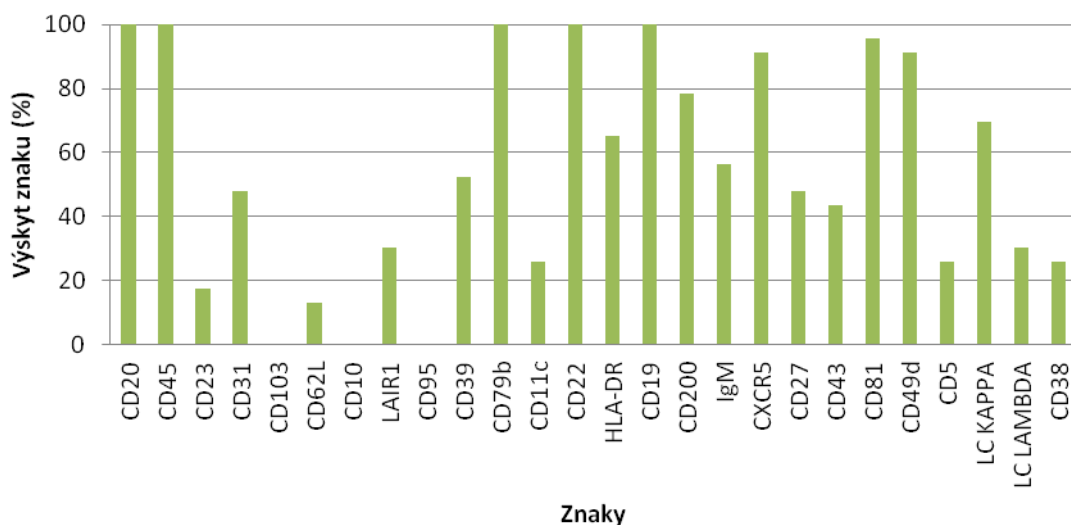
Obrázek č. 12: Expresí znaků u pacientů s B non-hodgkinským lymfomem nespecifického fenotypu v periferní krvi



Zdroj: Vlastní zpracování autorky

Do skupiny B-NHL NOS bylo zařazeno celkem 12 vzorků periferní krve (6 žen a 6 mužů). 100% výskyt znaků je patrný u znaků CD20, CD45, CD22, CD19 a CXCR5. Negativní exprese znaků CD103 a CD11c. Nad 80 % jsou exprimovány znaky CD31, CD79b, HLA-DR, CD81 a CD49d. Mezi znaky, které jsou exprimovány nad 50 % patří CD39, CD200, IgM a LC LAMBDA. Ostatní znaky jsou exprimovány pod 50 %.

Obrázek č. 13: Expresie znaků u pacientů s B non-hodgkinským lymfomem nespecifického fenotypu v kostní dřeni



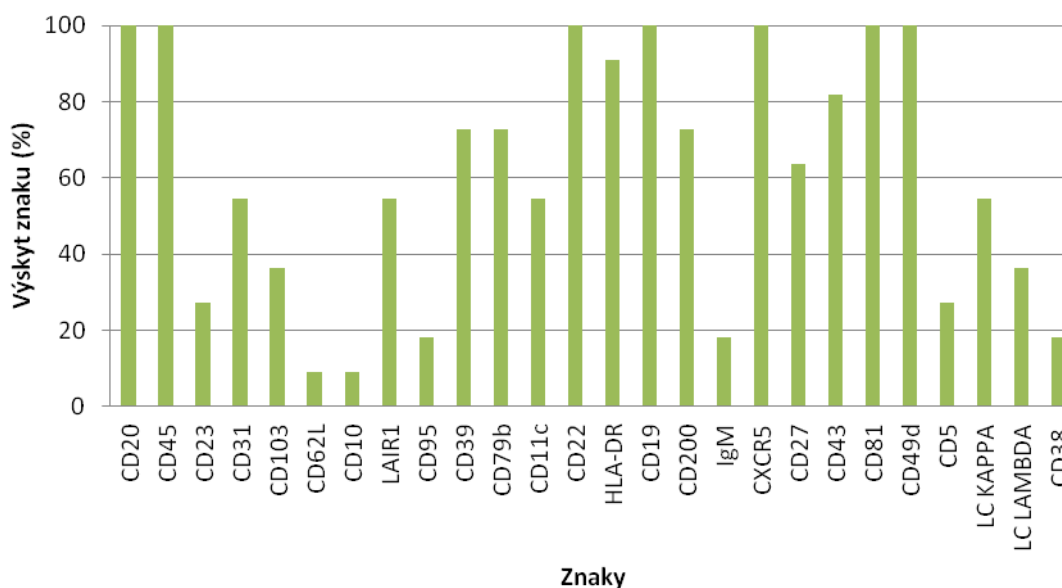
Zdroj: Vlastní zpracování autorky

23 vzorků kostní dřene (12 žen a 11 mužů) bylo zařazeno do skupiny B-NHL NOS. Mezi znaky, které byly exprimovány u 100 % vzorků řadíme CD20, CD45, CD79b, CD22 a CD19. Rozdíl oproti periferní krvi je vidět u znaku CD79b a CXCR5. Mezi znaky s negativní expresí lze zařadit CD103, CD10 a CD95, s periferní krví je patrná shoda pouze u znaku CD103. Nad 80 % vzorků exprimuje znak CXCR5, CD81 a CD49d, u posledních dvou znaků shoda s PK. Přes 50 % vzorků exprimuje znaky CD39, HLA-DR, CD200, IgM a LC KAPPA, shoda s PK je u znaků CD39, CD200 a IgM. Ostatní znaky jsou exprimovány u méně než poloviny vzorků.



