

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**VÝZNAM MORFOLOGIE V DIFERENCIÁLNÍ  
DIAGNOSTICE LYMFOPROLIFERACÍ**

**ADRIANA KAVÁLKOVÁ**

**Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Ilona Fátorová**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2018**



## **Poděkování**

„Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Iloně Fátorové za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování mé bakalářské práce. Děkuji i své rodině za podporu při studiu.“

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 24. 8. 2018

podpis\_\_\_\_\_

## ABSTRAKT

Tato práce se zabývá lymfoproliferativními onemocněními, u kterých může morfologie přispět k diagnóze a urychlit tak diagnostický proces.

Cytomorfologické vyšetření se provádí při každém podezření na patologii krve. Morfologie buněk se hodnotí jak z periferní krve, tak z aspirátu kostní dřeně. Při mikroskopickém vyšetření vzhledu buněk hodnotíme: jejich velikost, tvar a uložení jádra, strukturu chromatinu, přítomnost jadérek, objem a zabarvení cytoplazmy, případně přítomnost granulí, vakuol apod. Je nutné brát v úvahu výsledky dalších laboratorních testů a klinického obrazu. Nejběžnějším nálezem v periferní krvi je reaktivní lymfocytóza a často také přítomnost buněčných atypií. Lymfoproliferace se mohou projevovat nespecifickými klinickými a laboratorními nálezy, které je někdy obtížné správně vyhodnotit.

Morfologie má v procesu rozpoznávání leukemií a lymfomů nadále důležitou roli. Při dnešní klasifikaci zřídka kdy odpoví přímo na otázku, o které konkrétní onemocnění se jedná. Nicméně je to vyšetření stále daleko dostupnější a zpravidla rychlejší, než navazující laboratorní metody a má své místo v řetězci vyšetřování, protože dokáže napovědět lékaři, jak má pokračovat.

Klíčová slova: lymfoproliferace, lymfom, leukemie, morfologie, periferní krev, kostní dřeň

## **ABSTRACT**

This work deals with lymphoproliferative diseases in which morphology can contribute to diagnosis and speed up the diagnostic process.

The cytomorphological examination is performed whenever any hematopathology is suspected. Cell morphology is assessed from both peripheral blood and bone marrow aspirates. We evaluate many parameters during microscopic examination of the cells: size, shape and deposition of the nucleus, chromatin structure, presence of nuclei, cytoplasm volume and colour, the presence of granules, vacuole, etc. The most common finding in peripheral blood is reactive lymphocytosis and often the presence of cellular atypia: e.g. visible nucleus, a distinct fine structure of chromatin, heterogeneity of the nucleus. Lymphoproliferation can be manifested by non-specific clinical and laboratory findings, which are sometimes difficult to properly evaluate. Therefore should be the results of other laboratory tests and clinical picture taken into account too.

Morphology continues to play an important role in the process of recognizing leukaemias and lymphomas. In today's classification responds morphology seldom to the question what disease we looking at. However, the examination is still far more accessible and usually faster than follow-up laboratory methods and has its place in the chain of an investigation because it helps a physician to decide method to continue with.

Keywords: lymphoproliferation, lymphoma, leukaemia, morphology, peripheral blood, bone marrow

# Obsah

1. Úvod .....	8
2. Zadání práce – cíl práce .....	9
3. Fyziologie lymfoidních buněk .....	10
3.1 Vývoj .....	10
3.2 Morfologie lymfocytu .....	10
3.3 Funkce lymfocytu .....	13
3.4 Zastoupení v periferní krvi .....	13
4. Patofyziologie lymfoidních buněk .....	15
4.1 Reaktivní stavy .....	15
4.1.1 Morfologie reaktivně změněných lymfocytů .....	16
4.2 Nádorová onemocnění .....	17
4.2.1 Maligní lymfomy B řady .....	20
4.2.2 Maligní lymfomy T řady .....	32
4.2.3 Hodgkinova choroba .....	35
4.3 Laboratorní průkaz .....	37
4.3.1 Krevní obraz a diferenciální rozpočet leukocytů .....	37
4.3.2 Mikroskopické vyšetření PK a KD .....	38
4.3.3 Cytochemie .....	39
4.3.4 Histopatologické vyšetření .....	39
4.3.5 Průtoková cytometrie .....	40
4.3.6 Genetika .....	41
4.4 Léčba .....	43
4.5 Kazuistika č. 1 .....	45
4.6 Kazuistika č. 2 .....	46
4.7 Kazuistika č. 3 .....	47
5. Diskuze a závěr .....	49
6. Zkratky .....	51
7. Seznamy .....	54
7.1 Seznam tabulek .....	54
7.2 Seznam obrázků .....	55
8. Literatura .....	56

## 1. Úvod

S patologickými stavy, při kterých se mění počet a morfologie lymfocytů, se v hematologické laboratoři zdravotní laborant setkává velmi často. Řadíme do nich infekční stavy a nádory, a právě nádorovými onemocněními lymfoidních buněk se budeme zabývat v následujících kapitolách. U těchto stavů je často zásadní rozpoznat je co nejdříve, aby mohla být případně zahájena včasná a cílená léčba. Významnou úlohu při tom hraje i cytomorfologické posouzení krevních buněk v periferní krvi a kostní dřeni, které v kombinaci s imunohistopatologickým a imunofenotypizačním vyšetřením kostní dřene nám v těchto případech pomáhá buď hned stanovit diagnózu, nebo navádí diagnostiku správným směrem, aby mohla být daná nemoc identifikována.

Morfologie není samospásná, ale má stále významné postavení při stanovení diagnózy některých lymfoproliferací, zvláště těch, které se manifestují v kostní dřeni a periferní krvi, protože se jedná o metodu snadno dostupnou, rychlou a finančně méně náročnou, než je například průtoková fluorescenční cytometrie a metody genetické.



## **2. ZADÁNÍ PRÁCE – CÍL PRÁCE**

Cílem mé práce je stručné připomenutí fyziologie a patofyziologie lymfocytární buňky. Popsat vybraná lymfoproliferativní onemocnění podle WHO klasifikace z roku 2016, u kterých můžeme morfologicky přispět k diagnostice. A následně popsat další metody v případě, že cytomorfologické vyšetření nepostačuje k diagnóze. To celé zasadit do klinického kontextu.

