

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

Hodgkinův lymfom a jeho diagnostika

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Jan Galko

Hradec Králové 2018

Kamila Gabriel

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne 26. 3. 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala MUDr. Janu Galkovi za připomínky, trpělivost a rady, které mi po celou dobu spolupráce poskytoval, a za pomoc při elektronickém zpracování podkladů pro tuto práci. Zároveň bych také ráda poděkovala kolegyním, které mi vycházely vstříc, a rodině, která mi byla oporou v průběhu celého studia.

Abstrakt

V roce 2015 byly v České republice hlášeny téměř 3 tisíce nových případů lymfomů a leukémií a 1751 osob na tato onemocnění zemřelo. Z toho 277 hlášených případů (9 %) a 60 úmrtí (3,5 %) připadlo na skupinu Hodgkinových lymfomů (HL).

U Hodgkinových lymfomů, na rozdíl od většiny ostatních lymfomů, nádorové buňky představují pouze malou část z celkové populace postižené tkáně. Rozlišujeme dvě velké skupiny HL: klasický Hodgkinův lymfom (CHL), který se dále dělí na čtyři podtypy, a nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů (NLPHL).

CHL postihuje nejčastěji krční lymfatické uzliny mladých dospělých a může se šířit do dalších lokalit. Jde o onemocnění s velmi dobrou prognózou: pomocí radioterapie a kombinované chemoterapie se dnes podaří vyléčit 80-90 % pacientů, avšak tito mají významně zvýšené riziko sekundárních malignit.

NLPHL představuje asi 5 % HL a objevuje se nejčastěji ve čtvrté dekádě života v krčních a axilárních uzlinách. Obvykle pomalu progreduje a výborně reaguje na terapii, a to i v případě relapsů, které nejsou vzácné.

Při podezření na lymfoproliferativní onemocnění je vhodné dodat tkáň do laboratoří oddělení patologie v nativním stavu. Odebraný materiál je zpracován dle definovaných pravidel a po fixaci a prosycení parafínem zalit do parafínu. Ze vzniklých bločků jsou zhotovovány preparáty, které patolog hodnotí.

Velký význam v diagnostice nádorů má imunohistochemie (IHC), která se zabývá detekcí antigenů in situ pomocí specifických primárních protilátek. Díky této metodě je možné stanovit diagnózu velkého množství nádorů a pomoci tak zahájit cílenou terapii, která může zachránit život nebo jej prodloužit i o několik let.

Klíčová slova: Hodgkinův lymfom, histologické zpracování materiálu, imunohistochemie

Abstract

In 2015, almost three thousands of new cases of leukemias and lymphomas were reported and 1751 patients died from these cancers in the Czech Republic. Out of these, 277 cases (9 %) and 60 deaths (3.5 %) were related to Hodgkin's lymphoma (HL).

In Hodgkin's lymphoma the tumor cells comprise only a small minority of the involved tissue. Two distinct groups of HL are recognized: Classical Hodgkin's Lymphoma (CHL), further divided into four subtypes, and Nodular Lymphocyte-Predominant Hodgkin's Lymphoma (NLPHL).

CHL affects primarily cervical lymph nodes of young adults and may spread to other sites. The prognosis is very good with 80-90 % of patients being cured by radiotherapy and multiagent chemotherapy. However, these patients are at a significant risk of secondary malignancies.

NLPHL, which constitutes about 5 % of HL, affects primarily cervical and axillary lymph nodes of patients between 30 and 40 years of age. Usually, the progression is slow, and the tumor shows excellent sensitivity to therapy.

When a suspicion of lymphoproliferative disease arises, it is recommended to deliver the involved tissue to the pathology department in a native state. There are established guidelines for the processing of the excised material. The final products are represented by histological slides, which are then evaluated by a specialized pathologist.

A very important method in the diagnosis of tumors is immunohistochemistry (IHC) , a method based on the detection of antigens in situ by specific primary antibodies. Owing to this method, it is possible to diagnose a large number of cancers and to apply targeted therapy that can save the life of a patient, or at least prolong it by several years.

Key words: Hodgkin's Lymphoma, histological processing of tissue, immunohistochemistry

1. Úvod	7
2. Literární přehled	8
2.1 Funkce lymfatické tkáně	8
2.2 Morfologie lymfatické tkáně	8
2.3 Klasifikace Hodgkinových lymfomů	9
2.3.1 Klasický Hodgkinův lymfom (CHL)	9
2.3.1.1 Klasifikace klasického Hodgkinova lymfomu	9
2.3.1.2 Epidemiologie	10
2.3.1.3 Etiologie	10
2.3.1.4 Klinický obraz	11
2.3.1.5 Laboratorní nálezy	11
2.3.1.6 Staging	12
2.3.1.7 Prognóza	12
2.3.1.8 Morfologie a podtypy klasického Hodgkinova lymfomu	12
2.3.1.8.1 Podtyp nodulární sklerózy	13
2.3.1.8.2 Podtyp smíšené celularity	15
2.3.1.8.3 Podtyp bohatý na lymfocyty	15
2.3.1.8.4 Podtyp s deplecí lymfocytů	16
2.3.1.9 Imunofenotypizace klasického Hodgkinova lymfomu	16
2.3.2 Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů (NLPHL)	17
2.3.2.1 Epidemiologie	17
2.3.2.2 Klinický obraz	18
2.3.2.3 Prognóza	19
2.3.2.4 Morfologie NLPHL	19
2.3.2.5 Imunofenotypizace NLPHL	20
3. Cíl práce	22
4. Metody a zpracování bioptického materiálu	23
4.1 Odběr a příjem lymfatické uzliny pro histologickou diagnostiku	23
4.2 Proces zpracování v bioptické laboratoři	23
4.2.1 Příjem	23
4.2.2 Zpracování nativní tkáně patologem	23
4.2.3 Fixace a prosycování	24
4.2.4 Zpracování prosycené tkáně	24
4.3 Imunohistochemické vyšetření	25
4.3.1 Protilátka	25
4.3.2 Antigen	25

4.3.3	Metody imunohistochemie	25
4.3.3.1	Přímá metoda	25
4.3.3.2	Nepřímá dvoustupňová „sendvičová“ metoda	26
4.3.3.3	Nepřímá třístupňová metoda	26
4.3.4	Postup imunohistochemie	26
4.3.4.1	Krájení	26
4.3.4.2	Napínání na podložní skla	26
4.3.4.3	Deparafinace a odhalování antigenů	26
4.3.4.4	Blokování endogenních enzymů	27
4.3.4.5	Aplikace primární a sekundární protilátky	27
4.3.4.6	Strojové zpracování	27
5.	Výsledky	29
6.	Diskuze	38
7.	Závěr	40
8.	Zkratky	41
9.	Seznam literatury	43
10.	Seznam grafů a obrázků	45

1. Úvod

V roce 2012 bylo dle Světové zdravotnické organizace diagnostikováno cca 14 milionů nových případů zhoubných nádorů a téměř 8,2 milionů pacientů na následky těchto onemocnění zemřelo.

V roce 2015 bylo dle údajů z ÚZIS v České republice hlášeno asi 58 tisíc nových případů (bez diagnózy C44, tj. jiný zhoubný novotvar kůže), to odpovídá incidenci 554/100 000 obyvatel. K nejčastějším zhoubným novotvarům patří karcinomy tlustého střeva, prostaty, prsu a plic. Lymfomů a leukémií byly hlášeny téměř 3 tisíce případů, z toho 277 (9 %) Hodgkinových lymfomů (HL). Na nádorová onemocnění zemřelo téměř 27 tisíc osob (26,5 % všech úmrtí), z toho 1751 na následky lymfomů a leukémií, mezi nimiž 60 úmrtí (3,5 %) připadlo na Hodgkinův lymfom. (ÚZIS, 2015)

Hodgkinovu chorobu poprvé popsal anglický lékař a vynikající patolog Thomas Hodgkin (1798–1866) v roce 1832. Hodgkin vyučoval na univerzitě v Edinburghu a byl spolupracovníkem významných lékařů Richarda Brighta a Thomase Addisona v Londýně. Jeho úspěchy v oblasti patologie zahrnují také jeden z prvních popisů aortální nedostatečnosti (1827). (Encyclopaedia Britannica, 2015)

Thomas Hodgkin považoval onemocnění spíše za hypertrofii lymfatického systému než za zhoubné bujení. Na přelomu století identifikovali rakouský patolog Carl Sternberg a americká patoložka Dorothy Reedová v uzlinách nemocných charakteristické buňky (buňky Reedové-Sternbergovy). Carl Sternberg považoval onemocnění za určitou formu tuberkulózy, Dorothy Reedová rovněž spíše za zánětlivý proces než za malignitu. Na počátku dvacátého století některé práce uváděly jako původce onemocnění bakterie (např. *Bacillus Hodgkini*, *Corynebacterium granulomatis maligni*). Průkaz viru Epstein-Barré (EBV) v Burkittově lymfomu vedl četné výzkumné týmy k názoru, že tento virus hraje významnou roli i u Hodgkinova lymfomu. Celé generace vědeckých pracovníků tedy věřily, že HL je způsoben infekčním agens. (Zdraví a medicína, 2000)

Nádorový charakter HL byl zvažován již ve 40. letech 20. století, avšak potvrzen až v 60. a 70. letech na základě cytogenetických vyšetření a ověření klonality procesu. (LAKHTAKIA Ritu, 2015)

2. Literární přehled

2.1 Funkce lymfatické tkáně

Lymfatické uzliny jsou orgány kulovitého či ledvinovitého tvaru, tvořené lymfatickou tkání a opatřené pouzdrem. Jsou rozesety téměř po celém těle v průběhu lymfatických cév. Lymfatické uzliny vytvářejí série za sebou propojených filtrů, které hrají zásadní roli v obraně organismu proti mikrobům a nádorovým buňkám. (L. Carlos Junqueira, 1997)

2.2 Morfologie lymfatické tkáně

Lymfatické uzliny jsou na jedné straně konvexní a na protilehlé straně opatřeny vkleslinou, hilem, jehož cestou do orgánu vstupují artérie, nervy a opouštějí jej vény. Tvar a vnitřní uspořádání uzlin se různí, avšak u všech je zachován základní vzor. Vazivové pouzdro, které uzliny obaluje, vysílá do nitra trabekuly. Uzlina se skládá ze zevní a vnitřní korové oblasti a z dřene. Mezi pouzdrem a zevní korovou oblastí je vytvořen subkapsulární sinus (splav), který je propojen se sinusy dřene prostřednictvím intermediálních sinusů, jež probíhají rovnoběžně s vazivovými trabekulami pouzdra. Zevní korová oblast obsahuje řídkou síť retikulárních buněk, vláken a makrofágů. Vnitřní korovou oblast tvoří lymfoidní tkáň sestávající ze sítě retikulárních buněk a vláken, která je osídlena lymfoidními elementy. (L. Carlos Junqueira, 1997)

Dřeň se skládá z dřevných provazců, rozvětvených výběžků lymfoidní tkáně vnitřní korové oblasti, jež jsou odděleny rozšířenými strukturami podobnými kapilárám, které se nazývají dřevné lymfoidní sinusy. Jsou to nepravidelné prostory obsahující lymfu. Stejně jako subkapsulární a intermediální sinusy jsou zčásti lemovány retikulárními buňkami a makrofágy. Retikulární buňky a vlákna často přemostují sinus a vytvářejí řídkou síťovinu. Velké rozvětvené folikulární dendritické buňky, které se v lymfatických uzlinách nacházejí, plní funkci elementů prezentujících antigen. (L. Carlos Junqueira, 1997)

Aferentní lymfatické cévy procházejí pouzdrem lymfatických uzlin a přivádějí lymfu do subkapsulárního sinu. Odtud se lymfa dostává přes intermediální sinusy do nitra uzliny, kde se vylévá do dřevných sinusů. Složitá architektura sinusů zpomaluje tok lymfy, což usnadňuje zachytávání a trávení cizorodých materiálů makrofágy. Lymfa též infiltruje

lymfoidní tkáň, zvolna postupuje z kůry do dřene a sbírá se do eferentních lymfatických cév v hilu uzliny. (L. Carlos Junqueira, 1997)

Na základě morfologických rysů se v lymfatické uzlině rozlišují primární nebo sekundární uzlíky (folikuly). Primární uzlíky jsou sférické nakupeniny lymfocytů bez zřetelně vyznačené centrální oblasti. Takovéto uzlíky se vyskytují v uzlinách, které ještě nebyly vystaveny antigenům. Sekundární uzlíky se od primárních liší centrální projasněnou zónou – germinálním centrem. Germinální centrum představuje shluk aktivovaných B lymfocytů s objemnou cytoplazmou, které se objevují v reakci na antigenní stimul, jenž vyvolá jejich proliferaci (L. Carlos Junqueira, 1997).

2.3 Klasifikace Hodgkinových lymfomů

Rozlišujeme dvě velké skupiny Hodgkinových lymfomů (HL): klasický Hodgkinův lymfom (CHL), který se dále dělí na čtyři podtypy, a nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů (NLPHL).

2.3.1 Klasický Hodgkinův lymfom (CHL)

Klasický Hodgkinův lymfom je klonální maligní lymfoproliferace vycházející z B lymfocytů germinálního centra. Na rozdíl od ostatních lymfomů nádorové buňky představují malou část (0,1-2 %) z celkové populace postižené tkáně. Histopatologická diagnóza je založena na identifikaci buněk Reedové a Sternberga (RS), které se nacházejí na nenádorovém zánětlivém pozadí. Ačkoli mnoho případů by mohlo být diagnostikováno na základě morfologie nádorových buněk, kritéria diagnózy zahrnují i jejich imunofenotypizaci. RS buňky ve většině případů exprimují antigeny CD30 a CD15, přičemž postrádají společný leukocytární antigen (LCA, CD45). (Bräuninger, 2006)

2.3.1.1 Klasifikace klasického Hodgkinova lymfomu (Swerdlow, 2017)

- a) podtyp bohatý na lymfocyty
- b) podtyp nodulární sklerózy
- c) podtyp smíšené buněčnosti
- d) podtyp s deplecí lymfocytů

2.3.1.2 Epidemiologie

Hodgkinovy lymfomy představují 15-25 % ze všech maligních lymfomů. Přibližně 95 % případů spadá do kategorie CHL a zbylé případy do NLPHL. V České republice se ročně diagnostikují 2-3 noví pacienti s HL na 100 000 obyvatel. Výskyt Hodgkinova lymfomu je vyšší ve vyspělejších zemích než v zemích rozvojových.