#### 4.4 Skupina pacientů s ostatními B lymfoproliferacemi, nálezy v periferní krvi a kostní dřeni

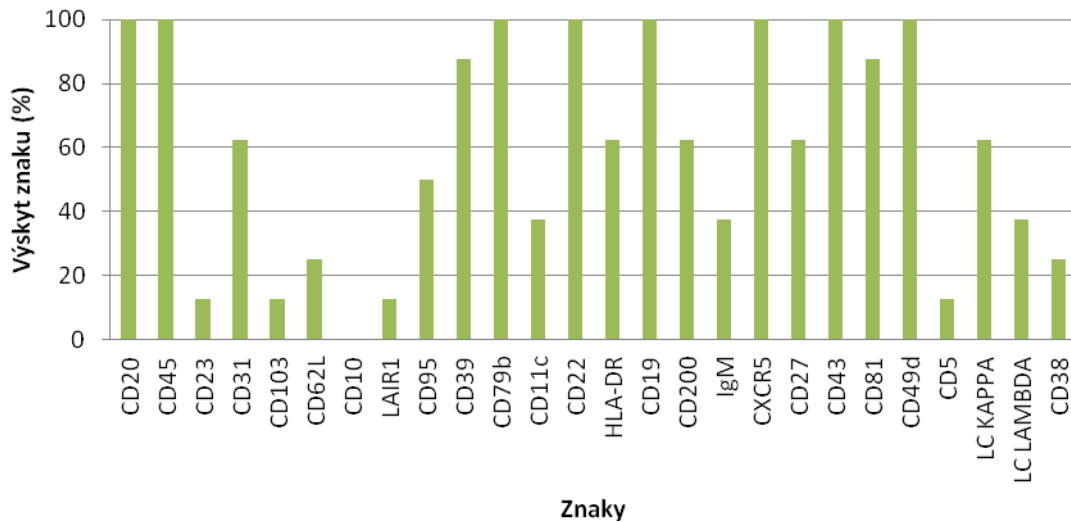
Obrázek č. 14: Exprese znaků u pacientů s ostatními B lymfoproliferacemi v periferní krvi



Zdroj: Vlastní zpracování autorky

Ve skupině ostatních B lymfoproliferací bylo změřeno celkem 11 vzorků periferní krve (5 žen a 6 mužů). 100% exprese je u znaků CD20, CD45, CD22, CD19, CXCR5, CD81 a CD49d. Negativní exprese není vidět u žádného znaku. Nad 80 % jsou exprimovány znaky HLA-DR a CD43. Znaky CD31, LAIR1, CD39, CD79b, CD11c, CD200, CD27 a LC KAPPA jsou exprimovány nad 50 % a ostatní znaky jsou exprimovány pod 50 %.

Obrázek č. 15: Exprese znaků u pacientů s ostatními B lymfoproliferacemi v kostní dřeni

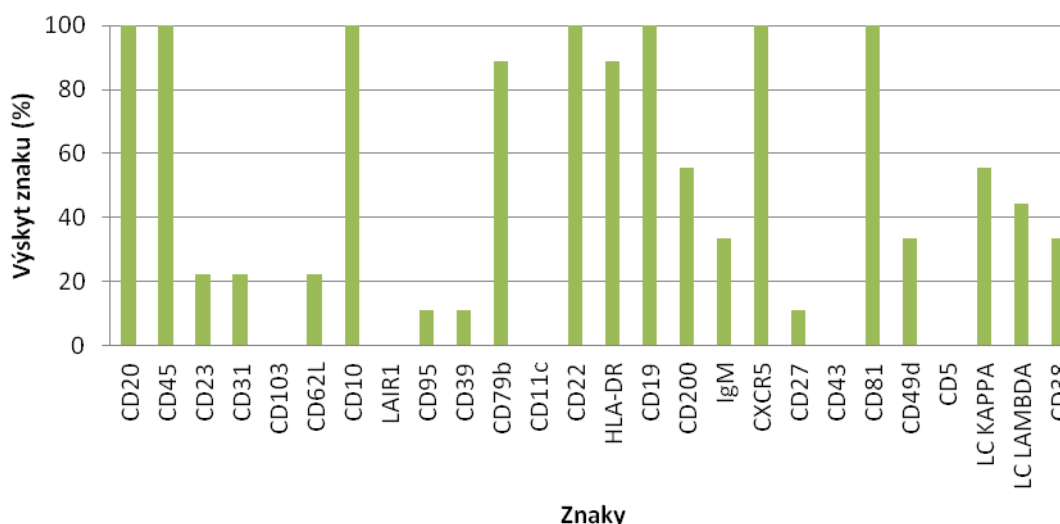


Zdroj: Vlastní zpracování autorky

Skupina ostatních B lymfoproliferací zahrnuje celkem 8 vzorků kostní dřene (6 žen a 2 muži). Výskyt 100% exprese je zřejmý u znaků CD20, CD45, CD79b, CD22, CD19, CXCR5, CD43 a CD49d. Shoda s periferní krví je u všech znaků, kromě znaku CD79b, CD43 a CD81. Patrná je negativní exprese znaku CD10. Znaky CD39 a CD81 jsou exprimovány nad 80 %. Nad 50 % jsou exprimovány znaky CD31, HLA-DR, CD200, CD27 a LC KAPPA, kromě znaku HLA-DR je shoda s PK. Ostatní znaky jsou exprimovány pod 50 %.

## 4.5 Skupina pacientů s folikulárním lymfomem, nálezy v kostní dřeni

Obrázek č. 16: Expresí znaků u pacientů s folikulárním lymfomem v kostní dřeni



Zdroj: Vlastní zpracování autorky

Ve skupině bylo měřeno 9 vzorků kostní dřeni (6 žen a 3 muži). V PK nebyla skupina vytvořena, jelikož byl pouze 1 vzorek s diagnózou FL. Vzorky 100% exprimovaly znaky CD20, CD45, CD10, CD22, CD19, CXCR5 a CD81. U vzorků je negativní exprese znaků CD103, LAIR1, CD11c, CD43 a CD5. Nad 80 % je exprimován u FL znak CD79b, HLA-DR a nad 50 % je exprimován znak CD200 a LC KAPPA. Znaky CD23, CD31, CD62L, CD95, CD39, IgM, CD27, CD49d, CD38 a LC LAMBDA jsou exprimovány pod 50 %.