### 3. FYZIOLOGIE LYMFOIDNÍCH BUNĚK

Pro správné odlišení fyziologických lymfoidních buněk od jejich patologií je nejdříve potřeba znát základy fyziologie lymfocytů a jejich morfologii.

#### 3.1 Vývoj

Již v hepatolienálním období vývoje plodu v primárních lymfatických orgánech, od 8. týdne v thymu a v 11. týdnu ve vyvíjející se kostní dřeni společně s dalšími krevními buňkami, probíhá tvorba a vyzrávání prvních lymfoidních buněk. (Hořejší, 2009; Mescher, 2005; Pecka, 2002)

Lymfocyty se vyvíjejí z hematopoetických pluripotentních kmenových buněk (*Hematopoietic Stem Cells*, HSC). HSC se dále diferencují v buňky progenitorové pro lymfoidní větev (*Colony-Forming Unit - lymphocytes*, CFU-L). CFU-L buňky jsou monopotentní, schopné vyvíjet se pouze v prekurzorové lymfoidní buňky. Prekurzorové buňky nejsou mikroskopicky rozlišitelné, řadíme sem prolymfoidní a prelymfoidní stadium lymfocytu a nezralý lymfocyt. Při diferenciaci lymfocytu se vytváří specifické povrchové molekuly, tzv. znaky (*Cluster of Differentiation*, CD markers), podle kterých se lymfocyty rozdělují do tří hlavních skupin – B lymfocyty, T lymfocyty a přirození zabíječi (*Natural Killers cells*, NK buňky), které jsou vývojově bližší T lymfocytům. Každá tato skupina se specificky podílí na funkci imunitního systému. (Mokrý, 1997; Hořejší, 2009; Mescher, 2005)

Než však lymfocyty tyto funkce budou moci splňovat, musí nejprve projít procesem selekce. B lymfocyty v kostní dřeni a T lymfocyty v thymu. Selektce lymfocytů ve zralé imunokompetentní buňky probíhá pomocí jejich specifických receptorů. Účelem selekce lymfocytů je dostatečně reagovat na cizí antigeny a tolerovat antigeny tělu vlastní. (Jílek, 2008)

Od začátku 12. týdne vývoje plodu osidlují zralé lymfocyty sekundární lymfatické orgány, jakými jsou: lymfatické uzliny, tonsily, Peyerovy plaky ve střevě, slizniční lymfatická tkáň (*Mucous Associated Lymphoid Tissue*; MALT), slezina a játra. (Pecka, 2002; Jílek, 2008) Po narození jejich tvorba a vyzrávání přetrvává v kostní dřeni a thymu. K jejich fyziologickému vývoji přispívá také mikroprostředí tvořené okolními buňkami produkující extracelulární matrix, lokální a humorální faktory. (Mescher, 2005)

#### 3.2 Morfologie lymfocytu

Všem buňkám je společné složení buněčného jádra, vyjma zralých erytrocytů, a okolní cytoplazmy ohraničené cytoplazmatickou membránou. Nicméně každá zralá hematopoetická buňka má své charakteristické cytologické rysy. Lymfocyt není výjimkou. U každé buňky popisujeme její velikost, nukleo-cytoplazmatický (N/C) poměr, tvar jádra, vzhled chromatinu. Všímáme si přítomnosti jadérek, obrysů jaderné membrány, a také objemu, obsahu a celkového vzhledu cytoplazmy. (Pecka, 2002)

Mikroskopicky se dají rozlišit lymfocyty malé, velké a velké granulární. Malé lymfocyty v obvodové krvi fyziologicky převažují. Čistě morfologické rozlišení lymfocytů na B, T a NK buněčné subpopulace není možné, ale velké granulární lymfocyty bývají nejčastěji NK buňky. (Pecka, 2002; Pecka, 2006)

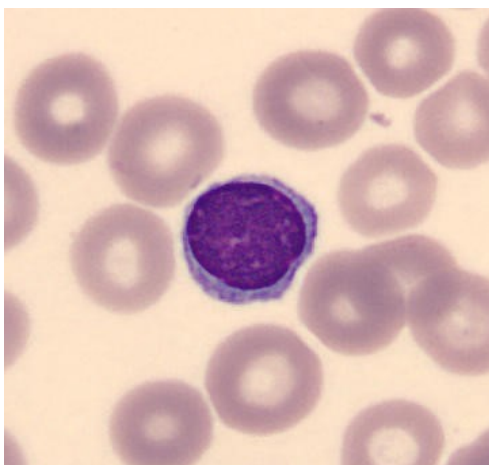
Jádro zralého lymfocytu v periferní krvi má hustě hrudkovitý vzhled chromatinu, ve světelném mikroskopu se jeví jako střídání tmavých hrudek mezi světlejšími oblastmi. Zpravidla bývá okrouhlého tvaru, někdy mírně laločnaté. Cytoplazma lymfocytů bývá ve většině případů modrá (bazofilní) až naředěná. Někdy může být v cytoplazmě přítomna azurofilní granulace. Velikost lymfocytů bývá značně variabilní, a to od 6  $\mu\text{m}$ , tzv. malé lymfocyty až po velké granulární lymfocyty velké až 16  $\mu\text{m}$ . Jadérka bývají viditelná pouze zřídka. (Haferlach, 2014)

### **Malý lymfocyt**

**Vzhled a velikost:** okrouhlý až oválný; 6 – 10  $\mu\text{m}$

**Jádro:** kulaté, oválné s hustě kondenzovaným chromatinem

**Cytoplazma:** tvoří jen tenký lem, bazofilní (Pecka, 2002)



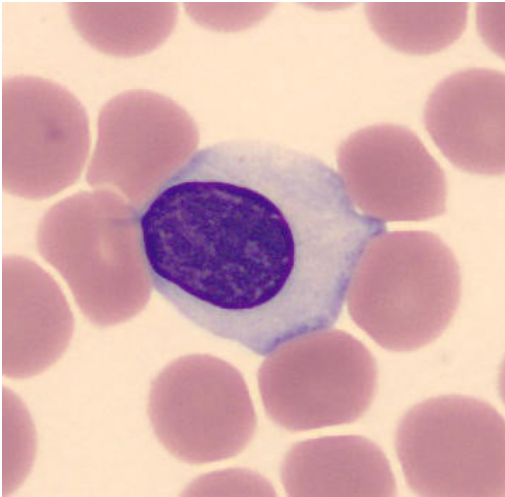
**Obrazek č. 1:** Malý lymfocyt (pořízen na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)