Klasický Hodgkinův lymfom má dva věkové vrcholy výskytu: nejčastěji se objevuje u mladých dospělých mezi 15. a 35. rokem života, druhý vrchol je u osob starších 55 let. U dětí je CHL velmi vzácný, zvláště u dětí mladších tří let. Celkový poměr mužů k ženám je přibližně 1,5:1 a distribuce histologických podtypů se mění s věkem. Často byly popisovány případy rodinného výskytu HL a sourozenci pacientů s HL mají středně zvýšené riziko vzniku onemocnění.

Zatímco subtyp nodulární sklerózy převládá u mladých dospělých, zvláště u žen, je u dětí a starších pacientů vyšší podíl subtypu smíšené buněčnosti. Rozvojové země vykazují odlišný epidemiologický vzorec: první vrchol výskytu je v dětském věku s převahou podtypu smíšené buněčnosti a chybí vrchol v rané dospělosti. (Thomas, 2002)

2.3.1.3 Etiologie

Příčina CHL není stále známá, ale kvůli epidemiologickým a klinickým rysům onemocnění je již dlouho podezření na infekční agens. Detekce viru Ebsteina-Barrové (EBV) v neoplastických buňkách významné části CHL potvrdila jeho zapojení, nicméně jak ukazují EBV-negativní případy, není tento virus pro rozvoj nemoci zcela klíčový a pravděpodobně představuje pouze kofaktor v pozitivních případech. EBV je nejčastěji zjištěn u CHL u dětí a starších dospělých a v souvislosti s infekcí virem lidské imunodeficiencie (HIV). Frekvence asociace EBV a CHL u imunokompetentních pacientů závisí na histologickém podtypu, věku v době diagnózy, geografickém a etnickém původu a socioekonomických faktorech. V CHL podtypu smíšené buněčnosti se EBV prokáže v přibližně 75 % případů, zatímco podtyp nodulární sklerózy je EBV-pozitivní v 10-25 %. (Glaser, 1997)

2.3.1.4 Klinický obraz

Klinicky se CHL projeví asi v 90 % případů nejprve v lymfatických uzlinách, obvykle jako pomalu rostoucí, nebolestivá masa. Nejčastěji jsou postiženy uzliny krční (75 %), axilární a inguinální. U asymptomatických pacientů je onemocnění často zachyceno jako rozšíření mediastina na rutinním rentgenovém snímku. Mohou se objevit příznaky spojené s postižením specifických orgánů, jako je syndrom horní duté žíly, bolest kostí nebo neurologické příznaky. Retroperitoneální lymfadenopatie a postižení sleziny jsou časté, zatímco axilární lymfatické uzliny bývají ušetřeny. Infiltrace kostní dřeně je u CHL relativně vzácná, vyskytuje se přibližně u 5 % imunokompetentních pacientů.

Ačkoli CHL se téměř vždy vyskytuje v uzlinách, může v průběhu onemocnění zasáhnout prakticky jakoukoli část těla. V pokročilém stadiu se nádor často šíří do sleziny, kostní dřeně a jater, izolované postižení těchto orgánů je však vzácné. Infiltrace thymu je častá u mediastinálního onemocnění.

Přibližně 30-40 % pacientů s CHL má B symptomy (označení pro systémové příznaky dle stagingového systému Ann Arbor), tj. hmotnostní úbytek, noční pocení, teploty. Přestože jsou B symptomy častější v pokročilých stádiích onemocnění, mohou se vyskytnout také na počátku, pravděpodobně vlivem zánětlivých cytokinů produkovaných nádorem. (Colby, 1982)

2.3.1.5 Laboratorní nálezy

Laboratorní nálezy jsou většinou nespecifické a zahrnují leukocytózu, zvýšenou sedimentaci erytrocytů a zvýšenou koncentraci laktátdehydrogenázy. Eozinofilii lze pozorovat u přibližně 20 % pacientů a lymfopenie je přítomna v pokročilých stádiích onemocnění. Většina pacientů s CHL vykazuje defekty v buněčně zprostředkované imunitě bez ohledu na onemocnění. Klinicky se tato anergie může projevit jako zvýšená náchylnost k infekcím. Stále není jasné, zda tyto imunitní abnormality předcházejí onemocnění a mohou přispívat k jeho rozvoji, nebo jsou sekundárními jevy, pravděpodobně v důsledku imunosupresivních cytokinů vylučovaných nádorovou populací. (Poppema, 1999)

2.3.1.6 Staging

Stagingové klasifikační systémy poskytují důležité prognostické informace a tvoří základ pro některá léčebná rozhodnutí. Přesnost stagingu v CHL se opírá o skutečnost, že HL se šíří vysoce předvídatelným způsobem lymfatickými cestami. Kromě podrobné klinické anamnézy, fyzikálního vyšetření a laboratorních metod vyžaduje staging HL podrobné vyšetření zobrazovacími metodami, včetně RTG hrudníku a počítačové tomografie (CT) hrudní a břišní dutiny. (Ansell, 2016)

2.3.1.7 Prognóza

Klinický průběh a prognóza CHL se od zavedení radioterapie a kombinované chemoterapie dramaticky změnila. Dnes se podaří vyléčit 80-90 % pacientů. CHL je mimořádně citlivý na radioterapii a úplné remise lze dosáhnout mírnými dávkami u většiny pacientů s onemocněním v raném stadiu. V poslední době se však preferuje kombinace radioterapie s chemoterapií, případně samotná chemoterapie. Důvodem je snaha vyhnout se pozdním komplikacím radioterapie. (Canellos, 2014)

Ačkoli je úspěšnost léčby CHL vysoká, pacienti mají významně zvýšené riziko sekundárních nádorových onemocnění, která jsou hlavní příčinou úmrtí u dlouhodobě přežívajících. Nejčastěji se setkáváme s běžnými solidními nádory, jako je karcinom tlustého střeva, prsu a plic, ovšem nejvíce stoupá incidence nelymfocytických leukémií. Mezi sekundárními non-Hodgkinskými lymfomy (NHL) po CHL je nejčastější difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL), často v extranodálních lokalitách. Obecně je prognóza sekundárních malignit špatná. (Arber, 2017)

2.3.1.8 Morfologie a podtypy klasického Hodgkinova lymfomu

Diagnostickými buňkami CHL jsou buňky Reedové-Sternbergovy (RS buňky). Klasické RS buňky jsou velké až 100 μm a obsahují dvě či více jader, případně jedno velké laločnaté, které v řezu imponuje jako jádra vícečetná. Jádra mají nápadnou jadernou membránu, světlý chromatin a jedno velké eosinofilní jádérko připomínající virovou inkluzi. Cytoplazma je bohatá a amfofilní. Jednojaderné nádorové buňky se nazývají Hodgkinovy buňky. V mnoha případech klasické RS buňky představují jen menšinu nádorové populace. Často můžeme pozorovat degenerované RS a Hodgkinovy buňky s tmavě se barvící kondenzovanou cytoplazmou a kondenzovaným jaderným chromatinem, tzv. mumifikované buňky. Podobné

buňky jako u Hodgkinova lymfomu lze nalézt i u jiných onemocnění, tudíž jejich přítomnost nedostačuje pro stanovení diagnózy tohoto nádoru.

Typické buňky podtypu nodulární sklerózy jsou lakunární buňky, které mají bohatou světlou až lehce eosinofilní cytoplazmu a dobře patrné buněčné hranice. Jádra jsou obvykle více laločnatá, s hrubým chromatinem a jádérky menšími než u Hodgkinových a RS buněk. V důsledku fixace je cytoplazma v perinukleární oblasti kondenzovaná a paprskovitě vybíhá k buněčné membráně, čím vytváří prázdné prostory podobné lakunám.

Na základě morfolgie nádorových buněk, růstové architektiky a charakteru infiltrátu na pozadí, se rozlišují čtyři podtypy CHL. (Swerdlow, 2017)

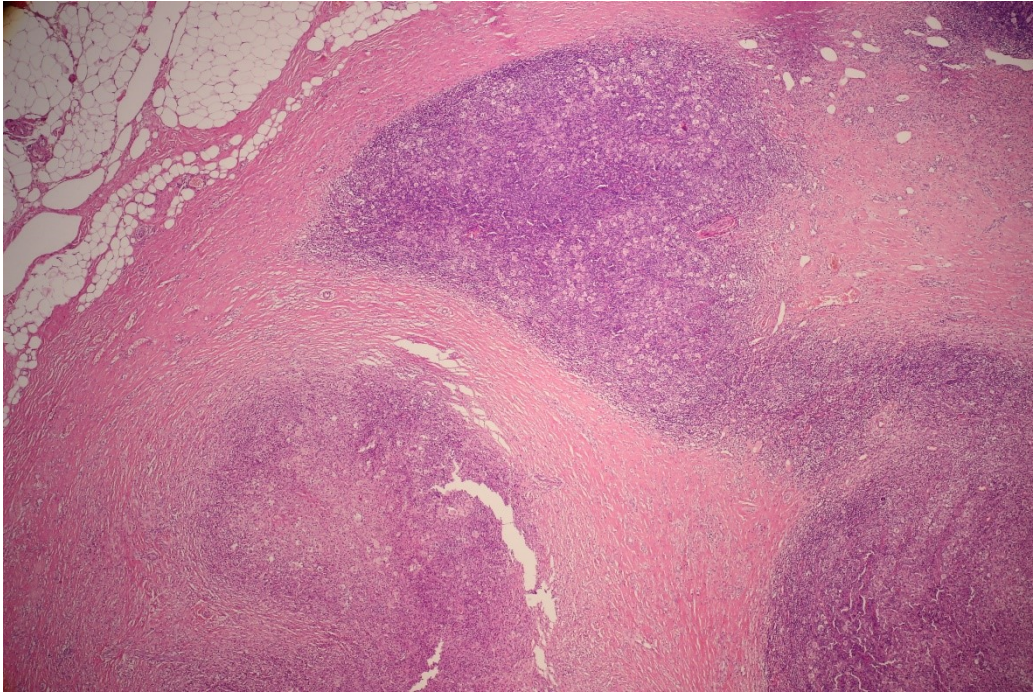
2.3.1.8.1 Podtyp nodulární sklerózy

Jedná se o nejčastější podtyp CHL, který v západních zemích představuje 50-80 % všech případů. Lymfatická uzlina je tuhé konzistence, na řezu s bělavými či nažloutlými uzly, oddělenými pruhy vaziva. Mikroskopicky jsou uzly velmi buněčné, někdy s nekrózami či abscesy, a oddělené koncentricky uspořádanými kolagenními vlákny. (Arber, 2017)

Přítomnost fibrózy je definujícím znakem tohoto podtypu, avšak její rozsah je velmi variabilní, od nenápadného ztlustění pouzdra lymfatické uzliny po téměř kompletní náhradu parenchymu lymfatické uzliny vazivovou tkání, v níž je jen malé množství nádorových buněk i infiltrátu na pozadí (Obr. 1). To může činit diagnostické problémy, obzvláště v malých vzorcích. (Arber, 2017)

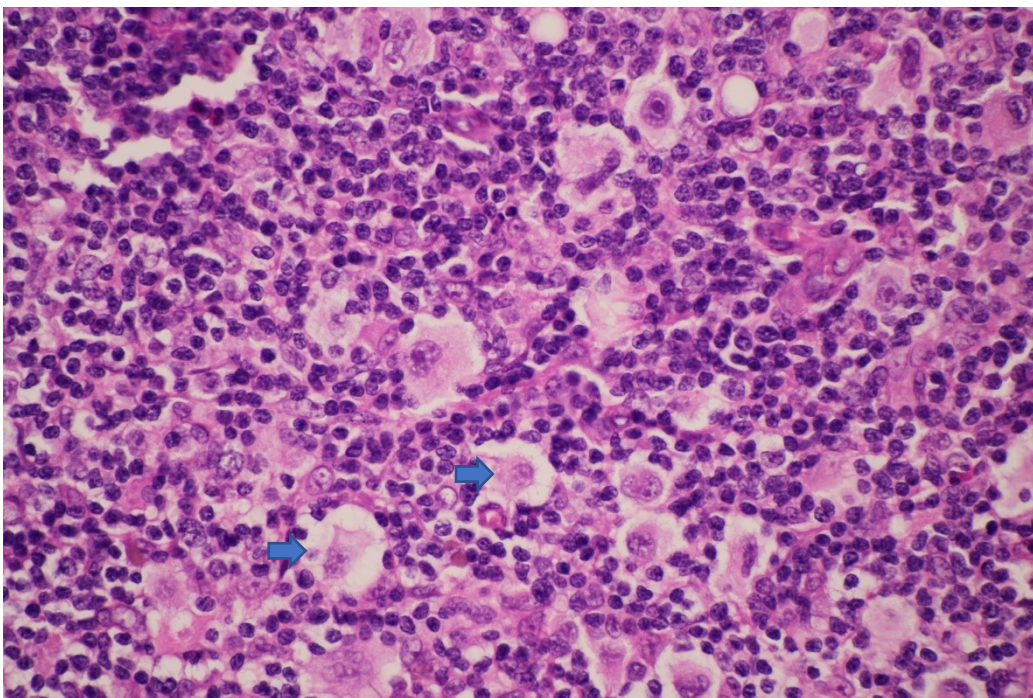
Při velkém zvětšení jsou lakunární buňky dobře rozpoznatelné (Obr. 2., mohou být rozptýlené, případně vytvářet různě velké shluky. Klasické RS buňky jsou u tohoto podtypu méně četné.