## 4.6 Porovnání exprese znaků u jednotlivých skupin onemocnění v periferní krvi

Tabulka č. 4: Srovnání skupin periferní krev – 80-100% výskyt znaků

Pozitivní znaky (80-100 %)	CLL	MCL	B-NHL NOS	Ostatní
CD19	*	*	*	*
CD20	*	*	*	*
CD200	*			
CD22	*	*	*	*
CD23	*			
CD31	*		*	
CD43	*			*
CD45	*	*	*	*
CD49d		*	*	*
CD5	*	*		
CD79b		*	*	
CD81		*	*	*
CXCR5	*	*	*	*
HLA-DR	*	*	*	*

Zdroj: Vlastní zpracování autorky

Všechny klasifikované skupiny exprimují v periferní krvi v 80-100 % znaky CD19, CD20, CD22, CD45, CXCR5 a HLA-DR. Skupina CLL exprimuje ve srovnání s ostatními skupinami navíc znak CD200 a CD23. Oba znaky byly v periferní krvi exprimovány ve 100 %, stejně jako znak CD5, který byl exprimován i u MCL. Znak CD43 se vyskytuje u 80-100 % vzorků, jak u CLL, tak i u některého typu B lymfoproliferativního onemocnění, které je řazeno do skupiny ostatní. Znak CD79b je exprimován u vzorků skupiny MCL (100 %), v 92 % se vyskytuje u B-NHL NOS. Znaky CD81 a CD49d jsou v rozmezí 80-100% četnosti exprimovány u všech skupin, kromě skupiny CLL. Znak CD31 se vyskytuje srovnatelně okolo 82 % u CLL i B-NHL NOS.

Tabulka č. 5: Srovnání skupin kostní dřevě – 80-100% výskyt znaků

Pozitivní znaky (80-100 %)	CLL	MCL	B-NHL NOS	FL	Ostatní
CD10				*	
CD19	*	*	*	*	*
CD20	*	*	*	*	*
CD200	*				
CD22	*	*	*	*	*
CD23	*				
CD39					*
CD43	*				*
CD45	*	*	*	*	*
CD49d		*	*		*
CD5	*	*			
CD79b		*	*	*	*
CD81		*	*	*	*
CXCR5	*	*	*	*	*
HLA-DR	*			*	

Zdroj: Vlastní zpracování autorky

Vzorky ze všech skupin onemocnění exprimovaly v 80-100 % v KD znaky CD19, CD20, CD22, CD45 a CXCR5, stejně jako v periferní krvi, rozdílná je exprese znaku HLA-DR, která je na této hladině v KD pouze u skupiny CLL a FL. Všechny skupiny exprimovaly (shoda s PK) na této hladině i znak CD81, kromě onemocnění CLL. Znak CD49 také není exprimován skupinou CLL jako v periferní krvi a navíc není exprimován ani skupinou FL. Znaky CD200 a CD23 byly exprimovány na této hladině v kostní dřevě skupinou CLL, což odpovídá expresi skupiny CLL v periferní krvi, stejně jako znak CD43, který byl exprimován skupinou CLL a ostatní B-lymfoproliferace. Znak CD5 je v 80-100 % v kostní dřevě exprimován skupinou CLL a MCL, což odpovídá výsledkům periferní krve, stejně jako exprese znaku CD79b, který byl exprimován v kostní dřevě v 80-100 % ve skupině MCL a B-NHL NOS. Tento znak byl v KD navíc exprimován i skupinou FL a ostatní B-lymfoproliferace. Znak CD39 se vyskytoval pouze u skupiny ostatní B-lymfoproliferace, v PK nebyl na této hladině znak exprimován. Znak CD10 se s četností 80-100 % vyskytoval v kostní dřevě pouze u FL.

Tabulka č. 6: Srovnání skupin periferní krev – negativita znaků

Negativní znaky (0 %)	CLL	MCL	B-NHL NOS	Ostatní
CD10	*	*		
CD103	*	*	*	
CD11c		*	*	
CD23		*		
CD95	*	*		

Zdroj: Vlastní zpracování autorky

Vzorky periferní krve skupiny CLL a MCL neexprimovaly znak CD10, CD103 a CD95, znak CD103 nebyl exprimován v žádném vzorku i u skupiny B-NHL NOS. Znak CD11c nebyl exprimován v PK u žádného vzorku skupiny MCL a B-NHL NOS. Znak CD23 nebyl v periferní krvi exprimován u žádného vzorku skupiny MCL.

Tabulka č. 7: Srovnání skupin kostní dřeň – negativita znaků

Negativní znaky (0 %)	CLL	MCL	B-NHL NOS	FL	Ostatní
CD10	*	*	*	*	*
CD103	*	*	*	*	
CD11c		*		*	
CD43				*	
CD5				*	
CD62L		*			
CD95	*	*	*		
LAIR1				*	

Zdroj: Vlastní zpracování autorky

Znak CD10 byl exprimován v KD pouze skupinou FL, u vzorků ostatních skupin nebyla exprese znaku CD10 pozorována, stejně jako v PK u skupin CLL a MCL. FL v kostní dřeni neexprimuje také znak CD103, CD11c, CD43, CD5 a LAIR1, znak CD11c není exprimován ani vzorky skupiny MCL (shoda s PK), stejně jako znak CD62L. Kromě skupiny ostatní B-lymfoproliferace neexprimují všechny ostatní vzorky KD znak CD103, shoda s periferní krví. Znak CD95 exprimují v KD pouze vzorky skupiny FL a ostatní B-lymfoproliferace, u skupiny CLL a MCL je shoda s PK.