## Velký lymfocyt

**Vzhled a velikost:** okraje vlnité, zploštělé nebo vtlačené; 12 - 16  $\mu\text{m}$

**Jádro:** oválné, méně pravidelné s hutným chromatinem, někdy s jadérkem

**Cytoplazma:** bohatá, lehce bazofilní, někdy vybíhající ve výběžky (Pecka, 2002)



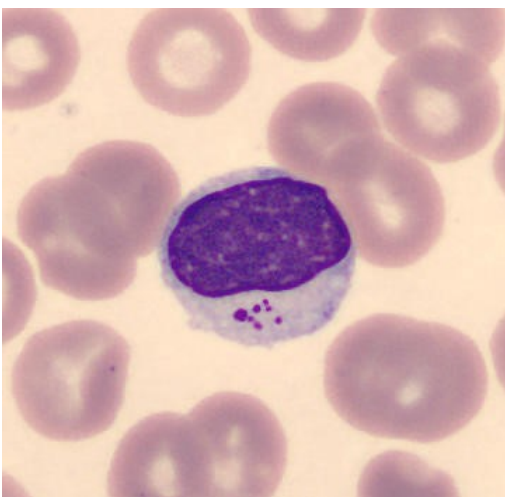
**Obrázek č. 2:** Velký lymfocyt (pořízen na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)

## Velký granulární lymfocyt

**Vzhled a velikost:** velmi podobné velkému lymfocytu

**Jádro:** častěji oválné s hutným chromatinem

**Cytoplazma:** světle bazofilní až oxyfilní s granulemi (Pecka, 2002)



**Obrázek č. 3:** Velký granulární lymfocyt (pořízen na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)

### **3.3 Funkce lymfocytu**

Fyziologickou funkcí imunocytů je účast na modulaci specifické imunitní odpovědi organismu proti cizorodým antigenům. B-lymfocyty, resp. plazmatické buňky, se podílejí na specifické složce humorální imunity, tedy tvorbou tvorbě protilátek proti bakteriím, virům, parazitům nebo při alergických reakcích. T-lymfocyty mají za úkol rozpoznávat antigeny tělu vlastní a cizí a ovlivňovat, (koordinovat), odpověď specifické složky buněčné imunity skrze subpopulace T pomocných (*Th, helper*) a T cytotoxických lymfocytů (*Tc, cytotoxic*). NK-buňky mají přímý cytotoxický efekt, takto chrání organismus například proti nádorovým buňkám. (Mescher, 2005)

Lymfocyty po svém vzniku a selekci přestupují do lymfatického a krevního oběhu a osidlují sekundární lymfatické orgány. V příhodných podmínkách se v nich množí a recirkulují opět do oběhu. Takto se podílejí na efektivním imunitním dohledu a mobilizaci. (Pecka, 2002)

Část B a T lymfocytů se po setkání s antigenem diferencuje v paměťové buňky. Ty jsou zodpovědné za vznik tzv. imunologické paměti. Po dalším setkání se stejným antigenem jsou rychle aktivovány a zahájí sekundární odpověď, která je mnohem rychlejší a efektivnější než odpověď primární. Životnost imunocytů se pohybuje od několika dní a týdnů a až několik let v případě paměťových buněk. (paměťové lymfocyty). (Hořejší, 2009)

### **3.4 Zastoupení v periferní krvi**

Fyziologicky se v periferní krvi nacházejí pouze zralé lymfocyty, které mohou být morfologicky variabilní. Přítomnost nezralých prekurzorových stádií či reaktivně změněných lymfoidních buněk je považováno za patologické. Celkový počet leukocytů a lymfocytů se v periferní krvi do dovršení dospělosti mění.

Ihned po narození je počet lymfocytů v poměru k ostatním leukocytům podobný jako v dospělosti. Poté se jejich relativní počet zvyšuje a dosahuje maxima okolo 1 – 2 let batolete. Fyziologicky jsou leukocyty i lymfocyty zvýšené oproti dospělosti do 15 let dítěte, poté jsou meze již fyziologicky neměnné. Pohlavní rozdíly v celkovém počtu leukocytů a jejich diferenciálním rozpočtu nejsou.

Fyziologické funkční zastoupení všech lymfocytů v periferní krvi je v poměru pro B lymfocyty 20 %, T lymfocyty 70 % a NK buňky 10 %. (Haferlach, 2014)

V následující Tabulce 1 jsou uvedeny fyziologické meze pro celkový počet leukocytů, relativní a absolutní počet lymfocytů od narození po dospělost. Tyto hodnoty jsou platné pro vyšetření pomocí analyzátorů i mikroskopické vyšetření.

**Tabulka 1:** Referenční meze pro analyzátor a mikroskopii, pro celkový počet leukocytů a rozpočet lymfocytů v relativním a absolutním počtu u dětí a dospělých.

Věk	Leukocyty-počet (10 <sup>9</sup> /L)	Lymfocyty %	Lymfocyty (10 <sup>9</sup> /L)
Narození	9,0 – 30,0	21 – 41	1,9 – 2,3
12 hodin	13 – 38,0	16 – 32	2,1 – 12,2
24 hodin	9,4 – 34,0	21 – 41	2,0 – 13,9
2 -7 dní	5,0 – 21,0	31 – 51	1,6 – 10,7
8 – 14 dní	5,0 – 20,0	38 – 58	1,9 – 11,6
15 – 30 dní	5,0 – 19,5	46 – 66	2,3 – 12,9
1 – 6 měsíců	5,0 – 19,5	46 – 71	2,3 – 13,8
0,5 – 1 rok	6,0 – 17,5	51 – 71	3,1 – 12,4
1 – 2 roky	6,0 – 17,5	49 – 71	2,9 – 12,4
2 – 4 roky	5,5 – 17,0	40 – 69	2,2 – 11,7
4 – 6 let	5,0 – 15,5	32 – 60	1,6 – 9,3
6 – 8 let	4,5 – 14,5	29 – 52	1,3 – 7,5
8 – 10 let	4,5 – 13,5	28 – 49	1,3 – 6,6
10 – 15 let	4,5 – 13,5	25 – 48	1,1 – 6,6
nad 15 let a dospělí	4,0 – 10,0	20 - 45	0,8 – 4,0

(Převzato a upraveno z: [www.hematology.cz](http://www.hematology.cz))

## 4. PATOFYZIOLOGIE LYMFOIDNÍCH BUNĚK

Z hlediska patofyziologie lymfocytů se popisují různé stavy, které vedou ke zvýšení či snížení jejich počtu, případně také dochází ke změnám tvaru a vzhledu lymfoidních buněk. Důležité je rozpoznat, zda se jedná pouze o infekční stavy, které svou povahou bývají spíše benigní a za několik týdnů odezní, nebo jestli se změny týkají již nádorových lymfoproliferací.