Složení reaktivního infiltrátu na pozadí se může lišit případ od případu i v jednotlivých nodulech. Někdy převažují malé lymfocyty, většinou však nacházíme směs lymfocytů, neutrofilů a četných eozinofilů, dále plazmatické buňky a makrofágy. Častá je tvorba eosinofilních či neutrofilních abscesů. (Arber, 2017)



Obrázek 1.: Klasický Hodgkinův lymfom (podtyp nodulární sklerózy). Nádorové uzly jsou oddělené širokými pruhy kolagenního vaziva, patrné je též ztlustělé pouzdro lymfatické uzliny. HE 100x

Zdroj: Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze



Obrázek 2.: Klasický Hodgkinův lymfom (podtyp nodulární sklerózy). Nádorové buňky, některé charakteru lakunárních buněk (označeny šipkou), jsou na pozadí tvořeném převážně malými lymfocyty. HE 600x

Zdroj: Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze

2.3.1.8.2 *Podtyp smíšené celularity*

Jedná se o druhý nejčastější podtyp CHL, který v západních zemích představuje 20-30 % všech případů. Původní struktura lymfatické uzliny je obvykle difúzně setřelá, ačkoliv v časných stádiích může nádor růst v interfolikulární zóně, případně můžeme zastihnout reziduální zárodečná centra. Klasické Hodgkinovy a RS buněk jsou četné a snadno rozpoznatelné, většinou rovnoměrně rozptýlené. (Arber, 2017)

Infiltrát na pozadí sestává z heterogenní populace malých lymfocytů, eozinofilů, plazmatických buněk a histiocytů. Lymfocyty mohou vykazovat určité jaderné nepravidelnosti, avšak nápadnější atypie by měly vzbudit podezření na non-Hodgkinový lymfom (NHL). V některých případech můžeme nalézt četné shluky epiteloidních histiocytů. Přítomnost kolagenní fibrózy vylučuje diagnózu tohoto podtypu. (Arber, 2017)

2.3.1.8.3 *Podtyp bohatý na lymfocyty*

Tento podtyp se vyznačuje přítomností malého množství Hodgkinových a RS buněk na pozadí tvořeném převážně malými lymfocyty. Popisovány jsou dvě růstové varianty: častá nodulární a vzácná difúzní. (Arber, 2017)

U nodulární varianty je struktura lymfatické uzliny částečně zachována s dobře patrnými uzly, které sestávají z B lymfocytů a často obsahují regredovaná, excentricky uložená zárodečná centra. Ostatní zánětlivé buňky se vyskytují vzácně. Nádorové buňky jsou disperzně rozptýlené v rozšířené plášťové zóně, jen zřídka ve shlucích. Ve většině případů nacházíme klasické RS buňky, avšak přítomny mohou být i buňky podobného vzhledu jako u NLPHL, tudíž je klíčové imunohistochemické vyšetření. V infiltrátu na pozadí převažují B lymfocyty, ovšem nádorové buňky jsou často obklopeny T lymfocyty, které na rozdíl od NLPHL neexprimují CD57. (Arber, 2017)

Druhá varianta tohoto podtypu roste interfolikulárně či difúzně a typické RS buňky se nacházejí na pozadí malých lymfocytů, převážně T. (Arber, 2017)

Stále není zcela jasné, zda je podtyp bohatý na lymfocyty samostatnou jednotkou, nebo zda v některých případech představuje časnou fázi podtypu smíšené buněčnosti či nodulární sklerózy. (Arber, 2017)

2.3.1.8.4 Podtyp s deplecí lymfocytů

Jedná se o nejméně častý podtyp CHL, který představuje asi 1 % všech případů. Rozlišují se dvě varianty: s difúzní fibrózou a retikulární. U první z nich nacházíme mezi difúzně zmnoženými neuspořádanými retikulovými vlákny atypické buňky, včetně RS buněk, a řídký smíšený infiltrát na pozadí. Pro retikulární variantu jsou typické plochy tvořené atypickými buňkami, včetně mnohých bizarních anaplastických RS buněk. Imunohistochemické vyšetření je nezbytné pro odlišení od jiných lymfomů z velkých buněk, především od anaplastického velkobuněčného lymfomu (ALCL). (Arber, 2017)

2.3.1.9 Imunofenotypizace klasického Hodgkinova lymfomu

Diagnostický význam má jak fenotyp nádorových buněk, tak antigenní profil infiltrátu na pozadí. Ačkoli se jednotlivé subtypy CHL morfologicky liší, imunofenotyp nádorových buněk je vcelku konstantní. RS buňky a jejich varianty exprimují řadu antigenů související s aktivací lymfocytů, jako jsou CD30, CD25, CD40, CD71 atd., stejně tak antigeny, které jsou běžně exprimovány např. granulocyty (CD15) a folikulárními dendritickými buňkami (fascin). Typicky postrádají společný leukocytární antigen (LCA, CD45) a vykazují různorodou expresi některých markerů B lymfocytů a vzácně T lymfocytů. Hodnocení imunofenotypu nádorových buněk může být obtížné kvůli infiltrátu na pozadí, obzvláště pokud jde o markery, které jsou exprimovány většinou nenádorových buněk, jako je např. CD45 (Obr. 13). (Arber, 2017)

Nejspolehlivější a nejčastěji používané markery CHL jsou CD30 a CD15 (Obr 7 a 8). CD30 exprimují nádorové buňky v 90-96 % případů CHL. Zbarvení je membránové a cytoplazmatické s tečkovitým zvýrazněním v perinukleární oblasti, které odpovídá Golgiho komplexu. CD30 je exprimována též některými NHL, především ALCL, ale také nehematologickými nádory, např. embryonálním karcinomem. Proto je důležité hodnotit imunohistochemické vyšetření v kontextu s morfologií. (Arber, 2017)

Expresi CD15 nacházíme u 75-85 % případů CHL. Zbarvení může být slabší než u CD30 a omezeno pouze na část nádorových buněk, jinak je jeho charakter obdobný. Pozitivita CD15 pomáhá v odlišení RS buněk od CD30 pozitivních reaktivních blastů, které se vyskytují u některých infekcí. U jiných nádorových onemocnění, než je CHL, je koexprese CD15 a CD30 rovněž vzácná. (Arber, 2017)

Prakticky u všech CHL nacházíme slabší pozitivitu PAX5 (Obr. 10). Z ostatních pan-B markerů je CD20 (Obr. 9) exprimována u 20-40 % případů, přičemž zbarvení bývá slabé a pouze u části nádorových buněk. CD79a, OCT-2 a BOB.1 jsou prokazovány vzácně. (Arber, 2017). MUM-1 (Obr. 11), marker pozdní diferenciaci B lymfocytů, je obvykle nádorovými buňkami exprimován silně. (Louissaint Jr, 2012)

Negativita společného leukocytárního antigenu CD45 pomáhá odlišit CHL od různých NHL, které jej mohou napodobovat, a od NLPHL. Ve 25-50 % případů lze prokázat známky EBV infekce (imunohistochemicky LMP-1 a in situ hybridizací EBER). (Arber, 2017)

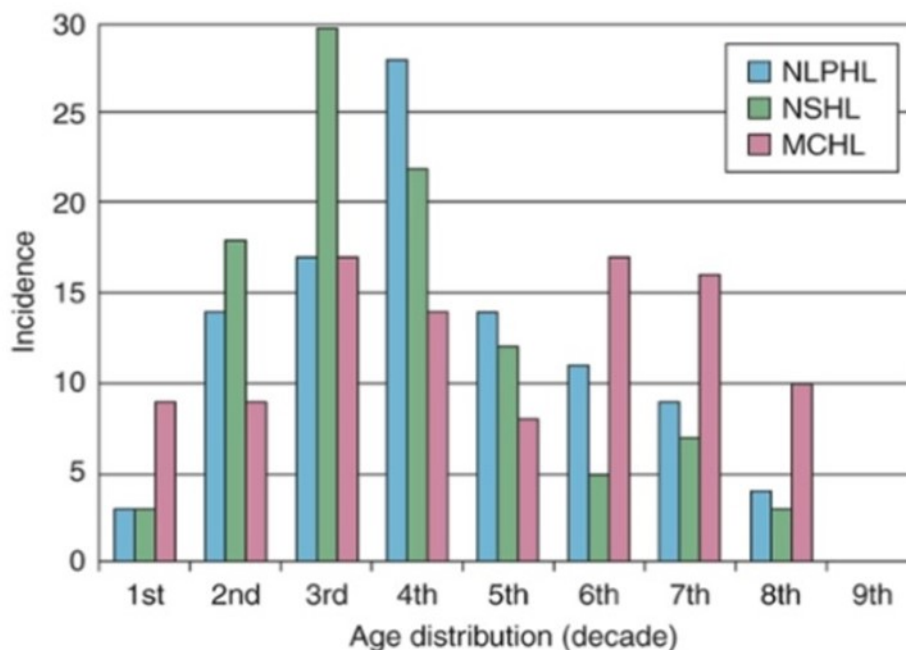
2.3.2 Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů (NLPHL)

Světová zdravotnická organizace (WHO) uznává nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů (NLPHL) jako samostatné onemocnění odlišné od klasického Hodgkinova lymfomu (CHL). To odráží skutečnost, že mezi NLPHL a CHL existují histologické, epidemiologické, imunologické a genetické rozdíly. (Swerdlow, 2017)

2.3.2.1 Epidemiologie

NLPHL tvoří v západních zemích 3-8 % HL a objevuje se ve všech věkových skupinách, s vyšším výskytem ve čtvrté dekádě života (Graf 1). Mezi pacienty převažují muži nad ženami v poměru 2,4:1. Byly popsány i rodinné případy NLPHL. Příčiny rodinného výskytu NLPHL nejsou známe, ale pravděpodobně zahrnují genetické i environmentální faktory, včetně infekčních onemocnění. (Saarinen, 2013)

Některé studie popisují EBV-pozitivní NLPHL, zejména v rozvojových zemích, zatímco jiné našly pouze negativní případy. Ačkoli byl zaznamenán zvýšený výskyt CHL u pacientů s HIV, o NLPHL to neplatí. (Arber, 2017)



Graf 1.: Výskyt NLPHL v různých věkových kategoriích ve srovnání se dvěma podtypy CHL (nodulární sklerózy (NSHL) a smíšené buněčnosti (MCHL)). (Arber, 2017)

2.3.2.2 Klinický obraz

Pacienti obvykle přicházejí s dlouhodobou izolovanou lymfadenopatií. Často dochází k postižení cervikálních a axilárních uzlin, méně často uzlin inguinálních nebo femorálních. Mediastinální NLPHL je vzácný (7 %). Z extranodálních lokalit se nádor primárně vyskytuje nejčastěji v mandlích, příušní žláze a měkkých tkáních. Játra a slezina bývají postiženy v pokročilejších stádiích nemoci. B symptomy jsou méně časté a objevují se pouze u 10 % pacientů. Infiltrace kostní dřeně NLPHL je extrémně vzácná (2,5 %) a je spojena s agresivním klinickým chováním a špatnou prognózou. (Hansmann, 1984)

Obvykle je NLPHL diagnostikován v časném stadiu, pomalu progreduje a výborně reaguje na terapii. Přibližně 20 % pacientů má v době diagnózy onemocnění v pokročilém stádiu. Recidivy jsou relativně časté (cca 21 %), a to bez ohledu na původní klinické stadium, a neobvyklé nejsou ani recidivy opakované (27 %). U 65 % pacientů dojde k recidivě v téže oblasti, u 23 % v jiné a u 12 % je onemocnění generalizováno. (Arber, 2017)

2.3.2.3 Prognóza

U 3-14 % pacientů s NPLHL se vyvine DLBCL. V lymfatické uzlině postižené typickým NPLHL můžeme zastihnout noduly tvořené téměř výhradně LP buňkami, což by mohlo odpovídat probíhající progresi onemocnění. V jiných případech lze v jedné lymfatické uzlině zastihnout zároveň struktury NPLHL a DLBCL. K transformaci může dojít i mnoho let po stanovení diagnózy NPLHL. Prognóza takto vzniklého DLBCL je nejasná, recentní studie však naznačují, že se chová obdobně jako de novo DLBCL, a tudíž by měl být léčen agresivně. (Al-Mansour, 2010)

2.3.2.4 Morfologie NPLHL

Při malém zvětšení je obvykle zjevné, že původní struktura lymfatické uzliny je kompletně setřelá. V některých případech je na periferii lem normální lymfatické tkáně, obvykle ostře oddělený od nádoru. (Arber, 2017)

Je popisováno 6 imunoarchitektonických typů NPLHL: (Fan, 2003)

- a) klasický nodulární bohatý na B lymfocyty
- b) nodulární serpiginozní
- c) nodulární s četnými LP buňkami extranodálně
- d) nodulární bohatý na T lymfocyty
- e) difúzní připomínající velkobuněčný B lymfom bohatý na T lymfocyty a histiocyty (THRLBCL)
- f) difúzní bohatý na B lymfocyty

Často je v jedné lymfatické uzlině přítomno více typů zároveň. Nodularita je obvykle dobře patrná již v základním barvení HE (Obr. 3), ale může být zvýrazněna imunohistochemicky. Uzly mívají různou velikost, převážně jsou však velké. Nádorové buňky se nacházejí v uzlech i mimo ně. Difúzní růst se může vyskytovat ložiskově, jen vzácně převažuje. (Arber, 2017)

Většinu buněk v nodulech představují malé lymfocyty, mezi nimiž jsou rozptýlené různé početné histiocyty a LP buňky. LP buňky lze obvykle nalézt snadno, v některých případech je jich však velmi malé množství, v jiných naopak vytvářejí velké shluky. LP buňky mají

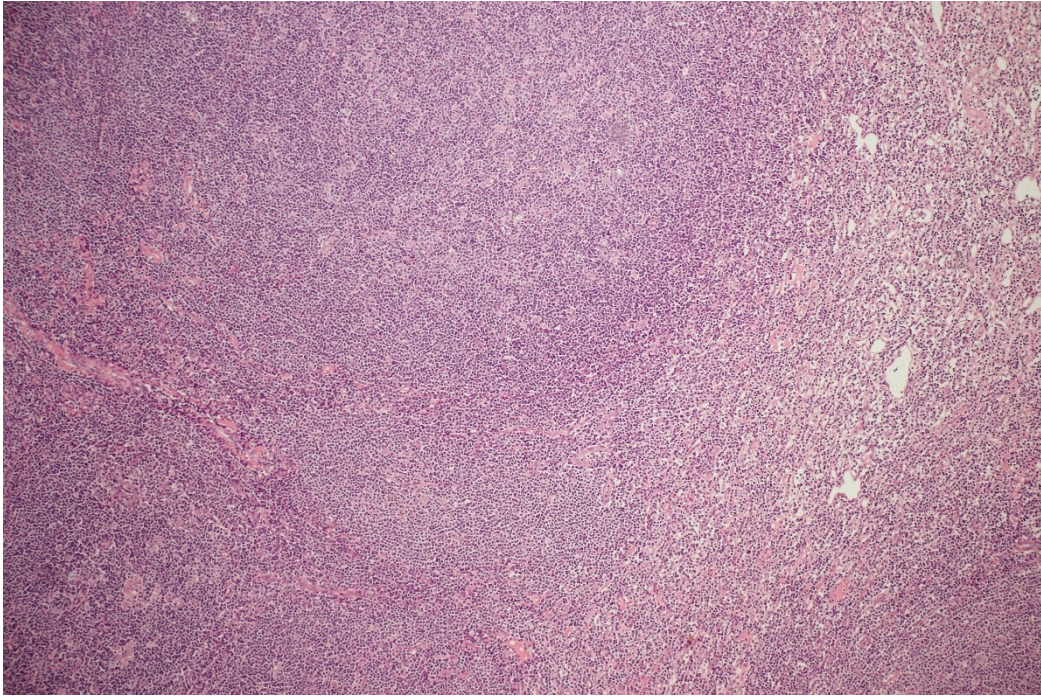
jádro větší než normální centroblasty a pro jeho laločnatost bývaly nazývány „popcorn cells“. Cytoplazma je relativně málo objemná. (Arber, 2017)