Tabulka č. 8: Srovnání skupin periferní krev – 1-49% výskyt znaků

Pozitivní znaky (1-49 %)	CLL	MCL	B-NHL NOS	Ostatní
CD10			*	*
CD103				*
CD11c	*			
CD200		*		
CD23			*	*
CD27		*	*	
CD38	*		*	*
CD39		*		
CD43		*	*	
CD5			*	*
CD62L	*	*	*	*
CD79b	*			
CD95			*	*
IgM	*			*
LAIR1	*	*	*	
LC KAPPA		*	*	
LC LAMBDA	*			*

Zdroj: Vlastní zpracování autorky

Všechny skupiny u 1-49 % vzorků periferní krve exprimují znak CD62L. Kromě skupiny ostatní B-lymfoproliferace exprimují všechny skupiny na této hladině i znak LAIR1. Znaky CD10, CD23 a CD95 exprimuje 1-49 % vzorků skupiny B-NHL NOS a ostatní B-lymfoproliferace. Znak CD103 exprimuje v 1-49 % pouze skupina ostatní B-lymfoproliferace. Znaky CD11c a CD79b jsou exprimovány u 1-49 % vzorků skupiny CLL, znaky CD200 a CD39 jsou exprimovány pouze u vzorků MCL. Znaky CD27 a CD43 jsou exprimovány v 1-49 % u MCL a B-NHL NOS. Znak CD5 je na této hladině exprimován u skupiny B-NHL NOS a u skupiny ostatní B-lymfoproliferace, znaky CD38 a IgM jsou exprimovány u CLL a u skupiny ostatní, znak CD38 je exprimován i u B-NHL NOS. Lehké řetězce KAPPA jsou exprimovány v 1-49 % u skupiny MCL a B-NHL NOS, u skupiny ostatní a CLL jsou exprimovány lehké řetězce LAMBDA.

Tabulka č. 9: Srovnání skupin kostní dřevě – 1-49% výskyt znaků

Pozitivní znaky (1-49 %)	CLL	MCL	B-NHL NOS	FL	Ostatní
CD103					*
CD11c	*		*		*
CD200		*			
CD23		*	*	*	*
CD27			*	*	
CD31			*	*	
CD38	*		*	*	*
CD39				*	
CD43		*	*		
CD49d				*	
CD5			*		*
CD62L	*		*	*	*
CD79b	*				
CD95				*	
IgM	*			*	*
LAIR1	*	*	*		*
LC LAMBDA	*	*	*	*	*

Zdroj: Vlastní zpracování autorky

V kostní dřevě exprimovaly všechny skupiny v 1-49 % lehké řetězce LAMBDA, odlišné od PK. Znaky CD38 a CD62L jsou na této hladině exprimovány u všech skupin, kromě skupiny MCL. Znak CD23 není na této hladině v kostní dřevě exprimován pouze u CLL, stejně jako není u CLL exprimován v PK. Znak LAIR1 je exprimován u všech skupin kromě FL, znak CD103 je exprimován pouze skupinou ostatní B-lymfoproliferace, stejně jako v PK. Znak CD11c je exprimován všemi skupinami, kromě MCL a FL, je zde patrný rozdíl proti periferní krvi, kde je na této hladině exprimován pouze skupinou CLL. Znak CD200 je v 1-49 % exprimován v kostní dřevě skupinou MCL (shoda s PK). Znak CD27 je v kostní dřevě exprimován v 1-49 % skupinou B-NHL NOS a FL, stejně jako znak CD31. Znak CD43 je u 1-49 % vzorků KD exprimován u MCL a B-NHL NOS, znak CD5 je exprimován u B-NHL NOS a u skupiny ostatní, u obou znaků je shodná exprese s PK. Znak CD79b je exprimován



u 1-49 % vzorků CLL (shoda s PK). Znak IgM je exprimován všemi skupinami kromě MCL a B-NHL NOS, shoda s PK. Znaky CD39, CD49d a CD95 jsou na této hladině exprimovány pouze skupinou FL.

Tabulka č. 10: Srovnání skupin periferní krev – 50-79% výskyt znaků

Pozitivní znaky (50-79 %)	CLL	MCL	B-NHL NOS	Ostatní
CD11c				*
CD200			*	*
CD27	*			*
CD31		*		*
CD38		*		
CD39	*		*	*
CD49d	*			
CD79b				*
CD81	*			
IgM		*	*	
LAIR1				*
LC KAPPA	*			*
LC LAMBDA		*	*	

Zdroj: Vlastní zpracování autorky

U všech skupin onemocnění kromě MCL je u 50-79 % vzorků PK exprimován znak CD39. Znak CD200 je na této hladině exprimován u B-NHL NOS a skupiny ostatní. U 50-79 % vzorků periferní krve jsou exprimovány znaky CD11c, CD79b, LAIR1 pouze u skupiny ostatní, stejně jako znaky CD49d a CD81 u skupiny CLL a znak CD38 u MCL. U skupiny MCL a B-NHL NOS jsou v PK exprimovány v 50-79 % IgM a LC LAMBDA, u skupiny CLL a ostatní jsou exprimovány LC KAPPA, stejně jako znak CD27. Znak CD31 je pozitivní v hladině 50-79 % u skupiny MCL a ostatní.

Tabulka č. 11: Srovnání skupin kostní dřevě – 50-79% výskyt znaků

Pozitivní znaky (50-79 %)	CLL	MCL	B-NHL NOS	FL	Ostatní
CD200			*	*	*
CD27	*	*			*
CD31	*	*			*
CD38		*			
CD39	*	*	*		
CD49d	*				
CD81	*				
CD95					*
HLA-DR		*	*		*
IgM		*	*		
LC KAPPA	*	*	*	*	*

Zdroj: Vlastní zpracování autorky

Vzorky v kostní dřevě exprimují v 50-79 % znak LC KAPPA ve všech skupinách, rozdíl oproti PK. Znak CD200 je exprimován v 50-79 % u B-NHL NOS, FL a u skupiny ostatní, což odpovídá výsledkům periferní krve. Znak CD27 je v tomto rozmezí exprimován skupinami CLL, MCL a skupinou ostatní, kromě skupiny MCL je shoda s PK. Znaky CD31 a CD39 jsou exprimovány shodně v hladině 50-79 % u CLL a MCL. Znak CD31 je exprimován i u skupiny ostatní a znak CD39 u skupiny B-NHL NOS. Znaky CD49d a CD81 jsou v kostní dřevě s četností 50-79 % exprimovány pouze u CLL, stejně jako znak CD38 u MCL. Exprese je shodná s PK. Znak CD95 je exprimován v 50-79 % pouze u skupiny ostatní B-lymfoproliferace, v PK není na této hladině znak exprimován. Znak HLA-DR v 50-79 % exprimují vzorky skupin MCL, B-NHL NOS a ostatní B-lymfoproliferace. Znak IgM je na této hladině exprimován u MCL a B-NHL NOS (shoda s PK).