### 4.1 *Reaktivní stavy*

Tyto stavy je důležité znát jak z hlediska patofyziologického tak i morfologického zejména proto, že se buňky svým chováním a vzhledem mohou někdy podobat maligním a při nedostatečných znalostech mohou být dokonce za maligní buňky zaměněny.

Jsou to situace, kdy se buňky bílé krevní řady na podkladě podráždění imunitního systému z různých příčin aktivují, začínají více proliferovat a na tomto podkladě se může měnit i morfologie směrem k mladším vývojově nezralým stádiím, týkající se granulocytární nebo lymfocytární řady. Při těchto stavech se může zvýšit nebo snížit celkový počet leukocytů. Leukocytóza vyjadřuje zvýšení bílých krvinek nad  $10 \cdot 10^9/L$ , lymfocytózu zvýšení absolutních hodnot nad  $4 \cdot 10^9/L$  u dospělých. Tam, kde dospělí odpovídají neutrofilii, dětský imunitní systém reaguje častěji lymfocytózou, tzn. absolutním počtem nad  $7 \cdot 10^9/L$ . (Pecka, 2006)

Mezi nejčastější příčiny vyvolávající reaktivní stavy s lymfocytózou se řadí infekční virová onemocnění (chřipka, EBV, CMV, HSV, spalničky, zarděnky, primární infekce HIV) a bakteriální onemocnění (brucelóza, černý kašel, břišní tyfus, tuberkulóza). Bývají doprovázené horečkou a zvětšením lymfatických uzlin. Z neinfekčních to mohou být endokrinní choroby (Addisonova choroba, hypotyreóza), při stresu nebo alergiích, idiopaticky u astenických osob. (Rokyta, 2015)

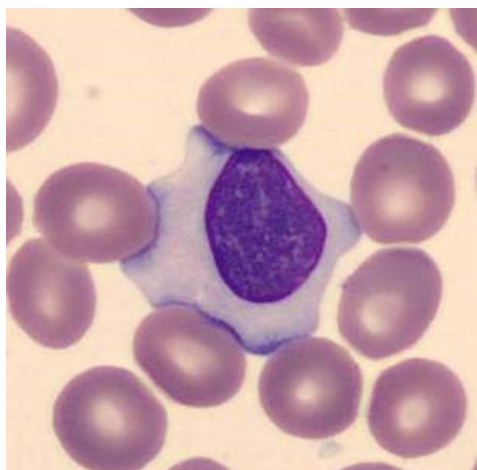
Diagnosticky nejdůležitějšími parametry k odlišení od patologických lymfoproliferací jsou zpravidla neměnné hodnoty erytrocytů, trombocytů a absolutní hodnoty granulocytů. Při mikroskopickém vyšetření převažují buňky mononukleární, morfologicky minimálně změněné, nebo atypické – reaktivní lymfocyty provázející těžší infekční stavy (EBV a CMV infekce, zarděnky, virová hepatitida apod.) s plazmocytoidní transformací či s blastickou transformací. Při imunologickém vyšetření jsou lymfocyty polyklonálního charakteru. (Haferlach, 2014; Rokyta, 2015)

Vzácný jev nazvaný benigní polyklonální lymfocytóza odhaluje stabilní přetrvávající lymfocytózu. Tento fenomén je častěji pozorován u mladých žen, které jsou často kuřačky, a morfologicky je nerozlišitelný od CLL. (Jaffe, 2017)

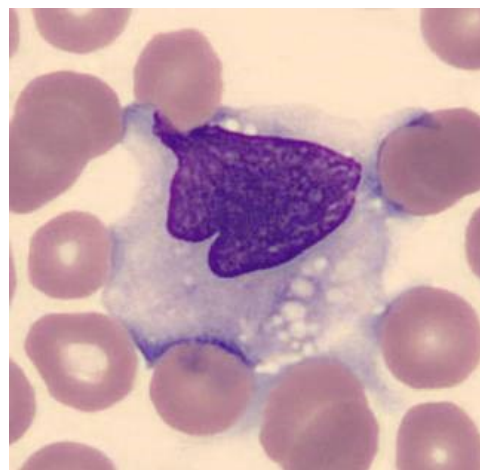
#### 4.1.1 Morfologie reaktivně změněných lymfocytů

Jak již bylo řečeno, dělí se reaktivně změněné lymfocyty na dva možné stavy. První stav je reaktivní lymfocyt až jeho blastická transformace, kdy lymfocyt připomíná nezralou buňku. Dochází ke zvětšení jádra lymfocytu. Chromatinová struktura je více rozvolněná, ale neztrácí hrudkovitý vzhled, často bývá patrné světlejší ostře ohraničené jádérko. Cytoplazma je objemnější, často výběžkovitá, někdy může být vakuolizovaná.