V komprimovaných internodulárních oblastech se nacházejí malé lymfocyty (Obr. 4) a venuly s vysokým endotelem. (Arber, 2017)

2.3.2.5 Imunofenotypizace NLPHL

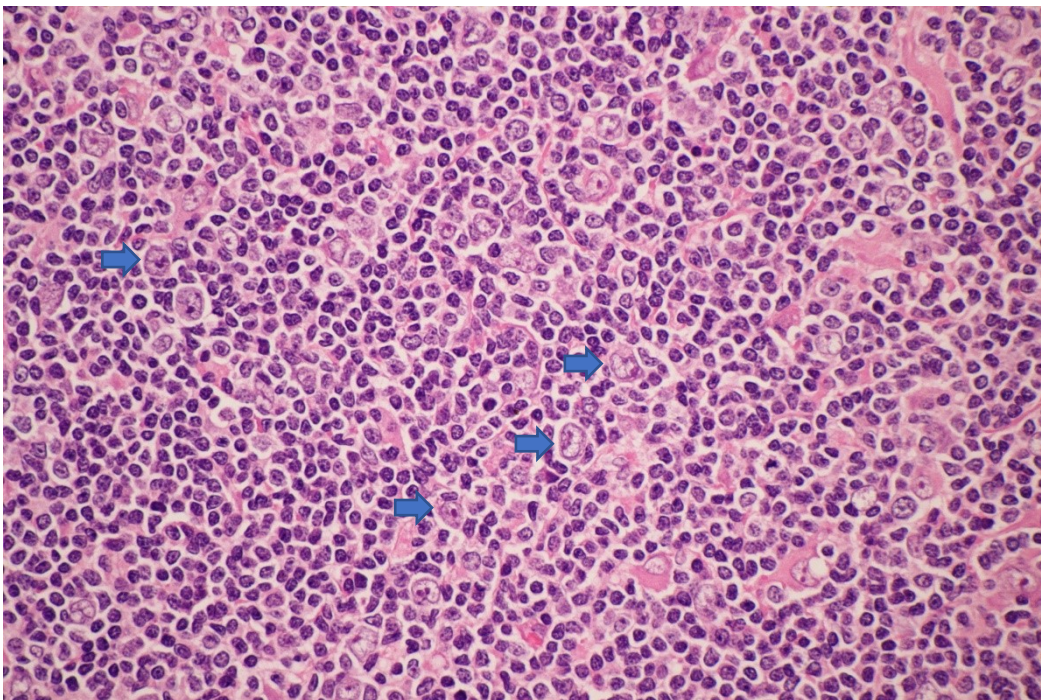
LP jsou pozitivní při imunohistochemickém průkazu CD45 (Obr. 21) a pan-B markerů CD20 (Obr. 14.) a PAX5 (Obr. 20). Dále je obvykle pozitivní CD79a, avšak různé intenzity, bcl6 a variabilně MUM-1 (Obr. 16). Negativní bývá průkaz CD19, stejně tak CD30 a CD15 (Obr. 17 a 18), které jsou exprimovány buňkami CHL. (Arber, 2017)

LP buňky se obvykle vyskytují na pozadí malých B lymfocytů z plášťové zóny, jejichž počet se postupem času snižuje. Zastoupení T lymfocytů v nodulech je vysoce variabilní a s trváním nemoci stoupá. Významná část T lymfocytů v NLPHL má charakteristický imunofenotyp CD2+, CD3+ (Obr. 19), CD4+, PD1+, CD57+ (Obr. 15) a i v případech, kdy je jejich celkový počet nízký, tyto buňky obvykle vytvářejí kolem LP buněk rozety. (Arber, 2017)



Obrázek 3.: Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů. Původní tkáň uzliny je nahrazena nodulárně rostoucím nádorem. HE 100x

Zdroj: Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze



Obrázek 4.: Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů. Nádorové buňky (některé označeny šipkou) jsou na pozadí tvořeném převážně malými lymfocyty. HE 600x

Zdroj: Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze

3. Cíl práce

Bakalářská práce je zaměřena na histologickou diagnostiku Hodgkinova lymfomu.

Hlavními cíli je seznámit se zásadami:

- odběru a příjmu lymfatické uzliny
- zpracování bioptického materiálu
- imunohistochemického vyšetření lymfatické uzliny

4. Metody a zpracování bioptického materiálu

4.1 Odběr a příjem lymfatické uzliny pro histologickou diagnostiku

Po předchozích vyšetřeních pacienta zobrazovacími metodami a laboratorním vyšetřením krve je suspektní uzlina odebrána chirurgem pro stanovení diagnózy. Lékař by měl postupovat tak, aby nedošlo ke zhmoždění odebrané tkáně. Uzlina je přijímána laboratorními pracovníky v nativním stavu ve správně označené uzavřené nádobě, nejlépe položená na kousek gázy namočené ve fyziologickém roztoku, společně s průvodním listem pro histologické vyšetření. Do laboratoří oddělení patologie musí být dopravena z operačního sálu co nejdříve, nejpozději do 30 minut po odběru, aby nedošlo k autolýze tkáně.

4.2 Proces zpracování v bioptické laboratoři

4.2.1 Příjem

Proces začíná příjmem uzliny laboratorními pracovníky, kontrolou správnosti identifikace materiálu s průvodním listem a zaevidováním pacienta do systému laboratoře, čímž každý pacient dostává své bioptické číslo, pod kterým je veden v průběhu celého histologického zpracování.

4.2.2 Zpracování nativní tkáně patologem

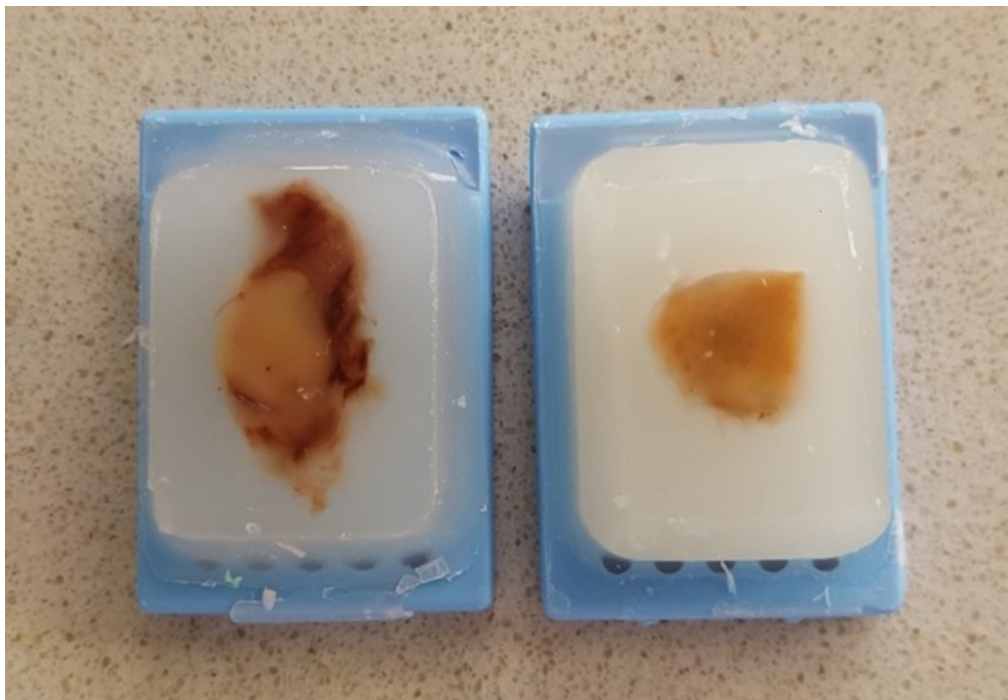
Pro zpracování uzliny jsou definována pravidla, kterými se lékař při příkrajování (preparaci) řídí. Patolog laboratornímu pracovníkovi diktuje makroskopický popis (rozměry, barva na povrchu a na řezu, konzistence), případně provede fotodokumentaci. Uzlinu krájí na lamely o tloušťce kolem 3 mm, z nichž zhotoví otisky na odmaštěné podložní sklo, které slouží jako doplňkové histologické (cytologické) vyšetření. Vzniklý otisk se barví metodou dle May Grünwald – Giemsa Romanowski. V případě dostatečně velké uzliny se odebírá vzorek pro potřeby průtokové cytometrie a část tkáně se mrazí pro molekulárně patologická vyšetření. U malých uzlin se upřednostňuje histologické vyšetření, pokud není předem dohodnut speciální postup s chirurgem. Zbylé lamely uzliny jsou patologem ukládány do předem připravených kazet, které se vkládají do fixační tekutiny.

4.2.3 *Fixace a prosycování*

Optimální doba fixace uzliny 4% neutrálním formálním je 24-36 hodin. Nedostatečná fixace či delší fixace tkáně zhoršuje výsledky následného imunohistochemického vyšetření, proto je vhodné indikovat odběr uzliny na počátku týdne. Po fixaci se kazety s materiálem dávají do tzv. autotechnikonu. Jedná se o odvodňovací tkáňový automat, skládající se ze soustavy lázní s formolem, alkoholy, acetonem a parafínem, kde jsou tkáně zbavovány vody a prosycovány parafínem.

4.2.4 *Zpracování prosycené tkáně*

Z autotechnikonu jsou kazety přeneseny k zalévacímu pultu, kde jsou tkáně zalévány do parafínu a vznikají tzv. bločky (Obr. 5). Hotové bločky se krájí na strojích (mikrotomech), na kterých je upevněna žiletka. Mikrotomy mohou být „sáňkové“ nebo „rotační“, které jsou vhodné pro krájení bločku v sériích. Ukrojené řezy se natahují v misce s teplou vodou, napínají se na podložní skla a tím vznikají histologické preparáty, které se barví přehledným histologickým barvením (hematoxylinem a eosinem = HE). Po prohlédnutí HE preparátů uzliny patolog indikuje speciální barvení a imunohistochemické metody, díky kterým může být stanovena diagnóza.



Obrázek 5.: Parafínové bloky s lymfatickou uzlinou

Zdroj: Fotoarchiv Ústavu patologie I. LF a VFN v Praze

4.3 Imunohistochemické vyšetření

Imunohistochemie (IHC) je metoda, která se zabývá detekcí antigenů in situ pomocí specifických primárních protilátek, kdy se využívá vazby antigen-protilátka. (Dabss, 2014)

4.3.1 Protilátka

Protilátky jsou molekuly glykoproteinů, které se označují jako imunoglobuliny. Skládají se ze dvou základních jednotek: dvojice lehkých řetězců, kappa nebo lambda, a dvojice těžkých řetězců: gama, alfa, my, delta nebo epsilon. Mají vlastnost specificky se vázat s druhou molekulou, nazývanou antigen. Produkce protilátky zvířetem je specificky indukována přítomností odpovídajícího antigenu, který vyvolává základní imunitní odpověď. IHC využívá fakt, že molekuly imunoglobulinů mohou sloužit jako protilátky, specificky se vázající na tkáňové antigeny, a zároveň slouží jako antigeny, na které mohou být připojeny sekundární protilátky. Vyhodnocení protilátky pro použití v IHC je založeno na dvou hlavních bodech: citlivosti a specifitě reakce antigen-protilátka. Monoklonální protilátky jsou protilátky identické, mohou se navázat na jednu jedinou antigenní determinantu. Naproti tomu polyklonální protilátky obsahují mnoho různých molekulárních druhů s různou specifitou proti různým částem antigenu nebo antigenním determinantům použitým k imunizaci zvířete. (Dabss, 2014)

4.3.2 Antigen

Antigen je bílkovina obsahující místa, která jsou schopna vyvolat tvorbu odpovídajících protilátek v organismu. Každé z těchto jednotlivých míst na molekule může být označeno jako antigenní determinant nebo epitop – přesné místo na molekule, se kterým se specificky váže vazebné místo protilátky. (Dabss, 2014)

4.3.3 Metody imunohistochemie

4.3.3.1 Přímá metoda

Nejjednodušší metoda pro průkaz antigenu ve tkáni. Primární protilátka je značena přímo (např. enzymem, fluoresceinem). Metoda přímého průkazu je méně citlivá na parafinových řezech a lze ji aplikovat v případě, že je antigen ve tkáni ve vyšší koncentraci. Takto modifikované protilátky jsou vhodné spíše pro průkaz antigenu v nativní tkáni.

4.3.3.2 Nepřímá dvoustupňová „sendvičová“ metoda

Principem nepřímé dvoustupňové metody je aplikace primární specifické protilátky, na kterou se dále naváže sekundární protilátka značená enzymem. Tato metoda je citlivější, než přímá detekce a lze ji uplatnit v IHC. (Dabss, 2014)

4.3.3.3 Nepřímá třístupňová metoda

Na aplikovanou primární protilátku se nanáší neznačená sekundární protilátka, tzv. spojovací můstek. Ve třetí fázi se aplikuje komplex značený enzymem. (Dabss, 2014)

4.3.4 Postup imunohistochemie

4.3.4.1 Krájení

Pro metody imunohistochemie je nutná zručnost laboratorního pracovníka, neboť výsledný řez by měl být tvořen optimálně jednou vrstvou buněk (tloušťka řezu cca 5 μm). Tento požadavek je důležitý právě při diagnostice hematologických malignit, kdy se hodnotí jednotlivé buňky ve tkáni a při odečítání je nezbytná přehlednost.

4.3.4.2 Napínání na podložní skla

Ukrojené řezy se natahují v misce s teplou vodou a napínají se na podložní skla, která by měla být dostatečně adhezivní (skla s elektrostaticky nabitým povrchem nebo tzv. „silanizovaná“ skla, která byla ponořena do roztoku silanu a acetonu a dále promyta v řadě acetonu a destilované vody), aby nedocházelo k fragmentaci tkáně nebo jejímu „odplavání“. Hotové preparáty se nechávají přischnout na zahřáté ploténce, jejíž teplota nesmí přesahovat 56 °C, a v termostatu, nejlépe do druhého dne.

4.3.4.3 Deparafinace a odhalování antigenů

Po tepelné fixaci následuje odstranění parafínu v tzv. „deparafinovací“ řadě. Jedná se o soustavu kyvet xylenu, isopropylalkoholu a sestupné řady alkoholů (96%, 80% a 70%), zakončené kyvetami s destilovanou vodou. Odstranění parafínu je velmi důležité pro správné výsledky IHC.

Vlivem fixace jsou vazebná místa antigenů zakryta a je nutné je odhalit. Pro odhalování se využívá vaření preparátů ve vodní lázni po dobu 40 minut v pufru o určitém pH (citrátový pufr s pH 6, pufr s pH 6,1 nebo s pH 9). Použití jednotlivých pufrů závisí na zavedeném protokolu jednotlivých protilátek dané laboratoře.