## **5 Diskuse**

Podle získaných dat exprimují buňky chronické lymfocytární leukemie následující znaky CD45, CD19, CD20, CD22, HLA-DR, CXCR5, CD23, CD200, CD43 a CD5. U všech vzorků v PK i KD byly shodně exprimovány znaky CD45 a CD5, ostatní znaky se lišily v četnosti exprese mezi PK a KD, ale všechny byly exprimovány u 80-100 % vzorků. Znak CD200 byl exprimován v PK u 100 % a v KD u 95 % vzorků. Výsledky jednoznačně dokazují, že znak CD200 je u CLL konzistentně exprimován viz (Sandes et al., 2013, Gajendra et al., 2015), jedná se o znak pomáhající odlišit především CLL od MCL. Znak CD31 byl v PK exprimován u 82 % vzorků a v kostní dřeni u 76 % vzorků, dá se považovat za znak, který CLL buňky exprimují variabilně. Další znaky, které byly exprimovány u více jak poloviny vzorků CLL v PK i KD jsou CD27, CD81, CD49d a CD39, dle měření buňky CLL exprimují spíše LC KAPPA. Ostatní znaky byly exprimovány u méně než 50 % vzorků. Buňky s fenotypem CLL neexprimují znaky CD10, CD103 a CD95 (shoda v PK i KD). V prokázané expresi znaků CD5, CD23 je shoda s Kačírková et al., 2007, Adam et al., 2008, Parikh et al., 2013, Gajendra et al., 2015. U exprese znaku CD43 je shoda s Kačírkovou et al., 2007, stejně jako v negativní expresi znaku CD10 a CD103, shoda také s Gajendra et al., 2015.

Dle výsledků měření buňky lymfomu z plášťové zóny exprimují znaky CD45, CD19, CD20, CD22, CXCR5, CD5, CD79b, CD81 a CD49d, stejně tak exprimují i znak HLA-DR, v periferní krvi u 80 % vzorků a v kostní dřeni u 79 % vzorků. U všech vzorků v PK i KD je společná exprese znaků CD45, CD19, CD22, CD79b a CD5. Expresí lehkých řetězců není z naměřených dat jednoznačná, protože v PK exprimovaly buňky MCL spíše LC LAMBDA (60 %) a v KD spíše LC KAPPA (57 %). Další znaky, které byly exprimovány v PK i KD u více než 50 % vzorků, byly znaky CD31, CD38 a IgM. Zajímavým rozdílem je exprese znaku CD27 a CD39, v periferní krvi exprimovány u 30 % a 40 % vzorků, nicméně v kostní dřeni exprimovány mnohem více u 57 % a 64 % vzorků. Ostatní znaky byly exprimovány u MCL u méně než 50 % vzorků v PK i KD. Znak CD200 byl exprimován u 10 % vzorků v PK a u 7 % vzorků v KD, což potvrzuje výše zmíněné tvrzení. U Chovancové et al., 2015 buňky MCL neexprimují znaky CD200 a CD62L. Znak CD43 byl v PK exprimován u 40 % vzorků a v KD u 43 % vzorků. Buňky MCL neexprimují znaky CD10 (shoda Rahman et al., 2012, Choukri et al., 2013), CD11c, CD103, CD95, u všech znaků je shoda v PK i KD.

Znak CD23 v PK buňky MCL neexprimovaly, shoda s Adam et al., 2008, Rahman et al., 2012, Choukri et al., 2013 a Chovancová et al., 2015, kde je uváděn znak CD23 u MCL jako negativní. V KD je exprese znaku CD23 u 14 % zařazených vzorků. Znak CD62L nebyl exprimován u buněk MCL v kostní dřeni a v PK byl exprimován u 10 % vzorků. Exprese znaků CD79b, CD22, CD5 je shodná s Kačírková et al., 2007, Adam et al., 2008, Choukri et al., 2013. Exprese znaku CD38 a CD103 je shodná s Kačírková et al., 2007, u exprese znaku CD11c je shoda s Marinov, 2008, Adam et al., 2008. Exprese znaku CD43 je odlišná od Kačírková et al., 2007, Rahman et al., 2012, z naměřených dat není znak CD43 příliš typický pro MCL (exprese znaků pod 50%).

Buňky B non-hodgkinských lymfomů bez specifického fenotypu exprimují znaky CD45, CD19, CD20, CD22, CXCR5, CD79b, CD81, CD49d a znak HLA-DR, který byl exprimován v PK u 92 % vzorků a v KD u 65 %. U všech vzorků v PK i KD byly shodně exprimovány znaky CD45, CD19, CD20 a CD22. Výrazný rozdíl v expresi mezi vzorky PK a KD je vidět u znaku CD31, který je v PK exprimován u 83 % vzorků a v KD u zhruba 48 %. Exprese lehkých řetězců není stejně charakteristická jako u MCL. Je zjevná rozdílnost mezi PK a KD. Znaky, které se shodně vyskytují jak v PK, tak v KD u více jak 50 % vzorků jsou CD200, CD39 a IgM. Ostatní znaky jako např. znak CD43, CD5, CD62L a CD23 se vyskytovaly u B-NHL NOS méně než u 50 % vzorků. U znaků CD10, CD95, CD11c a CD38 byla rozdílná exprese v PK a KD, nicméně znaky byly exprimovány maximálně u 26 % vzorků. V PK i v KD nebyl u vzorků B-NHL NOS exprimován znak CD103.