Mezi onemocnění vyvolávající extrémní reaktivní blastickou transformaci se řadí infekční mononukleóza vyvolaná EBV méně často CMV. Jde o onemocnění s poměrně dlouhou inkubační dobou, projevující se nespecifickým horečnatým stavem a difúzním zvětšením lymfatických uzlin. V periferní krvi se zvýší počty leukocytů, minimálně 20 % z nich pak tvoří morfologicky nápadné atypické – reaktivní lymfocyty, tzv. Pfeifferovy buňky připomínající lymfomonocyty. Jedná se většinou o reaktivní T lymfocyty, které reagují proti infikovaným B lymfocytům. Jádro je dvojnásobně větší než běžný lymfocyt s někdy viditelnými jádérky, chromatin méně hutný a cytoplazma objemná, někdy s malými vakuolami. V granulocytární řadě se může objevit lehký posun doleva a zmnožení monocytů bez atypií. (Haferlach, 2014; Pecka, 2006)



Obrázek č. 4a

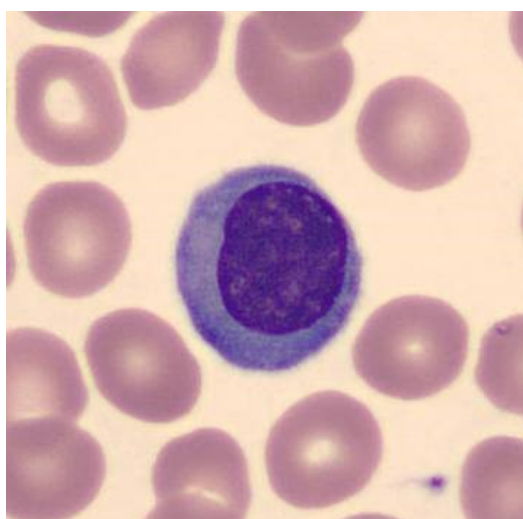


Obrázek č. 4b

**Obrázky č. 4a a 4b:** Reaktivní lymfocyty. 4a Reaktivní lymfocyt při běžné viróze; 4b Reaktivní lymfocyt při mononukleóze (pořízeno na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)



Při plazmocytoïdní transformaci dochází k nápadnému zvětšení lymfocytární buňky s často excentricky uloženým jádrem. Charakteristické je i nabytí cytoplazmy, která se barví více bazofilně než u fyziologického lymfocytu. Celkově buňky připomínají plazmocyty, jde o konečné diferenační stádium B lymfocytů. (Hořejší, 2009) Jejich jádro má loukoťovitě uspořádaný chromatin, je excentricky uložené v cytoplazmě s výrazným perinukleárním prosvětlením. Cytoplazma je obvykle více namodralá, bazofilní, což je způsobeno přítomností většího obsahu ribonukleových kyselin při zvýšené syntéze imunoglobulinů. Někdy může jejich cytoplazma obsahovat vakuoly. (Haferlach, 2014; Kačírková, 2007)



**Obrázek č. 5:** Plazmocyt u virové infekce (pořízen na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)

## **4.2 Nádorová onemocnění**

Na rozvoji hematologických maligních onemocnění se podílí mnoho faktorů, které vedou ke klonální proliferaci transformované buňky a to na úrovni HSC anebo CFU. Mezi faktory, které ovlivní maligní přeměnu těchto buněk, řadíme chromozomální aberace genů, které významně podpoří nekontrolovanou proliferaci, anebo neschopnost podlehnout apoptóze. Dále se podílí role mikroprostředí skrze růstové faktory a signální molekuly přispívající ke stimulaci dělení, či selhání imunitního dozoru, podílejícího se na zničení maligního klonu. (Rokyta, 2015)

Lymfoproliferativní stavy jsou páté nejčastější maligní onemocnění dospělých a první u dětí od dvou do pěti let. Většina z nich, 85 – 90 %, vychází z B řady lymfocytů. Tato heterogenní skupina je klasifikována podle WHO klasifikace hematopoetických malignit, dělíci lymfoproliferativní nádory na choroby vycházející z prekurzorových resp. periferních B či T lymfocytů a NK buněk. Je dosud jedinou platnou klasifikací pro lymfoproliferativní choroby.

Poslední pátá revize proběhla v roce 2016 a byla doplněna o jednotky, které se za osm let od poslední revize podařilo klasifikovat, zařadit a přispět tak k lepší diagnostice a léčbě nemocných. (Belada, 2016; Pizzo, 2016)

Zahrnuje v sobě všechny aspekty ke správnému zařazení neoplazie pomocí morfologických jednotek, cytochemie, imunologie, histopatologie a cytogenetického a molekulárně genetického vyšetření. Zmíněné techniky, více či méně přispívají k přesné klasifikaci onemocnění. (Belada, 2016; Pizzo, 2016)

Celý seznam B a T lymfoproliferací je uveden v následujících tabulkách 2 a 3.

**Tabulka 2: WHO klasifikace 2016 prekurzorových lymfomů B/T-buněčné řady.**

<b>Malignity z prekurzorových B-buněk</b>
B-lymfoblastická leukemie/lymfom, blíže neurčená (B-ALL/LBL)
B-ALL/LBL s rekurentními, genetickými abnormalitami
B-ALL/LBL s t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1
B-ALL/LBL s t(v;11q23); přestavba MLL
B-ALL/LBL s t(12;21)(p13;q22); TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)
B-ALL/LBL s t(5;14)(q31;q32); IL3-IGH
B-ALL/LBL s t(1;19)(q23;q13.3); E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)
B-ALL/LBL s hyperploidii (>50 chromozomů)
B-ALL/LBL s hypoploidii (<46 chromozomů)
- téměř haploidní
- níže hypodiploidní
- téměř diploidní
B-ALL/LBL s intrachromozomální amplifikací chromozomu 21
<b>Malignity z T-prekurzorových buněk</b>
T-lymfoblastická leukemie/lymfom (T-ALL/LBL), blíže neurčená

(Převzato a upraveno: Swerdlow, 2017)