4.3.4.4 Blokování endogenních enzymů

Pro důkaz antigenů se využívají protilátky značené enzymem (např. peroxidázou), proto je nezbytné blokovat endogenní enzymy buněk (peroxidázy), které by mohly ovlivnit výsledek v podobě falešné positivity. K blokování se využívá roztok peroxidu vodíku s metanolem nebo komerčně vyráběné blokátory, které jsou součástí celého imunohistochemického kitu. Čas blokování se liší v závislosti na použité metodě.

4.3.4.5 Aplikace primární a sekundární protilátky

Po blokování následuje aplikace primární protilátky. Doba inkubace závisí na citlivosti a koncentraci použité primární protilátky. Obvykle trvá 50 minut při laboratorní teplotě v „IHC komorách“, které udržují vlhkost. Vysychání by vedlo ke zvýšení koncentrace protilátky a tím k nežádoucímu barvení pozadí. Po inkubaci se přebytečná protilátka vymyje vymývacím pufrem a aplikuje se protilátka sekundární na 30 minut. Po této druhé inkubaci je nutné sekundární protilátku rovněž vymýt vymývacím pufrem a reakci antigen-protilátka tzv. vizualizovat. K vizualizaci IHC se používá chromogen DAB (3,3-diaminobenzidin), který v přítomnosti peroxidázy produkuje hnědou sraženinu nerozpustnou v alkoholu. Posledním krokem imunohistochemie je dobarvení jader tkáně hematoxylinem. Celý proces je zakončen odvodněním tkáně a zamontováním preparátu montovacím médiem a krycím sklem, které řez chrání před mechanickým poškozením.

4.3.4.6 Strojové zpracování

Kromě manuálního provedení IHC lze využít i strojové vyšetření barvicím přístrojem. Nejčastěji používaným, plně automatizovaným přístrojem je Ventana BenchMark Ultra (Obr. 6). Tato platforma je ideálním řešením pro protilátky, které jsou málo citlivé při ručním provedení IHC nebo u kterých je nutná odlišná vizualizace kitem s alkalickou fosfatázou, tzv. červenou koncovkou. Ta se používá při vyšetření některých kožních excizií, jejichž

pigment by zakrýval hnědé zbarvení DABu. Dále se BenchMark Ultra hojně využívá pro hematopatologii.



Obrázek 6.: Barvicí přístroj Ventana BenchMark Ultra

Zdroj: Fotoarchiv Ústavu patologie I. LF a VFN v Praze

5. Výsledky

V následující tabulce jsou uvedena klinická data pacientů (Tab. 1).

případ	pohlaví	diagnóza	CD45	CD20	PAX5	CD30	CD15	MUM1	CD3
1	F	CHL, NS	-	-	-/+	+	+	+	-
2	F	CHL, NS	-	-	+	+	+	+	-
3	F	CHL, NS	-	-	+	+	+	+	-
4	F	CHL, NS	x	-	+	+	+	+	-
5	M	CHL, NS	x	-	+	+	+	+	-
6	M	CHL, MC	-	-	-/+	+	+	+	-
7	M	CHL, MC	x	-	+	+	+	+	-
8	M	CHL, MC	-	-/+	-/+	+	+	+	-
9	M	NLPHL	+	+	+	-	-	-/+	-
10	F	CHL, NS	x	-	+	+	+	+	-
11	F	CHL, NS	-	-	x	+	+	+	-
12	M	CHL, MC	-	-	x	+	+	+	-
13	M	CHL, MC	x	-/+	x	+	+	+	-
14	F	CHL, MC	x	-	x	+	+	+	-
15	M	CHL, MC	-	-	x	-/+	-/+	+	-
16	F	CHL, NS	-	-	x	+	+	+	-
17	F	CHL, NS	-	-	x	+	+	+	-
18	M	NLPHL	x	-/+	-/+	+	x	x	-
19	F	CHL, NS	x	-	+	+	+	+	-
20	M	CHL, NS	-	-	+	+	+	+	-
21	M	CHL, NS	x	-	+	+	-/+	+	-
22	M	CHL, NS	-	-	+	+	+	+	-
23	F	CHL, MC	-	-	+	+	+	+	-
24	F	CHL, MC	x	-	+	+	+	+	-
25	M	CHL, NS	x	-	+	+	+	+	-/+
26	F	CHL, MC	-	-	+	+	+	+	-
27	M	CHL, NS	-	-	+	+	+	+	-
28	M	CHL, NS	-	-	+	+	+	+	-
29	M	CHL, NS	-	-	x	+	+	+	-
30	M	CHL, MC	-	-	x	+	+	+	-
31	F	CHL, NS	x	-	+	+	+	+	-
32	F	CHL, NS	x	-	+	+	+	+	-
33	M	CHL, NS	-	-	+	+	+	+	-
34	M	CHL, NS	x	-	+	+	+	+	-
35	F	CHL, NS	x	x	x	+	+	+	-
36	F	NLPHL	+	+	+	-	-	x	-
37	F	CHL, NS	-	-	+	+	+	+	-
38	M	CHL, NS	x	-	+	+	+	+	-
39	F	CHL, NS	x	-	+	+	+	+	-
40	F	CHL, NS	x	-	+	+	-	+	-
41	F	CHL, MC	x	-	+	+	+	+	-
42	M	CHL, MC	-	-	+	+	-/+	+	-
43	F	CHL, NS	-	-	+	+	+	+	-
44	M	NLPHL	x	+	+	-	x	+	-

CHL, MC – Klasický Hodgkinův lymfom, podtyp smíšené buněčnosti; CHL, NS – Klasický Hodgkinův lymfom, podtyp nodulární sklerózy; NLPHL – Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů; X – nebylo provedeno

Tabulka 1.: Vyšetřené Hodgkinovy lymfomy za rok 2016 a 2017. (Ústav patologie I.LF a VFN v Praze)

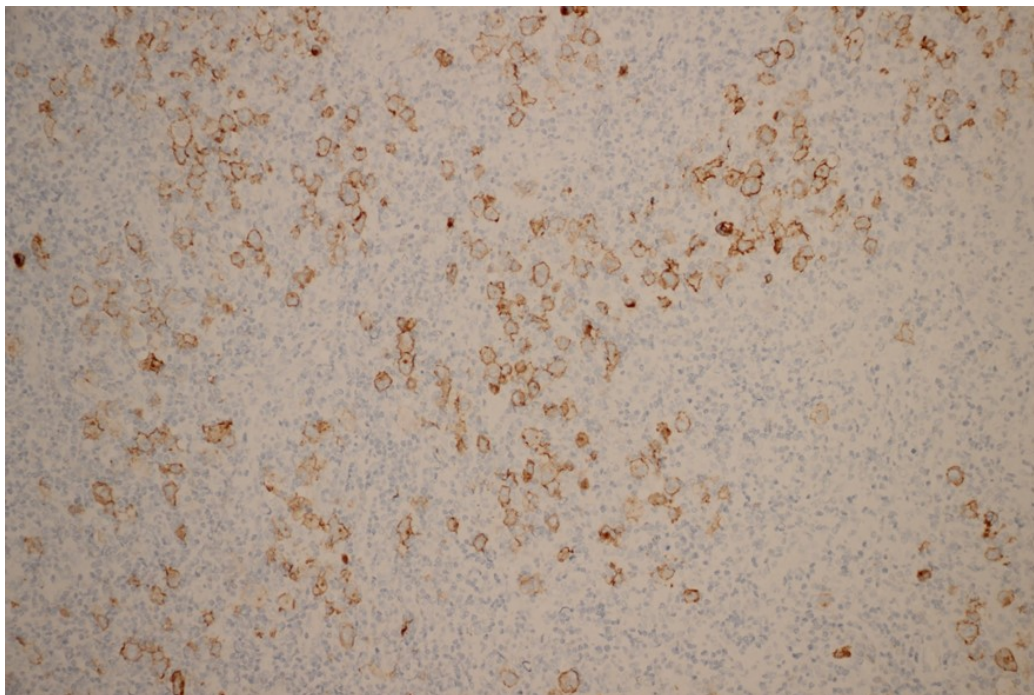
Za rok 2016 a 2017 bylo na Ústavu patologie 1. LF a VFN v Praze vyšetřeno 44 lymfatických uzlin s diagnózou Hodgkinova lymfomu. Poměr mužů a žen byl 1:1. Jednalo se o pacienty ve věku 20-85 let (průměr 46 let, medián 44,5 let), z toho 17 (39 %) byli lidé ve věku 20-36 let.

Z celkového počtu lymfatických uzlin tvořily 4 případy (9 %) NLPHL a 40 případů (91 %) CHL, z toho 27 (61 %) podtyp nodulární sklerózy a 13 (30 %) podtyp smíšené buněčnosti. 4 CHL a 1 NLPHL představovaly relaps dříve diagnostikovaného onemocnění. Jeden vznikl transformací z chronické lymfocytární leukémie (CLL). Téměř všechny nádory vykazovaly typický imunofenotyp (Tab. 1), jak jej popisují Arber a kol. (Arber, 2017).

CHL ve 100 % případů exprimovaly PAX5 (30 případů ze 30, u nichž bylo vyšetření provedeno), CD30 (40/40) a MUM1 (40/40), v 97,5 % CD15 (39/40). V 5,13 % byl v menšině buněk pozitivní průkaz CD20 (2/39), ve 2,5 % v menšině buněk CD3 (1/40). V žádném CHL jsme neprokázali CD45 (0/22).

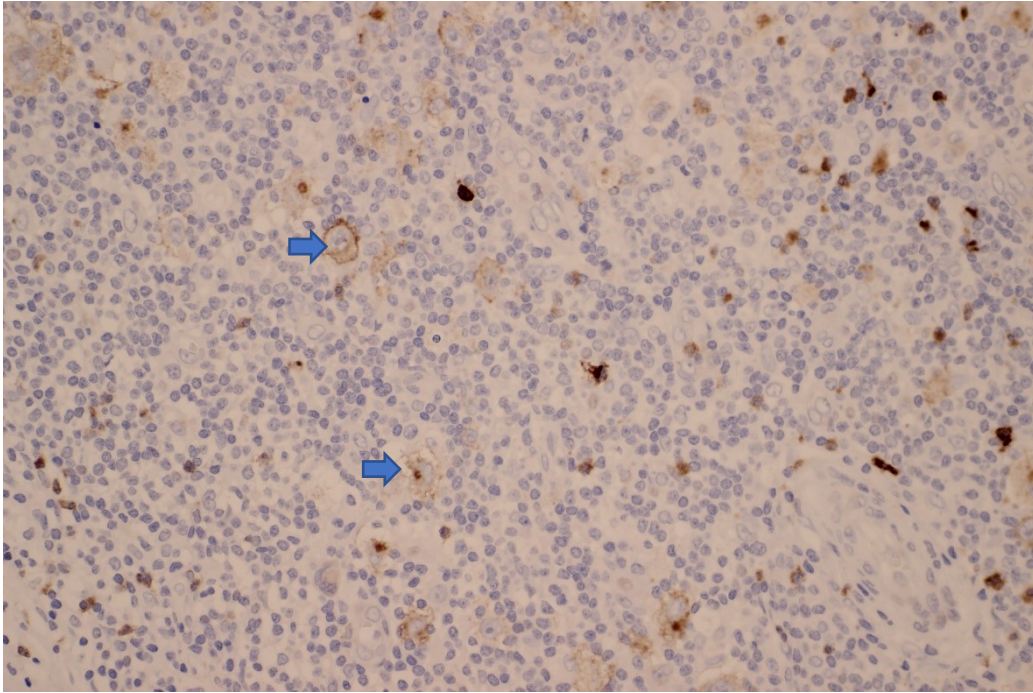
NLPHL ve 100 % případů exprimovaly CD45 (2/2), CD20 (4/4) a PAX5 (4/4), ve 25 % CD30 (1/4). V žádném případě jsme neprokázali CD15 (0/2) a CD3 (0/4).

Výsledná imunohistochemická barvení CHL (Obr. 7–13)



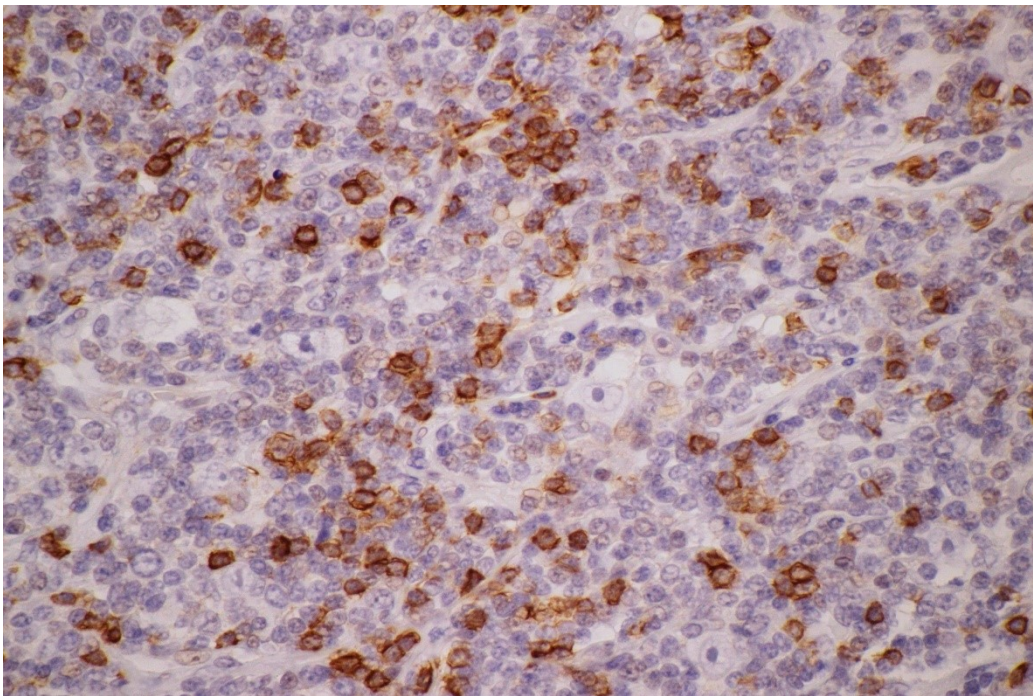
Obrázek 7.: Klasický Hodgkinův lymfom. CD30 pozitivní v nádorových buňkách, 200x