Vzorky skupiny ostatní B lymfoproliferace exprimovaly shodně v PK i KD znaky CD45, CD19, CD20, CD22, CXCR5, CD43, CD81 a CD49d. Znak HLA-DR byl exprimován v PK u 91 % vzorků a v KD u 63 % vzorků. Znaky CD45, CD19, CD20, CD22, CXCR5 a CD49d jsou exprimovány u všech vzorků v PK i KD. Buňky ostatních B lymfoproliferací exprimují i znaky CD79b, CD39, CD200, CD27 a CD31. Exprese lehkých řetězců je spíše LC KAPPA. Znaky, které jsou exprimovány u jednotlivých fenotypů onemocnění, ale v celku nejsou exprimovány u více než 50% vzorků, jsou: CD5, IgM, CD103, CD62L, CD38, CD23, CD11c, LAIR1, CD95 a CD10.

Fenotyp folikulárního lymfomu byl stanoven pouze u vzorků kostní dřeně, jelikož v periferní krvi byl pouze 1 vzorek s tímto onemocněním. Vzorky exprimují znaky CD45, CD19, CD20, CD22, HLA-DR, CXCR5, CD79b, CD81 a CD10. U exprese znaku CD10 je shoda s Kačírková et al., 2007, Adam et al., 2008, Shih et al., 2013, Olteanu et al., 2011, u exprese znaku CD79b je také shoda s Kačírková et al., 2007. Kromě znaků HLA-DR a CD79b, které byly shodně exprimovány u 89 % vzorků, byly ostatní zmíněné znaky exprimovány u všech vzorků. U vzorků převažuje exprese LC KAPPA. Znak CD200 byl exprimován u 56 % vzorků. Ostatní znaky byly exprimovány u méně než poloviny vzorků. Buňky folikulárního lymfomu neexprimují znaky CD43, CD11c, CD103, LAIR1 a CD5. U znaků CD5 (shoda s Shih et al., 2013, Olteanu et al., 2011) a CD43 je možné nalézt shodu s Marinov, 2008 a u znaku CD103 s Kačírková et al., 2007, u znaku CD11c je shoda s Adam et al., 2008.

Znak CD45 se vyskytuje u všech onemocnění, jelikož se jedná o tzv. panleukocytární znak. Znaky CD19, CD20 a CD22 se vyskytují u všech klasifikovaných skupin měření, protože se jedná o znaky charakteristické pro B-lymfocyty (B-lymfoidní diferenciaci) stejně jako znak CXCR5 (Internet 7, Henneken et al., 2005), HLA-DR (Marinov, 2008) a CD79b (Marinov, 2008). Znak CD81 se podílí na vývoji buněk, aktivaci, růstu a motilitě (Internet 8) společně se znakem CD49d nejsou specifickými znaky pro dané onemocnění, ale spíše se budou vyskytovat v různé míře exprese u různých onemocnění. Zajímavým faktem je, že atypická CLL exprimuje tyto dva znaky (CD81 a CD49d) ve 100 %, pozitivita znaků u 4 vzorků. Znaky CD81 a CD49d by mohly sloužit k odlišení mezi formami CLL, protože exprese u CLL v PK a KD byla pod 70 % vzorků. Ostatní skupiny onemocnění exprimují tyto znaky v 80-100 % v PK i KD, výjimku tvoří vzorky FL v KD, které exprimují znak CD49d u 33% vzorků. Dle Baumann et al., 2015 je exprese znaku CD49d u CLL spojena s agresivitou onemocnění a koreluje s vysoce rizikovou „high risk“ CLL. Exprese znaku CD5 je hlavním znakem odlišující CLL a MCL od ostatních B-lymfoproliferativních onemocnění. Znaky odlišující CLL od MCL jsou dle výsledků měření CD23, CD43, CD79b a nově znak CD200, dle výsledků měření by se mohlo jednat i o znaky CD81 a CD49d, které se u MCL vyskytují u 80-100% vzorků. Společnou expresí CLL a MCL

(mimo zmíněný znak CD5 a znaky charakterizující B-lymfocyty (B-lymfoidní diferenciaci)) je také negativní exprese znaků CD10, CD95 a CD103.

## **6 Závěr**



V práci byla naměřená data v rámci projektu EuroFlow rozdělena dle druhu biologického materiálu na periferní krev a kostní dřeň. U jednotlivých materiálů byly společně vzorky pacientů rozděleny dle fenotypu onemocnění na skupiny: chronická lymfocytární leukemie, lymfom z buněk plášťové zóny, B non-hodgkinský lymfom nespecifického fenotypu, ostatní B-lymfoproliferace (skupina zahrnovala onemocnění, které se vyskytovaly s četností pod 3 vzorky), u kostní dřeně byla navíc dle počtu měření vytvořena samostatná skupina pacientů s folikulárním lymfomem.

Z naměřených dat jsou buňky chronické lymfocytární leukemie CD45+, CD19+, CD20+, CD22+, HLA-DR+, CXCR5+, CD23+, CD200+, CD43+, CD5+, spíše LC KAPPA, CD10-, CD103- a CD95-. Znaky CD31, CD27 a CD39 mohou být u buněk CLL exprimovány, ale z výsledků je patrné, že nejsou exprimovány u vzorků s takovou převahou jako znaky předchozí. Znaky CD5, CD23, CD43 a CD200 jednoznačně určují fenotyp CLL, který je nutné jednoznačně odlišit od lymfomu z buněk plášťové zóny, jelikož tyto buňky jsou také CD5+.

Buňky MCL jsou dále CD45+, CD19+, CD20+, CD22+, CXCR5+, CD79b+, CD81+, CD49d+ a HLA-DR+, bez jednoznačné exprese lehkých řetězců, CD10-, CD95- a CD103-. Znaky CD31, CD38 a IgM mohou buňky MCL také exprimovat. Mimo jasně odlišující znaky od CLL (CD23, CD43 a CD200) je možné považovat dle výsledků měření za odlišující znak i CD79b a s velkou pravděpodobností i znaky CD81 a CD49d. Znaky by mohly sloužit nejenom k odlišení CLL od MCL a dalších B-lymfoproliferativních onemocnění, ale i k odlišení atypické formy CLL. Znaky CD38 a IgM by bylo možné použít také jako odlišující znaky CLL od MCL.