**Tabulka 3: WHO klasifikace 2016 periferních lymfoproliferací.**

Periferní B-lymfomy
<p>Chronická lymfocytární leukemie/ lymfom z malých lymfocytů (CLL/SLL)  <i>Monoklonální B-buněčná lymfocytóza*</i>                      B-prolymfocytární leukemie (B-PLL)                      Splenický lymfom marginální zóny                      Leukemie z vlasatých buněk (HCL)                      Splenický B-lymfom/leukemie, blíže neurčený (SMZL)                      - Splenický difúzní B-lymfom červené pulpy                      - Variantní leukémie z vlasatých buněk (vHCL)                      Lymfoplazmocytární lymfom (LPL)                      - Waldenströмова makroglobulinémie  <i>Nemoc z těžkých řetězců blíže neurčená (MGUS), IgM*</i>                      - μ těžký řetězec (μ HCD)                      - γ těžký řetězec (γ HCD)                      - α těžký řetězec (α HCD)  <i>Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS), IgG/A*</i>                      Plazmocytární myelom                      Solitární plazmocytom kosti                      Extraoseální plazmocytom                      Depozice monoklonálních imunoglobulinů*                      Extranodální lymfom z marginální zóny slizniční lymfoidní tkáně (MALT)                      Uzlinový lymfom z marginální zóny (NMZL)                      - Dětský uzlinový lymfom z marginální zóny                      Folikulární lymfom (FL)  <i>Folikulární neoplázie in situ*</i>                      - <i>Duodenální typ folikulárního lymfomu*</i>                      Folikulární lymfom dětského věku                      Velkobuněčný B-lymfom s IRF4 přestavbou                      Primární kožní lymfom folikulárního centra (PCFCL)                      Lymfom z plášťových buněk (MCL)                      - <i>Neoplázie z plášťových buněk in situ*</i>                      Difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL), NOS                      - <i>B-buněčný typ terminálního centra* (GC)</i>                      - <i>B-buněčný typ aktivovaný*</i>                      Velkobuněčný lymfom bohatý na T-lymfocyty a histiocyty (THRBCL)                      Primární DLBCL centrálního nerovového systému                      Primární kožní DLBCL „leg type“  <i>EBV pozitivní DLBCL, NOS*</i>  <i>EBV pozitivní mukokutánní ulcerace*</i>                      DLBCL spojený s chronickým zánětem                      Lymfomatoidní granulomatóza                      Primární mediastinální (thymický) velkobuněčný lymfom (PMBL)                      Intravaskulární velkobuněčný B-lymfom                      ALK-pozitivní velkobuněčný lymfom                      Plazmoblastický lymfom                      Primární exsudativní lymfom (PEL)  <i>Velkobuněčný B-lymfom vznikající v HIV8-asociované multicentrické Castelmanově nemoci*</i>                      Burkittův lymfom                      Burkittův lymfom s 11q aberací???  <i>High-grade B-lymfom, s MYC a BCL2 a/nebo BCL6 přesmykem*</i>  <i>High-grade B-lymfom, NOS*</i>                      B-lymfom s rysy intermediátními mezi DLBCL a CHL</p>

Periferní T a NK-lymfomy
<p>T-prolymfocytární leukemie (T-PLL)  Leukemie z velkých granulárních T-lymfocytů (T-LGL)  Chronické lymfoproliferativní onemocnění z NK-buněk  Agresivní leukemie z NK-buněk  <i>Systémové EBV-pozitivní T-lymfoproliferativní onemocnění dětského věku*</i>  <i>Lymfom vzhledu hydroa vacciniiforme*</i>  Adultní T-leukemie/lymfom (ATLL)  Extranodální NK/T-lymfom, nazální typ  Enteropatický T-lymfom (EATL)  <i>Monomorfní epiteliotropní intestinální T-buněčný lymfom*</i>  <i>Indolentní T-buněčná lymfoproliferativní porucha gastrointestinálního traktu*</i>  Hepatosplenický T-lymfom (HSTL)  Podkožní panikulitický T-lymfom (SPTCL)  Mycosis fungoides (MF)  Sézaryho syndrom (SS)  Primární kožní CD30-pozitivní T-lymfoproliferace  - Lymfomatoidní papulóza  - Primární kožní anaplastický velkobuněčný lymfom (C-ALCL)  Primární kožní gama/delta T-lymfom  Primární kožní CD8-pozitivní agresivní epidermotropický cytotoxický T-lymfom  <i>Primární kožní akrální CD8-pozitivní T-lymfom*</i>  <i>Primární kožní CD4-pozitivní T-lymfom z menších a středně velkých buněk*</i>  Periferní T-lymfom, blíže neurčený (PTCL, U)  Angioimunoblastický T-lymfom (AITL)  <i>Folikulární T-lymfom*</i>  <i>Uzlinový periferní T-lymfom s TFH fenotypem*</i>  Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) ALK-pozitivní  Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) ALK-negativní  <i>Anaplastický velkobuněčný lymfom související s prsními implantáty*</i></p>
Hodgkinův lymfom
<p>Nodulární Hodgkinův lymfom s predominancí lymfocytů (NLPHL)  Klasický Hodgkinův lymfom (CHL)  - Klasický Hodgkinův lymfom, nodulární skleróza (NSCHL)  - Klasický Hodgkinův lymfom, smíšená buněčnost (MCCHL)  - Klasický Hodgkinův lymfom, bohatý na lymfocyty (LRCHL)  - Klasický Hodgkinův lymfom, deplece lymfocytů (LDCHL)</p>

Neoplázie označené kurzivou a symbolem \* jsou nově přidané a klasifikované.  
*(Převzato a upraveno: Swerdlow, 2016)*

#### 4.2.1 Maligní lymfomy B řady

Maligní lymfomy B řady se člení na prekurzorové B-ALL/B-LBL a periferní B-leukemie/lymfomy. V každé lymfoproliferaci je zmíněna možná příčina vzniku, hlavní příznaky doprovázející onemocnění, morfologické znaky nádorových buněk v periferní krvi (PK) a kostní

dřeni (KD), histopatologické, imunologické a genetické vyšetření, které je dnes u většiny hematologických malignit neodmyslitelnou součástí diagnostiky.