Zdroj: Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze



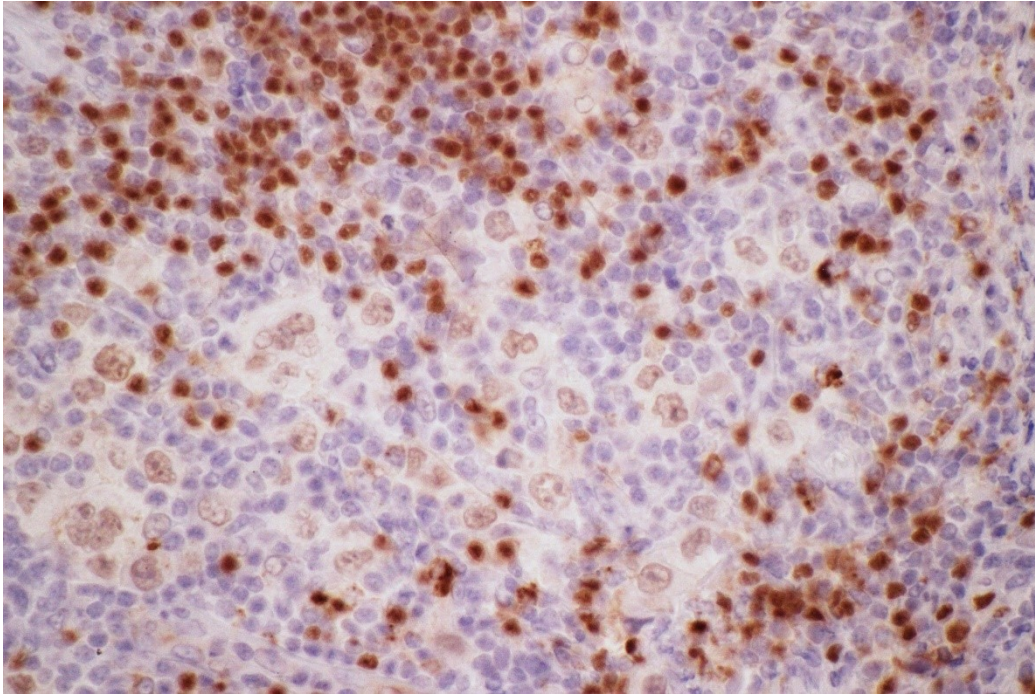
Obrázek 8.: Klasický Hodgkinův lymfom. CD15 pozitivní v nádorových buňkách (označeny šipkou) a v neutrofilech na pozadí, 400x

Zdroj: Ústav patologie I. LF UK a VFN v Praze



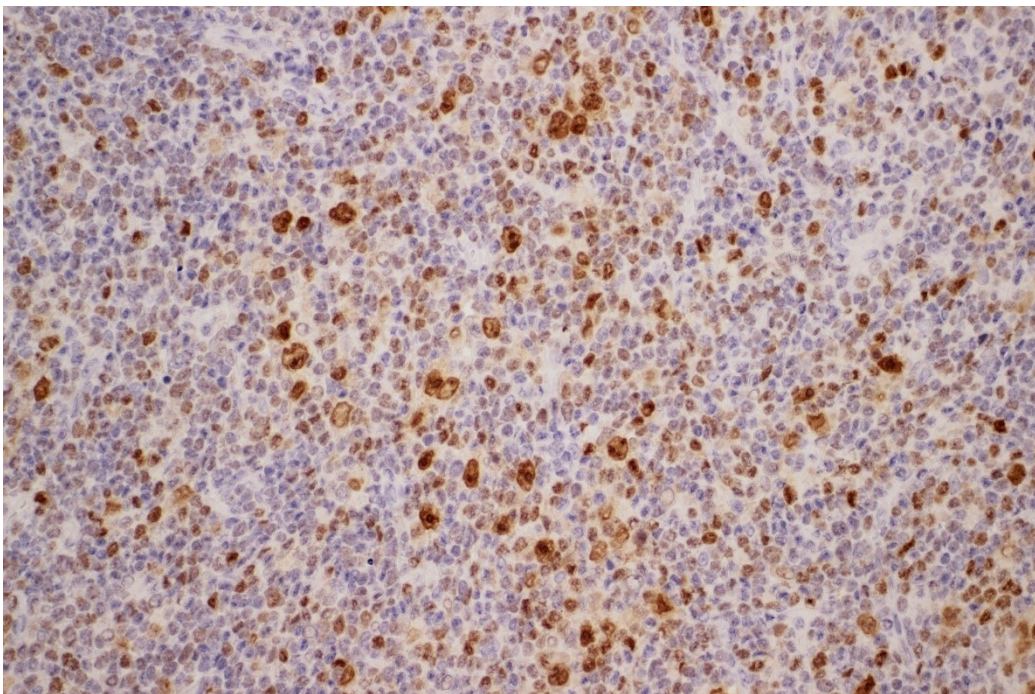
Obrázek 9.: CHL CD20 negativní v nádorových buňkách, pozitivní v B lymfocytech na pozadí, 600x

Zdroj: Ústav patologie I. LF UK a VFN v Praze



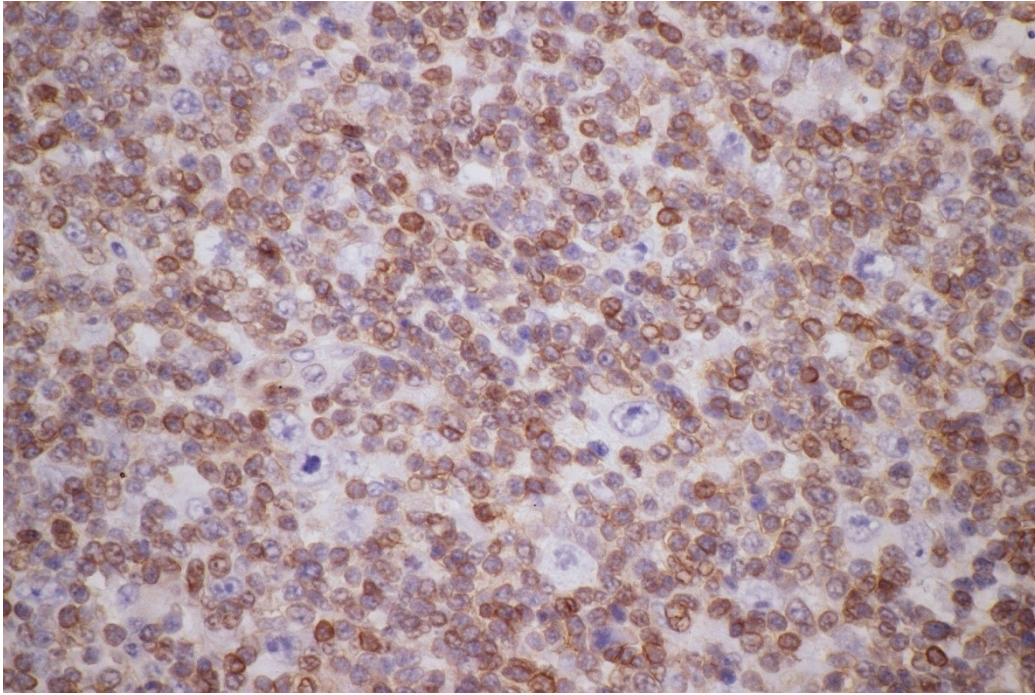
Obrázek 10.: CHL PAX 5 slabě pozitivní v nádorových buňkách, silně v B lymfocytech na pozadí, 600x

Zdroj: Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze

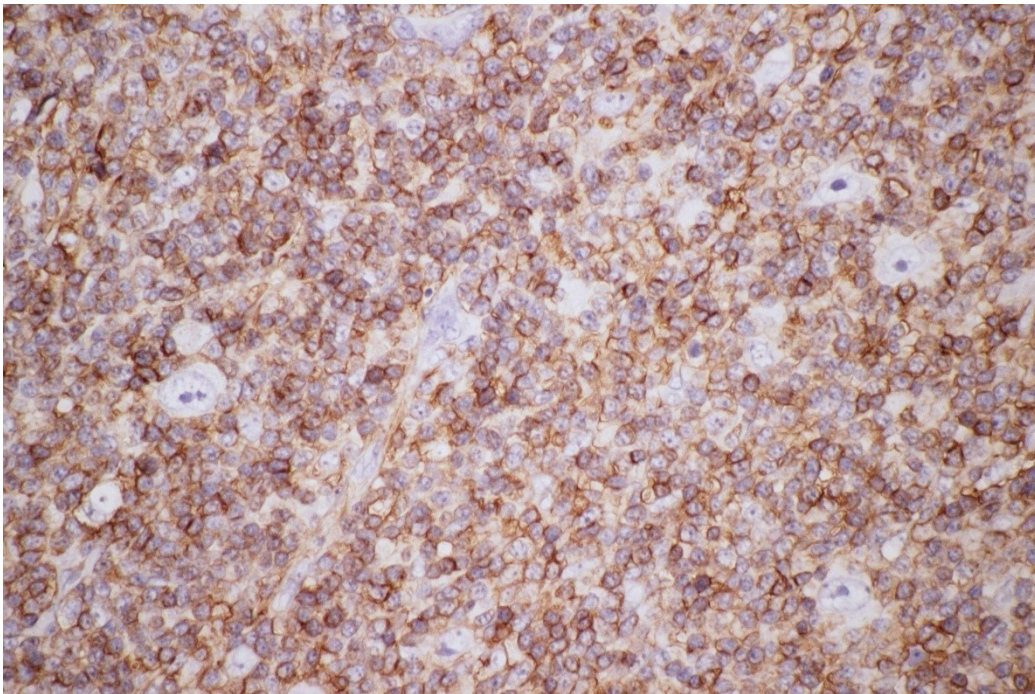


Obrázek 11.: CHL MUM1 pozitivní v nádorových buňkách a plazmatických buňkách na pozadí, 400x

Zdroj: Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze

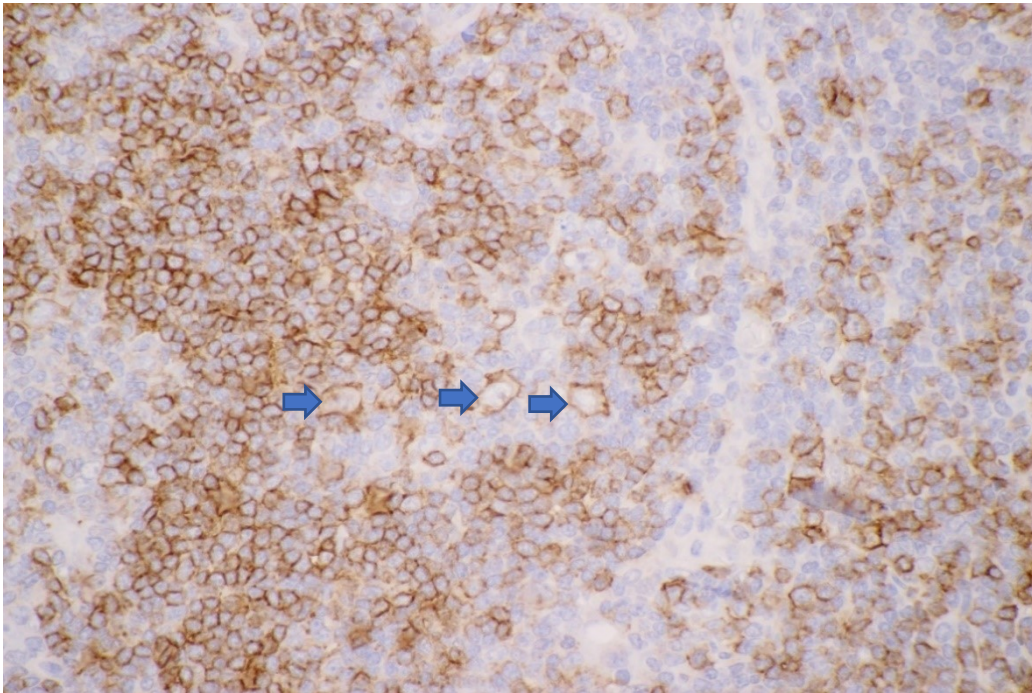


*Obrázek 12.: CHL CD3 negativní v nádorových buňkách, pozitivní v T lymfocytech na pozadí, 600x
Zdroj: Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze*



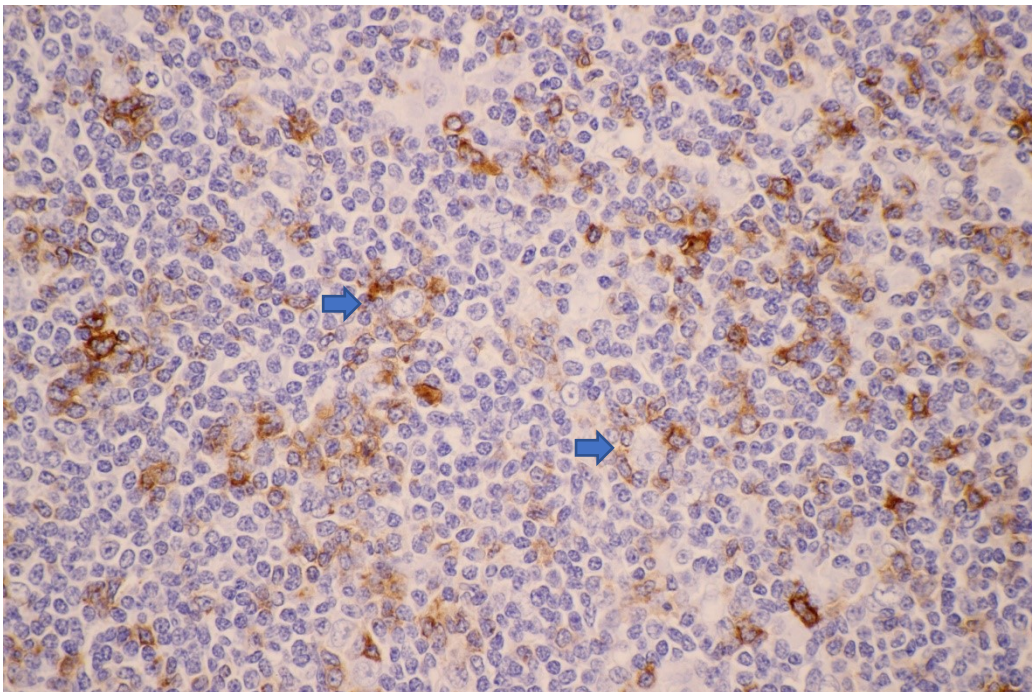
*Obrázek 13.: CHL CD45 negativní v nádorových buňkách, pozitivní ve většině buněk na pozadí, 600x
Zdroj: Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze*

Výsledná imunohistochemická barvení NLPHL (Obr. 14–21)