Buňky B non-hodgkinských lymfomů bez specifického fenotypu jsou dle výsledků měření CD45+, CD19+, CD20+, CD22+, CXCR5+, CD79b+, CD81+, CD49d+, HLA-DR+, CD103-, bez jednoznačné exprese LC KAPPA nebo LAMBDA. Exprese lehkých řetězců není stejně, jako u MCL charakteristická. Buňky exprimují také znaky CD200, CD39 a IgM.

Vzorky skupiny ostatní B lymfoproliferace jsou z naměřených dat v PK i KD CD45+, CD19+, CD20+, CD22+, CXCR5+, CD43+, CD81+, CD49d+, HLA-DR+, spíše LC KAPPA. Buňky ostatních B lymfoproliferací mohou exprimovat i znaky CD79b, CD39, CD200, CD27 a CD31.

Buňky folikulárního lymfomu jsou v našem souboru v kostní dřeni CD45+, CD19+, CD20+, CD22+, HLA-DR+, CXCR5+, CD79b+, CD81+, CD10+, spíše LC KAPPA, CD43-, CD11c-, CD103-, LAIR1- a CD5-. Buňky mohou rovněž exprimovat i znak CD200.

Z vyhodnocených dat jsou B-lymfoproliferace jednoznačně fenotypově určovány expresí znaků CD45, CD19, CD20, CD22 a určením klonality (exprese LC KAPPA nebo LC LAMBDA). Ostatní znaky se využívají k určení typu B-lymfoproliferativního onemocnění, dle výsledků měření se jedná především o znaky CD5, CD10, CD23, CD43, CD200, CD103, CD79b, CD38 a IgM. Oproti současnému stavu by se nově mohlo jednat i o znaky CD81 a CD49d. Ostatní znaky je možné označit jako doplňkové, nikoliv jednoznačně určující typ B lymfoproliferativního onemocnění. Zmíněné znaky je bezesporu vhodné zařadit do panelů protilátek pro určení fenotypu lymfomových buněk. V práci nebyla věnována pozornost intenzitě exprese daných znaků, jelikož cílem práce bylo srovnání možnosti exprese jednotlivých znaků u daných skupin onemocnění, nikoliv vyhodnocení míry intenzity exprese u jednotlivých znaků.

## **7 Literatura**

- Adam, Z. et al., *Hematologie Přehled maligních hematologických nemocí*, 2. vyd., Praha: Grada, 2008, s. 392. ISBN 978-80-247-2502-4.
- Bartůňková, J. et al., *Vyšetřovací metody v imunologii*, 1. vyd., Praha: Grada, 2005, s. 176. ISBN 80-247-0691-1.
- Baumann, T. et al., CD49d (ITGA4) expression is a predictor of time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukaemia and mutated IGHV status. *Br J Haematol*, 2015, s. 1-8. DOI: 10.1111/bjh.13788.
- Becton, Dickinson and Company, *BD FACSCanto II Pokyny k použití*, 1. vyd., San Jose: BD Biosciences, 2006, s. 256.
- Cornet, E. et al., Recommendations of the SFH (French Society of Haematology) for the diagnosis, treatment and follow-up of hairy cell leukaemia. *Ann Hematol*, 2014, vol. 93, s. 1977-1983. DOI: 10.1007/s00277-014-2140-y.
- Gajendra, S. et al., Triple cancer: chronic lymphocytic leukemia with bladder and prostate carcinoma. *Malays J Pathol*, 2015, vol. 37, s. 159-163.
- Giaretti, W., Origins of ... Flow cytometry and applications in oncology. *J Clin Pathol*, 1997, vol. 50, s. 275-277.
- Greve, B. et al., Flow Cytometry in Cancer Stem Cell Analysis and Separation. *Cytometry A*, 2012, vol. 81 A, 284-293. DOI: 10.1002/cyto.a.22022.
- Haynes, J. L., Principles of Flow Cytometry. *Cytometry Suppl*, 1988, vol. 3, s. 7-17.
- Henneken, M. et al., Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 2005, vol. 7, s. R1001-R1013. DOI: 10.1186/ar1776.
- Choukri, M. et al., Mantle cell lymphoma diagnosis. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2013, vol. 71, s. 107-112. DOI:10.1684/abc.2012.0782.
- Chovancová, J. et al., Detection of Minimal Residual Disease in Mantle Cell Lymphoma - Establishment of Novel Eight-Color Flow Cytometry Approach. *Cytometry B Clin Cytom*, 2015, vol. 88B, s. 92-100. DOI: 10.1002/cyto.b.21210.
- Internet 1: Ministerstvo Zdravotnictví ČR, Datový standard a Národní číselník laboratorních položek, [online] [citováno 24. 9. 2015], <[http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD\\_DS4/hypertext/AJDJU.htm](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/AJDJU.htm)>.
- Internet 2: Šinkora, J., *Základní principy*, [online] [citováno 24. 9. 2015], <[http://www.csac.cz/own\\_files/file/CSAC2013/Sinkora-Zaklady\\_FCM.pdf](http://www.csac.cz/own_files/file/CSAC2013/Sinkora-Zaklady_FCM.pdf)>.