#### **4.2.1.1 Prekurzorová lymfoblastická leukemie B/lymfoblastický lymfom B**

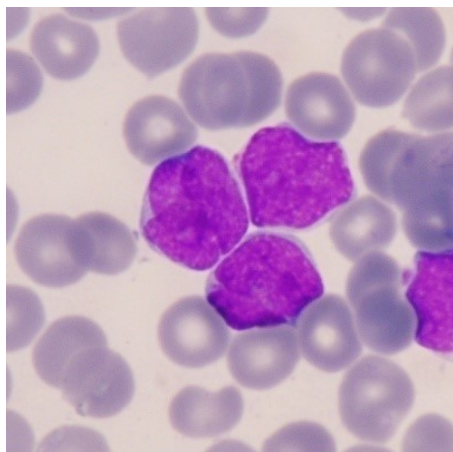
ALL postihuje z 80 % děti mezi 2-5 roky, z 20 % postihuje dospělé častěji po 50. roce života. Na B-LBL připadá pouze 10 % všech prekurzorových lymfomů (většina je T-buněčné řady), nejvíce se objevuje u mladých jedinců kolem 20. roku. (Jaffe, 2017) Příčina vzniku onemocnění dosud není přesně známa. Podílejí se na nich faktory vnitřního a vnějšího prostředí. Zvýšený výskyt byl popsán i u některých vrozených syndromů, například Downův syndrom, Fanconiho anémie, neurofibromatóza aj. Z faktorů vnějšího prostředí mají vliv na vznik onemocnění organická rozpouštědla, chemoterapeutika například alkylační cytostatika, ale také ionizující záření. (Adam, 2001)

Při rozvoji onemocnění dochází k postupnému zhoršování celkového stavu. Pacient pociťuje únavu, slabost, bolest kostí a kloubů, nechutenství. Z objektivních příznaků může být viditelná bledost kůže a sliznic, výrazný úbytek na váze, lymfadenopatie, petechie a horečka. Někdy se mohou přidružit i příznaky z postižení jednotlivých orgánů, zejména hepatomegalie, splenomegalie, postižení CNS. Všechny tyto nespecifické známky jsou způsobeny infiltrací kostní dřene a orgánů lymfoblasty narušujícími jejich fyziologickou funkci. V krevním obraze může být přítomná leukopenie, leukocytóza i normální rozpočet bílých krvinek, rozvíjí se anémie a trombocytopenie. (Mayer, 2002)

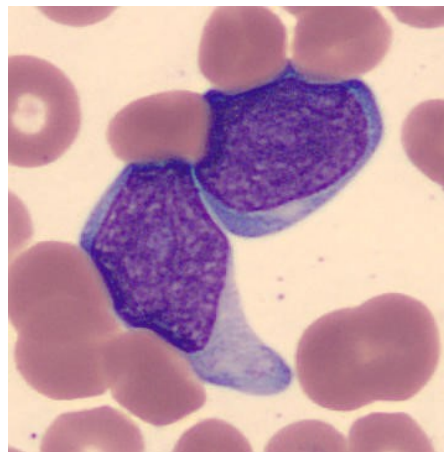
Morfologické vyšetření periferní krve a kostní dřene zůstává podstatnou součástí B-ALL a B-LBL diagnostiky. Prekurzorové buňky mohou být heterogenní. Rozpoznání lymfoblastů je důležité pro stanovení předběžné diagnózy. (Jaffe, 2017)

Mezi nejstarší morfologické klasifikační schéma pro ALL se řadí FAB klasifikace, která na základě cytologických rysů buněk rozděluje ALL na tři typy L1, L2 a L3 uvedené v tabulce 4. Do L1 typu se řadí malé, většinou uniformní lymfoblasty s vysokým N/C poměrem, pravidelným tvarem jádra s homogenním až mírně kondenzovaným chromatinem, bez výrazně viditelných jadérek. Cytoplazma bývá slabě bazofilní, a tvoří úzký lem kolem jádra. Někdy mohou být přítomné vakuoly. U ALL typu L2 bývají blasty větší a více pleomorfní. N/C poměr je proměnlivý, jádro často nepravidelného tvaru, struktura chromatinu bývá také variabilní. Jadérka jsou velká a zřetelně viditelná. Cytoplazma je objemnější než u L1 typu a různého stupně bazofilie, vzácně také s obsahem azurofilních granul anebo vakuol. Pro L3 typ ALL jsou lymfoblasty homogenní a N/C poměr není tak vysoký jako u L1. Jádro bývá pravidelné, okrouhlé až oválné, chromatin

s jemně retikulární strukturou se zřetelnými jádérky v počtu jednoho a více, někdy připomínající měchýřky, cytoplazma je sytě bazofilní, výrazně vakuolizovaná. V nátěru periferní krve nebo kostní dřeně jsou viditelné mitózy buněk a apoptická tělíčka. Dnes je známo, že pro L3 typ naprostá většina buněk odpovídá zralému B-fenotypu pro Burkittův lymfom. (Haferlach, 2014)



Obrázek č. 6a



Obrázek č. 6b

**Obrázky č. 6a a 6b:** Leukemické lymfoblasty. 6a Lymfoblasty morfologického typu L1; 6b Lymfoblasty morfologického typu L2, levý lymfoblast vzhledu „hand mirror“ (pořízeno na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)

**Tabulka 4: FAB klasifikace ALL**

	<b>ALL typ L1</b>	<b>ALL typ L2</b>	<b>ALL typ L3</b>
<b>Velikost buněk</b>	malé	heterogenní	velké, homogenní
<b>Tvar jádra</b>	pravidelný, okrouhlý	nepřavidelný, se zářezy, přeložený	pravidelný, okrouhlý, kulatý
<b>Struktura jaderného chromatinu</b>	homogenní, někdy kondenzovaný	heterogenní	jemně retikulární
<b>Jadérka</b>	nevýrazná, nenápadná	zřetelná, výrazná, velká	výrazná
<b>Objem cytoplazmy</b>	minimální	často objemná	středně objemná
<b>Bazofilie cytoplazmy</b>	slabá až střední	variabilní	silná
<b>Vakuolizace cytoplazmy</b>	variabilní	variabilní	výrazná

(Převzato: Kačírková, 2007)

Při histopatologickém vyšetření bývá kostní dřev téměř vždy hypercelulární. Tvořená převážně nádorovou masou buněk s různě intenzivní mitotickou aktivitou, které difúzně utlačují zdravou krvetvornou tkáň. Samotné morfologické rozdělení v klasifikaci ALL má jen malou klinickou i prognostickou hodnotu, protože nekorelují s žádným specifickým fenotypem, vyjma typu L3. Někdy se mohou v PK a aspirátu KD vyskytovat buňky, jejichž cytoplazma vybíhá v charakteristický výběžek na jednom pólu nazývaného jinak uropod a připomínají tak „ruční zrcátko“ („hand mirror cells“). Vznik tohoto výběžku se připisuje k tvorbě imunokomplexů, a vyskytovat se mohou například u mononukleózy a B-ALL. (Jaffe, 2017)