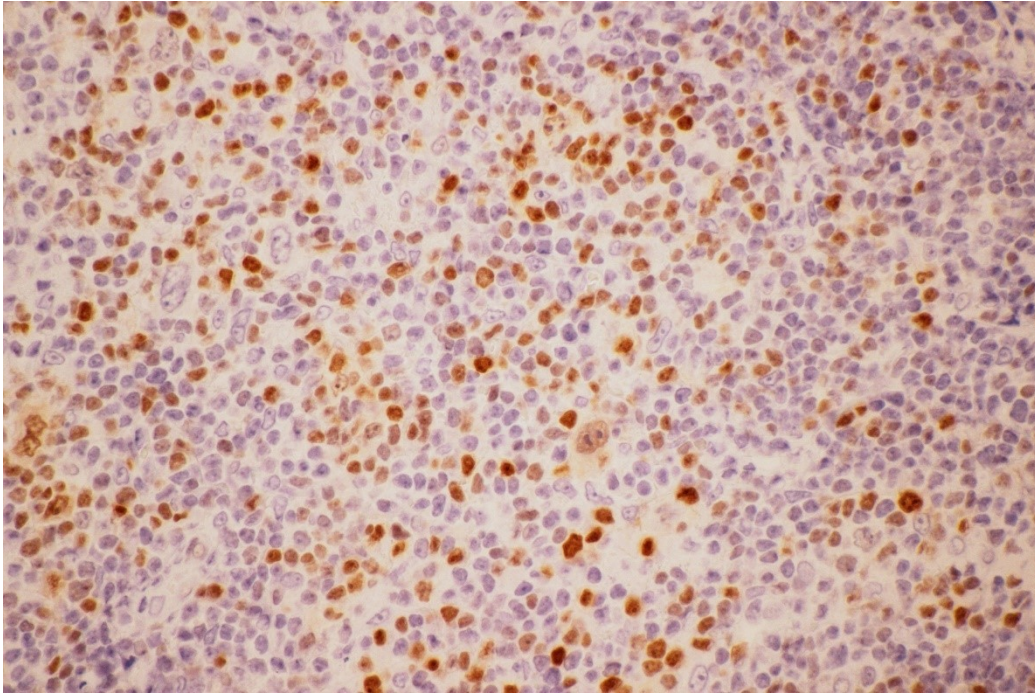
Obrázek 14.: Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů. CD20 pozitivní v nádorových buňkách (označeny šipkou) a B lymfocytech na pozadí. 600x

Zdroj: Ústav patologie I. LF UK a VFN v Praze



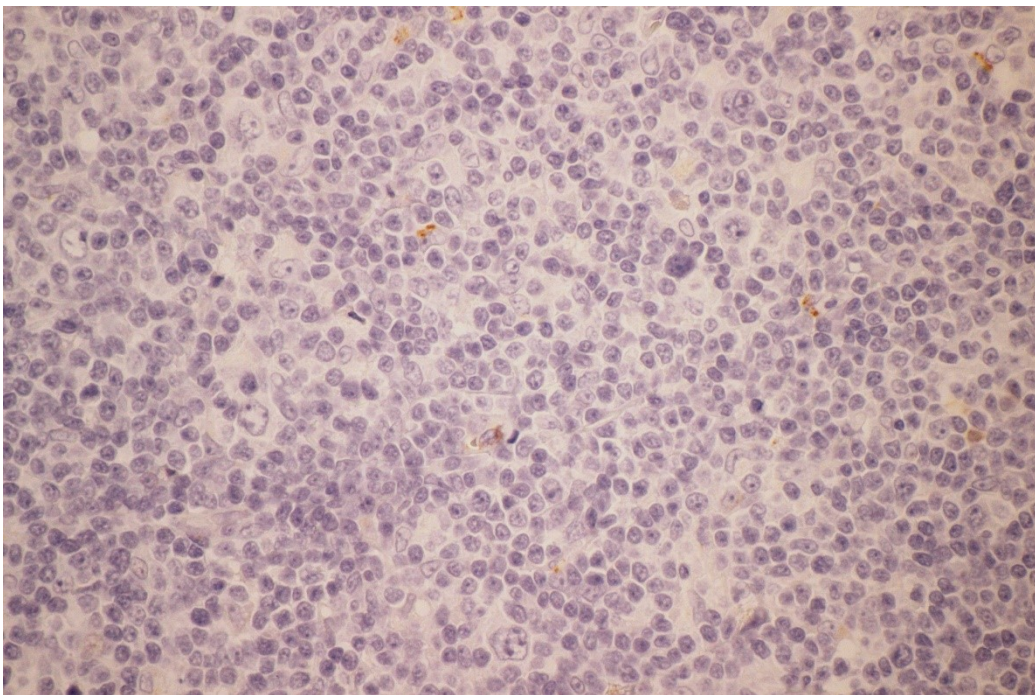
Obrázek 15.: Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů. CD57 pozitivní v malých T lymfocytech, které tvoří rozety kolem nádorových buněk (označeny šipkou). 600x

Zdroj: Ústav patologie I. LF UK a VFN v Praze



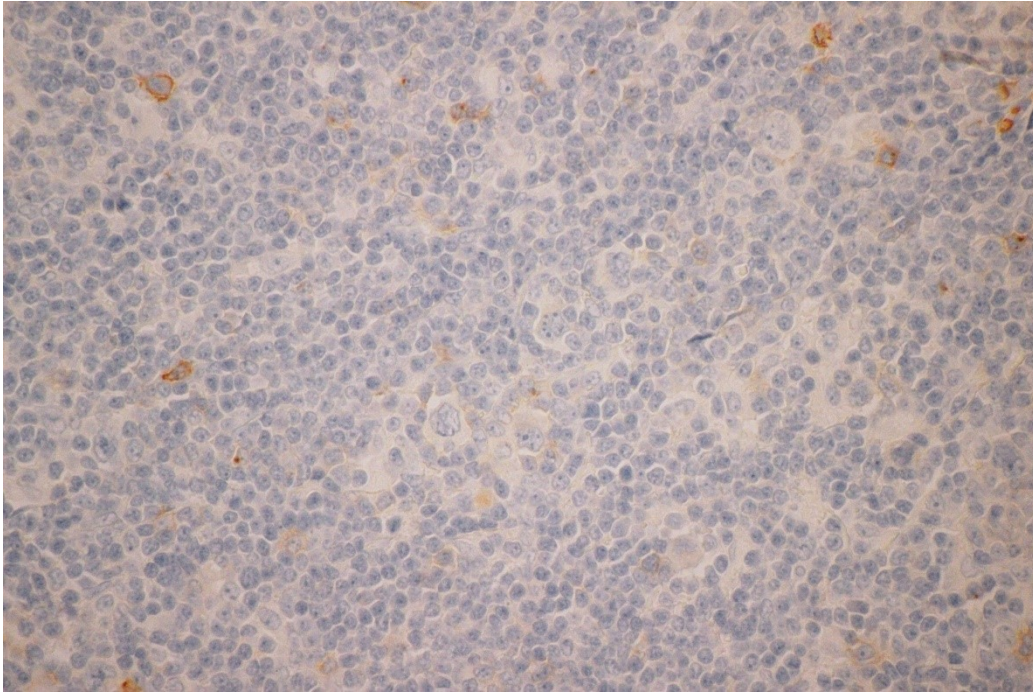
Obrázek 16.: NLPHL MUM1 pozitivní v části nádorových buněk a v plazmatických buňkách na pozadí, 600x

Zdroj: Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze



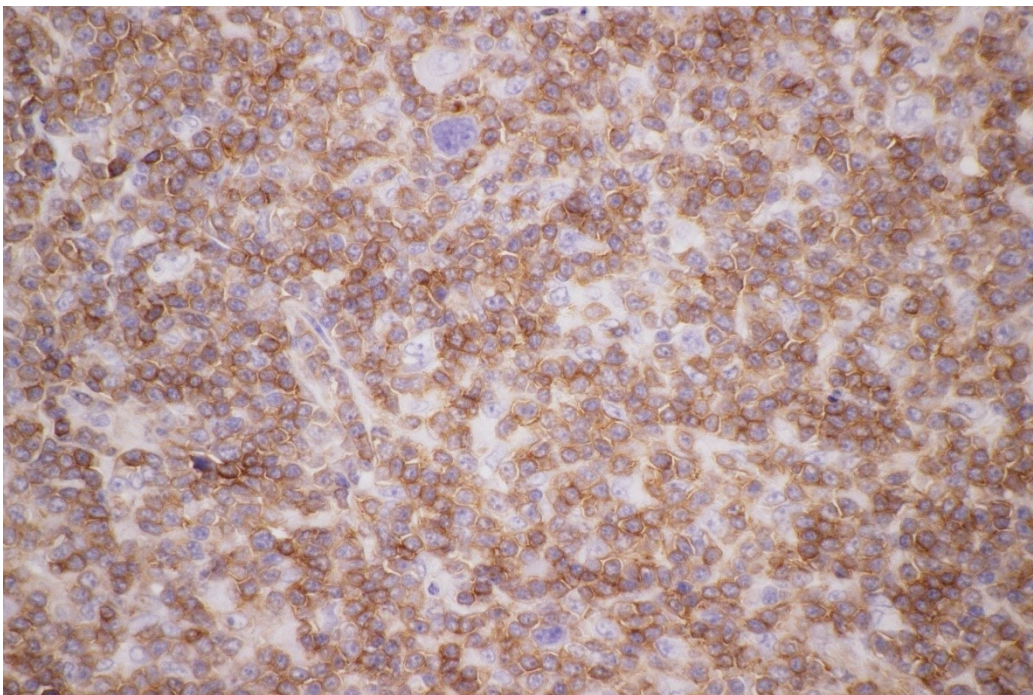
Obrázek 17.: NLPHL CD15 negativní v nádorových buňkách, 600x

Zdroj: Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze



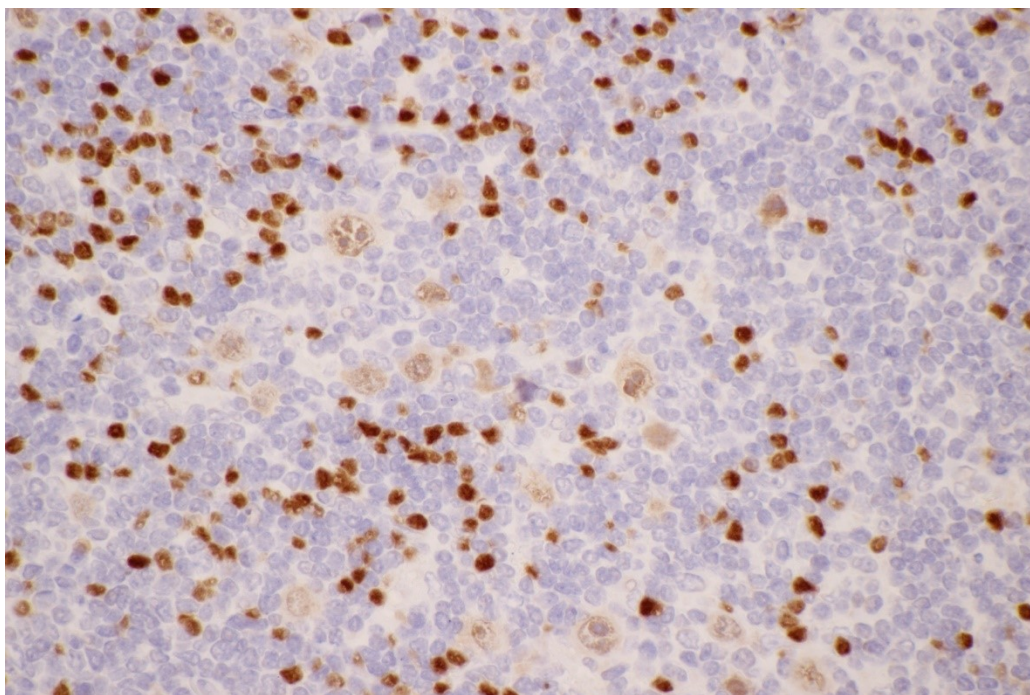
Obrázek 18.: NLPHL CD30 negativní v nádorových buňkách, pozitivní v ojedinělých aktivovaných lymfocytech, 600x

Zdroj: Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze



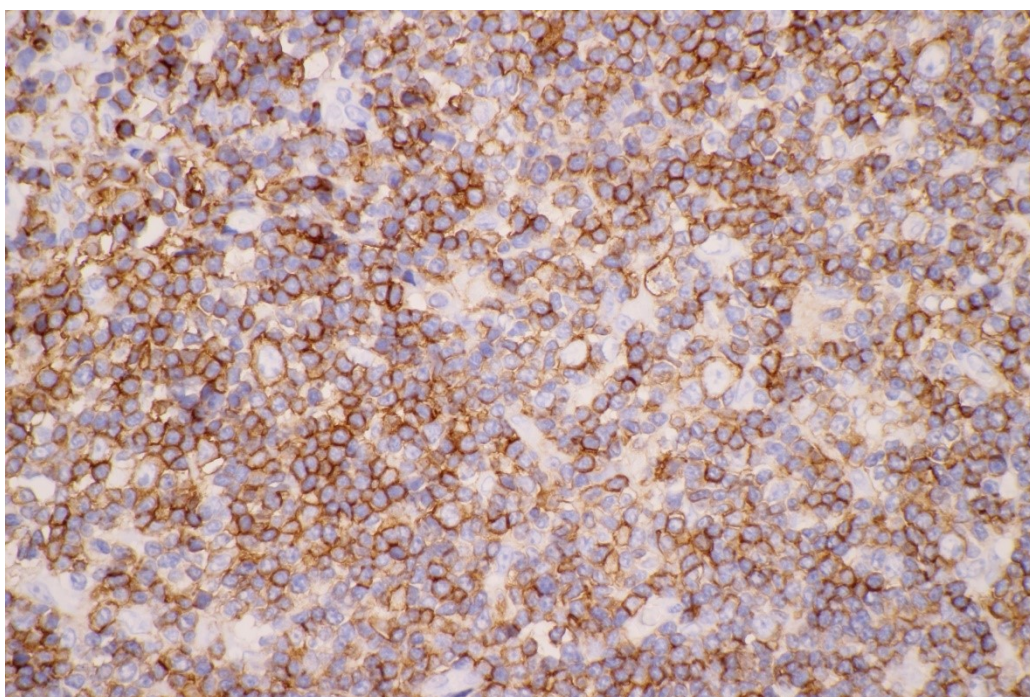
Obrázek 19.: NLPHL CD3 negativní v nádorových buňkách, pozitivní v T lymfocytech na pozadí, 600x

Zdroj: Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze



Obrázek 20.: NLPHL PAX 5 slabě pozitivní v nádorových buňkách, silně v B lymfocytech na pozadí, 600x

Zdroj: Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze



Obrázek 21.: NLPHL CD45 pozitivní v nádorových buňkách a většině buněk na pozadí, 600x

Zdroj: Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze

6. Diskuze

Zobrazovací metody, laboratorní komplement a terapeutické pokroky nám usnadňují diagnostiku a následnou léčbu nejen onkologicky nemocných pacientů. Přesto nám obor patologie a s ním spojené laboratoře zajišťují mnohdy nejpřesnější pohled do procesů probíhajících v lidském těle. Díky tomuto oboru je možné podchytit onemocnění v raném stádiu a tím pacientovi zachránit život.