- Internet 3: HCDM, *Responsible for HLDA Workshops & CD Molecules*, [online] [citováno 24. 9. 2015], <<http://www.hcdm.org>>.
- Internet 4: HCDM, HLDA9 Workshop, *New CD Molecules*, [online] [citováno 24. 9. 2015], <[http://www.hcdm.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=32&Itemid=222](http://www.hcdm.org/index.php?option=com_content&view=article&id=32&Itemid=222)>.
- Internet 5: HCDM, HLDA10 Workshop, *New CD Molecules*, [online] [citováno 24. 9. 2015], <[http://www.hcdm.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=38&Itemid=263](http://www.hcdm.org/index.php?option=com_content&view=article&id=38&Itemid=263)>.
- Internet 6: EuroFlow, *EuroFlow a division of ESLHO*, [online] [citováno 24. 9. 2015], <<http://www.euroflow.org>>.
- Internet 7: GENE, *CXCR5 chemokine (C-X-C motif) receptor 5 [Homo sapiens (human)]*, [online] [citováno 29. 9. 2015], <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/643>>.
- Internet 8: GENE, *CD81 molecule [Homo sapiens (human)]*, [online] [citováno 29. 9. 2015], <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/975>>.
- Kačírková, P. et al., *Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně*, 1. vyd., Praha: Grada, 2007, s. 304. ISBN 978-80-247-1853-8.
- Marinov, I., *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. Praha: Triton, 2008, s. 148. ISBN 978-80-7387-143-7
- Olteanu, H. et al., CD23 Expression in Follicular Lymphoma: Clinicopathologic Correlations. *Am J Clin Pathol*, 2011, vol. 135, s. 46-53. DOI: 10.1309/AJCP27YWLIQRAJPW.
- Parikh, S. A. et al., Monoclonal B-Cell Lymphocytosis: Update on Diagnosis, Clinical Outcome, and Counseling. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2013, vol. 11, s. 720-729.
- Pecka, M. et al., *Praktická hematologie – Laboratorní metody*, 1. vyd., Český Těšín: FINIDR s.r.o., 2010, s. 343. ISBN 978-80-903871-9-5.
- Penka, M. et al., *Hematologie a transfuzní lékařství I*, 1. vyd., Praha: Grada, 2011, s. 424. ISBN 978-80-247-3459-0.
- Rahman, K. et al., Morphological spectrum of leukemic mantle cell lymphoma. *Indian J Pathol Microbiol*, 2012, vol. 55, s. 66-71. DOI: 10.4103/0377-4929.94860.
- Rahman, M., *Introduction to flow cytometry*, 1. vyd. Kidlington: Serotec Ltd., 2005, s. 34.

- Sandes, A. F. et al., CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasmas by multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*, 2013 (online). DOI: 10.1002/cytob.21128.
- Shapiro, H. M., *Practical flow cytometry*, 4. vyd. New Jersey-Hoboken: John Wiley & Sons, 2003, s. 681. ISBN 0-471-41125-6.
- Shapiro, H. M., The evolution of cytometers. *Cytometry A*, 2004, vol. 58A, s. 13-20. DOI: 10.1002/cyto.a.10111.
- Shih, M. C. et al., Automatic B cell lymphoma detection using flow cytometry data. *BMC Genomics*, 2013, vol. 14, s. 1-16. DOI: 10.1186/1471-2164-14-S7-S1.
- Swerdlow, S.H. et al. (editors), *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, 4. vyd., Lyon: IARC (International Agency for Research on Cancer), 2008, s. 439. ISBN 978-92-832-2431-0.
- Šinkorová, Z. et Zárbybnická, L., Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda I. část. *Vojenské zdravotnické listy*, 2008, vol. 77, no. 3, s. 98-103
- Tiacci, E. et al., Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. *Blood.*, 2012, vol. 119, no. 1, s. 192-195. DOI: 10.1182/blood-2011-08-371179.
- Van Dongen, J. J. M. et al., EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.*, 2012, vol. 26, s. 1908-1975. DOI: 10.1038/leu.2012.120.
- Zola, H. et al., CD molecules 2006 – Human cell differentiation molecules. *J Immunol Methods*, 2007, vol. 319, s. 1-5. DOI: 10.1016/j.jim.2006.11.001.

## Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Znárodnění fluidního systému v průtokovém cytometru	18
Obrázek č. 2: Detektorové pole průtokového cytometru obsahujícího 3 lasery	20
Obrázek č. 3: Jednparametrový histogram	21
Obrázek č. 4: Dvoupparametrový „dot plot“	22
Obrázek č. 5: Elektromagnetické spektrum světla	24
Obrázek č. 6: Přehled samostatných fluorochromů	25
Obrázek č. 7: Přehled tandemových fluorochromů	26
Obrázek č. 8: Expese znaků u pacientů s chronickou lymfocytární leukemií v periferní krvi	51
Obrázek č. 9: Expese znaků u pacientů s chronickou lymfocytární leukemií v kostní dřeni	52
Obrázek č. 10: Expese znaků u pacientů s lymfomem z buněk plášťové zóny v periferní krvi	53
Obrázek č. 11: Expese znaků u pacientů s lymfomem z buněk plášťové zóny v kostní dřeni	54
Obrázek č. 12: Expese znaků u pacientů s B non-hodgkinským lymfomem nespecifického fenotypu v periferní krvi	55
Obrázek č. 13: Expese znaků u pacientů s B non-hodgkinským lymfomem nespecifického fenotypu v kostní dřeni	56
Obrázek č. 14: Expese znaků u pacientů s ostatními B lymfoproliferacemi v periferní krvi	57
Obrázek č. 15: Expese znaků u pacientů s ostatními B lymfoproliferacemi v kostní dřeni	58
Obrázek č. 16: Expese znaků u pacientů s folikulárním lymfomem v kostní dřeni	59

## **Seznam tabulek**

Tabulka č. 1: Dělení lymfomů - zralé B buněčné neoplazie	32
Tabulka č. 2: Skórovací systém pro CLL/SLL	34
Tabulka č. 3: Skórovací systém pro HCL	36
Tabulka č. 4: Srovnání skupin periferní krev – 80-100% výskyt znaků	60
Tabulka č. 5: Srovnání skupin kostní dřev – 80-100% výskyt znaků	61
Tabulka č. 6: Srovnání skupin periferní krev – negativita znaků	62
Tabulka č. 7: Srovnání skupin kostní dřev – negativita znaků	62
Tabulka č. 8: Srovnání skupin periferní krev – 1-49% výskyt znaků	63
Tabulka č. 9: Srovnání skupin kostní dřev – 1-49% výskyt znaků	64
Tabulka č. 10: Srovnání skupin periferní krev – 50-79% výskyt znaků	65
Tabulka č. 11: Srovnání skupin kostní dřev – 50-79% výskyt znaků	66