V bioptických a imunohistochemických laboratořích je nezbytná zručnost a odborné znalosti laboratorních pracovníků nejen z histologické techniky, ale i anatomie a latinské terminologie. Při zpracování bioptického materiálu je nutné postupovat tak, aby nedošlo k poškození pacienta.

Imunohistochemie a speciální barvení se provádí s kontrolními vzorky, aby se ověřila spolehlivost metody. V případě imunohistochemie probíhá i tzv. laboratorní kontrola, kdy po vyhotovení všech metod laboratorní pracovník prohlíží výsledné preparáty jak makroskopicky, tak pod mikroskopem a posuzuje jejich kvalitu. V případě nejistoty nebo neprůkaznosti je nutná konzultace s patologem a metoda se případně opakuje. Tato opatření zajišťují správnost diagnózy.

Bioptická laboratoř Ústavu patologie 1. LF a VFN v Praze ročně přijme okolo 25 000 bioptického materiálu a denně se vydává patologům 400-600 preparátů barvených přehledným barvením (HE). Laboratoř imunohistochemie provádí kolem 3 500 vyšetřené měsíčně, což odpovídá přibližně 175 preparátům denně, přičemž většina metod se zpracovává ručně laboratorními pracovníky. K usnadnění práce se využívají autotechnikony na prosycování tkáně, barvicí automaty a montovací přístroje. Imunohistochemické barvicí přístroje provádí metody, které jsou málo citlivé při ručním zpracování a hojně se využívají u hematologických malignit.

Téměř všechny lymfatické uzliny s diagnózou klasického Hodgkinova lymfomu nebo NLPHL, vyšetřené na Ústavu patologie 1.LF a VFN v Praze, vykazovaly typický imunofenotyp (Tab. 1), jak jej popisují Arber a kol. (Arber, 2017).

CHL ve 100 % případů exprimovaly PAX5 (30 případů ze 30, u nichž bylo vyšetření provedeno), CD30 (40/40) a MUM1 (40/40), v 97,5 % CD15 (39/40).

NLPHL ve 100 % případů exprimovaly CD45 (2/2), CD20 (4/4) a PAX5 (4/4), ve 25 % CD30 (1/4). V žádném případě jsme neprokázali CD15 (0/2) a CD3 (0/4).

7. Závěr

Tato práce popisuje historii a teoretickou část Hodgkinova lymfomu, dále metody zpracování histologického materiálu, postupy v imunohistochemii a následnou diagnostiku patologem.

Pro celý proces vyšetření je důležitá spolupráce chirurgů či lékařů ORL, patologů, bioptické a imunohistochemické laboratoře. Správná diagnóza a následná léčba je závislá nejen na správném odběru materiálu, ale i na laboratorních pracovnících, kteří provádí zpracování a imunohistochemické vyšetření zadané patologem.

Díky mnoholetým poznatkům a moderním postupům v medicíně se stal Hodgkinův lymfom jednou z malignit, která velmi dobře reaguje na léčbu. Díky tomu je prognóza většiny pacientů s CHL i NLPHL velmi dobrá.

8. Zkratky

ALCL	Anaplastický velkobuněčný lymfom (<u>A</u> naplastic <u>L</u> arge <u>C</u> ell <u>L</u> ymphoma)
BOB.1	Transkripční koaktivační protein specifický pro B lymfocyty (<u>B</u> Cell <u>S</u> pecific <u>O</u> ctamer <u>B</u> inding Protein-1)
CD znaky	Diferenciační skupina – značení pro skupinu molekul, které mají na povrchu buněk stejnou antigenní determinantu (<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation)
CHL	Klasický Hodgkinův lymfom (<u>C</u> lassical <u>H</u> odgkin's <u>L</u> ymphoma)
DAB	Chromogen pro vizualizaci imunohistochemického barvení (3,3- <u>d</u> iaminobenzidin)
DLBCL	Difúzní velkobuněčný B-lymfom (<u>D</u> ifuse <u>L</u> arge <u>B</u> Cell <u>L</u> ymphoma)
EBV	Virus Ebsteina-Barrové (<u>E</u> bstein- <u>B</u> arr <u>V</u> irus)
EBER	In situ hybridizace pro virus Ebsteina-Barrové (<u>E</u> pstein- <u>B</u> arr virus- <u>E</u> ncoded <u>R</u> NA)
HE	Barvení <u>H</u> ematoxylin- <u>E</u> osin
HIV	<u>H</u> uman <u>I</u> mmunodeficiency <u>V</u> irus
HL	<u>H</u> odgkinův <u>L</u> ymfom
IHC	<u>I</u> mu <u>n</u> o <u>h</u> isto <u>ch</u> emie
LCA	Společný leukocytární antigen (<u>L</u> eukocyte <u>C</u> ommon <u>A</u> ntigen)
LMP-1	Imunohistochemický test pro detekci EBV (<u>L</u> atent <u>M</u> embrane <u>P</u> rotein 1)
LP buňky	Buňky NLPHL (<u>L</u> ymphocyte- <u>P</u> redominant cells)
MCHL	Hodgkinův lymfom, podtyp smíšené buněčnosti (<u>M</u> ixed <u>C</u> ellularity <u>H</u> odgkin's <u>L</u> ymphoma)

MUM-1	Protein, který je exprimován na části B buněk zárodečného centra, plazmatických buňkách a aktivovaných T lymfocytech (<u>M</u> ultiple <u>M</u> yeloma <u>O</u> ncogen- <u>1</u>)
NHL	Non-Hodgkinský lymfom (<u>n</u> on- <u>H</u> odgkin's <u>L</u> ymphoma)
NLPHL	Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů (Nodular Lymphocyte–Predominant Hodgkin's Lymphoma)
NSHL	Hodgkinův lymfom, podtyp nodulární sklerózy (<u>N</u> odular <u>S</u> clerosing <u>H</u> odgkin's <u>L</u> ymphoma)
PAX5	Transkripční faktor exprimovaný v B buňkách (<u>P</u> aired <u>B</u> ox <u>P</u> rotein <u>5</u>)
RS buňky	Buňky Reedové a Sternberga (<u>R</u> eed- <u>S</u> ternberg Cells)
THRLBCL	Velkobuněčný B lymfom bohatý na T lymfocyty a histiocyty (<u>T</u> cell / <u>H</u> istiocyte <u>R</u> ich- <u>D</u> iffuse <u>L</u> arge <u>B</u> <u>C</u> ell <u>L</u> ymphoma)
WHO	Světová zdravotnická organizace (<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization)

9. Seznam literatury

Al-Mansour, Connors, Gascoyne, Skinnider, Savage. 2010. PubMed. *Transformation to aggressive lymphoma in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma.* [Online] Journal of clinical oncology, 2010. [Citace: 21. 3 2018.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20048177>. PMID: 20048177 .

Ansell. 2016. PubMed. *Hodgkin lymphoma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management.* [Online] American journal of hematology, 2016. [Citace: 23. 3 2018.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27001163>. PMID: 27001163.

Arber, Daniel a kol. 2017. *Hematopathology.* Philadelphia : Elsevier, 2017. stránky 507-536. 978-0-323-29613-7.

Bräuninger, Schmitz, Bechtel, et al. 2006. PubMed. *Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma.* [Online] International journal of cancer, 2006. [Citace: 20. 3 2018.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16385563>. PMID: 16385563.

Canellos, Rosenberg, Friedberg, Lister, Devita. 2014. *Treatment of Hodgkin Lymphoma: A 50-Year Perspective.* [Online] Journal of clinical oncology, 2014. [Citace: 23. 3 2018.] <http://ascopubs.org/doi/full/10.1200/JCO.2013.53.1194>. PMID: 24441526.

Colby, Hoppe, Warnke. 1982. PubMed. *Hodgkin's disease: a clinicopathologic study of 659 cases.* [Online] Cancer, 1982. [Citace: 19. 3 2018.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7074584>. PMID: 7074584.

Dabbs, David J. a kol. 2014. *DIAGNOSTIC IMMUNOHISTOCHEMISTRY: THERANOSTIC AND GENOMIC APPLICATIONS.* Philadelphia : Elsevier, 2014. stránky 15-19. ISBN: 978-1-4557-4461-9.

Encyclopaedia Britannica. [Online] [Citace: 14. 3 2018.] <https://www.britannica.com/biography/Thomas-Hodgkin>.

Fan, Natkunam, Bair, Tibshirani, Warnke. 2003. PubMed. *Characterization of variant patterns of nodular lymphocyte predominant hodgkin lymphoma with immunohistologic and clinical correlation.* [Online] The American journal of surgical pathology, 2003. [Citace: 18. 3 2018.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14508396>. PMID: 14508396.

Glaser, Lin, Stewart, et al. 1997. PubMed. *Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data.* [Online] International journal of cancer, 1997. [Citace: 19. 3 2018.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9033642>. PMID: 9033642.

Hansmann, Zwingers, Böske, Löffler Lennert. 1984. PubMed. *Clinical features of nodular paragranuloma (Hodgkin's disease, lymphocyte predominance type, nodular).* [Online] Journal of cancer research and clinical oncology, 1984. [Citace: 20. 3 2018.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6511805>. PMID: 6511805.

L. Carlos Junqueira, José Carneiro, Robert O. Kelley. 1997. *Základy histologie.* Jinočany : H&H, 1997. 80-85787-37-7.

LAKHTAKIA Ritu, BURNEY Ikram. 2015. Sultan Qaboos University Medical Journal. *A Historical Tale of Two Lymphomas: Part I: Hodgkin lymphoma.* [Online] 2015. [Citace: 24. 3 2018.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4450782/>.

Louissaint Jr, Ferry, Soupir, Hasserjian, Harris, Zukerberg. 2012. PubMed. *Infectious mononucleosis mimicking lymphoma: distinguishing morphological and immunophenotypic features.* [Online] *Modern pathology*, 2012. [Citace: 24. 3 2018.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22627742>. PMID: 22627742.

Poppema, Potters, Emmens, Visser, van den Berg. 1999. PubMed. *Immune reactions in classical Hodgkin's lymphoma.* [Online] *Seminars of hematology*, 1999. [Citace: 22. 3 2018.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10462325>. PMID: 10462325.

Saarinen, Pukkala, Vahteristo, Mäkinen, Franssila, Lauri. 2013. *High Familial Risk in Nodular Lymphocyte-Predominant Hodgkin Lymphoma.* [Online] *Journal of clinical oncology*, 2013. [Citace: 24. 3 2018.] <http://ascopubs.org/doi/full/10.1200/JCO.2012.43.5958>. PMID: 23284040.

Swerdlow, Campo, Harris. 2017. *WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues.* Lyon : IARC Press Lyon, 2017. 13-9789283244943.

Thomas, Re, Zander, Wolf, Diehl. 2002. Epidemiology and etiology of Hodgkin's lymphoma. *Annals of oncology*. 2002, 12401681.

ÚZIS. 2015. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. *Novotvary 2015 ČR.* [Online] 2015. [Citace: 14. 3 2018.] <http://www.uzis.cz/system/files/novotvary2015.pdf>.

van Leeuwen, Klokman, Hagenbeek, Noyon, van den Belt-Dusebout, van Kerkhoff, van Heerde, Somers. 1994. PubMed. *Second cancer risk following Hodgkin's disease: a 20-year follow-up study.* [Online] *Journal of clinical oncology*, 1994. [Citace: 21. 3 2018.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8113838> .

10. Seznam grafů a obrázků

<i>Obrázek 1.: Klasický Hodgkinův lymfom (podtyp nodulární sklerózy). HE 100x.....</i>	<i>14</i>
<i>Obrázek 2.: Klasický Hodgkinův lymfom (podtyp nodulární sklerózy). HE 600x.....</i>	<i>14</i>
<i>Obrázek 3.: Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů.. HE 100x</i>	<i>21</i>
<i>Obrázek 4.: Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů. HE 600x</i>	<i>21</i>
<i>Obrázek 5.: Parafínové bloky s lymfatickou uzlinou.....</i>	<i>24</i>
<i>Obrázek 6.: Barvicí přístroj Ventana BenchMark Ultra.....</i>	<i>28</i>
<i>Obrázek 7.: Klasický Hodgkinův lymfom. Pozitivita CD30. 200x.....</i>	<i>30</i>
<i>Obrázek 8.: Klasický Hodgkinův lymfom. Pozitivita CD15. 400x.....</i>	<i>31</i>
<i>Obrázek 9.: CHL CD20 pozitivní v B lymfocytech na pozadí. 600x</i>	<i>31</i>
<i>Obrázek 10.: CHL pozitivita PAX 5. 600x.....</i>	<i>32</i>
<i>Obrázek 11.: CHL pozitivita MUM1. 400x</i>	<i>32</i>
<i>Obrázek 12.: CHL CD3 negativní v nádorových buňkách. 600x</i>	<i>33</i>
<i>Obrázek 13.: CHL CD45 negativní v nádorových buňkách. 600x</i>	<i>33</i>
<i>Obrázek 14.: Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů. CD20 pozitivní. 600x</i>	<i>34</i>
<i>Obrázek 15.: Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů. CD57 pozitivní. 600x</i>	<i>34</i>
<i>Obrázek 16.: NLPHL Pozitivita MUM1. 600x</i>	<i>35</i>
<i>Obrázek 17.: NLPHL CD15 negativní v nádorových buňkách, 600x</i>	<i>35</i>
<i>Obrázek 18.: NLPHL CD30 negativní v nádorových buňkách. 600x</i>	<i>36</i>
<i>Obrázek 19.: NLPHL CD3 negativní v nádorových buňkách. 600x</i>	<i>36</i>
<i>Obrázek 20.: NLPHL PAX 5 slabě pozitivní v nádorových buňkách. 600x</i>	<i>37</i>
<i>Obrázek 21.: NLPHL CD45 pozitivní v nádorových buňkách. 600x.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabulka 1.: Vyšetřené Hodgkinovy lymfomy za rok 2016 a 2017</i>	<i>29</i>
<i>Graf 1.: Výskyt NLPHL v různých věkových kategoriích.....</i>	<i>18</i>