Pro ověření lymfoidní řady se hojně v minulosti používaly cytochemické testy na myeloperoxidázu (MPO), esterázu a barvení na Sudanovou čern B (SBB), které byly pro B-ALL/B-LBL negativní. PAS reakce jako jedna z dalších cytochemických technik se využívá také pro odlišení B-lymfoblastové buněčné řady svou výraznou blokovou pozitivitou oproti T-buněčné řadě. Nicméně i přesto je cytochemické vyšetření značně nespecifické a ustoupilo do pozadí mnohem průkaznějším technikám. (Kačírková, 2007)

Imunofenotypizační vyšetření je pro potvrzení příslušnosti buněk B-buněčné linie a určení stadia zralosti lymfoblastů obligatorní (kapesní atlas). Imunologicky se prekurzorové B-ALL/B-LBL dělí na subtypy **Early precursor B-ALL**, **Common ALL**, **Pre-B-ALL**, dále sem spadá ještě **zralá B-ALL** neboli **Burkittův lymfom**. B-buněčná linie má svůj imunofenotyp, tzv. CD znaky, cytoplazmatické či povrchové imunoglobuliny (cyIg,slg), které postupně s vyzáváním buňky přibývají. Pro každý subtyp prekurzorové lymfoproliferace existuje hlavní diferenciací znak. Pro zařazení do lymfoidní řady je společných naopak více znaků. Rozdíl mezi prekurzorovými a zralými buňkami je znak pro lehké řetězce imunoglobulinu  $\kappa$  a  $\lambda$  na povrchu cytoplazmy *slg+*. V níže uvedené tabulce 5 je uveden přehled. (Kačírková, 2007)

**Tabulka 5: Imunologická klasifikace B-lymfoblastické leukemie**

Typ B-ALL	Podtyp	Hlavní odlišující znaky
prekurzorová B-ALL	early precursor B-ALL	<b>CD10-</b>
	common-ALL	<b>CD10+</b>
	pre-B-ALL	<b>cyIgM+</b>
zralá B-ALL/Burkittův lymfom		<b>slg+</b>
Liniově společné znaky: CD19, cyCD22, cyCD79a, HLA-DR		

+ pozitivita; - negativita; c-ALL: common-ALL; cy: cytoplazma; s: „surface“, povrchová exprese.  
(Převzato a upraveno: Kačírková, 2007)

Cytogenetickými a molekulárně genetickými vyšetřeními se sleduje přítomnost kvantitativních abnormalit typu hyperploidie, hypoploidie a kvalitativních abnormalit příkladu Philadelphského chromozomu t(9;22), pozitivita BLC-ABL genu a dalších. Obecně do prognosticky nepříznivých se řadí hypoploidie, část hyperploidií s MLL genetickou abnormalitou, t(9;22), t(4;11) a další. (Adam, 2001; Haferlach, 2014; Jaffe, 2017)

Při diferenciální diagnostice musíme pomýšlet i na infekční onemocnění a na lymfoproliferace, které mají podobnou morfolonii jako prekurzorové buňky. Do této skupiny patří například bilineární akutní leukemie a prolymfocytární leukemie. (Adam, 2001)

#### **4.2.1.2 Chronická lymfocytární leukemie / lymfom z malých lymfocytů**

B-CLL/SLL je nejčastější leukemií dospělých ve věku nad 65 let, s nejvyšší prevalencí od 70-79 let. Častěji postihuje muže. Jedná se o klonální proliferaci malých zralých B lymfocytů v periferní krvi a kostní dřeni, játrech, slezině či jiných orgánech. SLL je tzv. aleukemická forma s primárním výskytem v uzlinách. Diagnostickým kritériem pro klasifikaci CLL je přítomnost monoklonální lymfocytózy s hodnotami více než  $5 \cdot 10^9/L$  v PK s CLL imunofenotypem CD5+, CD23+ a CD19+, se slabou expresí lehkých řetězců  $\kappa/\lambda$  a těžkých řetězců IgM/IgD. Při SLL lymfocytóza bývá naopak spíše do  $5 \cdot 10^9/L$ . Lymfocytóza je způsobená jak klonální proliferací tak poruchou apoptózy buněk. (Adam, 2001; Kačírková, 2007)

Příčina vzniku dosud není úplně známá. Přes dlouholeté studie, například expozice radiačnímu záření, infekce známými viry či léčba alkylačními cytostatiky, se zvýšený výskyt CLL neprokázal. Vyšší riziko rozvoje onemocnění se popisuje pouze při manipulaci s chemickými látkami u pracovníků v zemědělském nebo ropném průmyslu. (Jaffe, 2017)

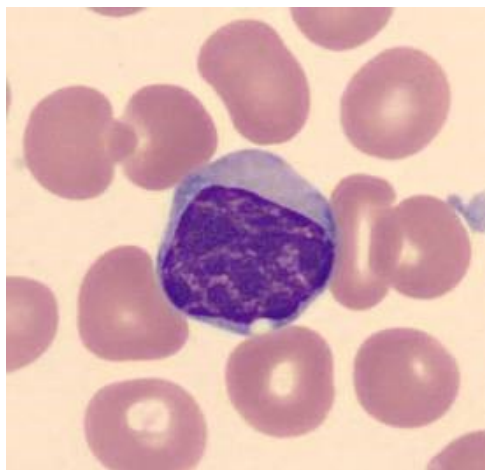
Klinický průběh CLL/SLL je u většiny pacientů asymptomatický a často je onemocnění náhodně diagnostikované při rutinním vyšetření krve. Onemocnění trvá roky až desetiletí. U většiny pacientů se objevuje generalizovaná lymfadenopatie, hepatosplenomegalie, symptomy spojené s cytopenií (únava, krvácení, slabost nebo recidivující infekční onemocnění). Přibližně u 2-10 % pacientů s CLL/SLL dojde v průběhu nemoci k transformaci v agresivnější formu (nejčastěji DLBCL, Hodgkinův lymfom) či v prolymfocytární leukemii. Pro uvedenou transformaci se používá označení Richterův syndrom. Pro určení prognózy onemocnění se sleduje progrese lymfocytózy každý rok. Vždy je důležité pečlivě sledovat morfolonii buněk v PK. Přítomnost zvýšené hladiny thymidinkinázy, laktátdehydrogenázy (LDH),  $\beta_2$ -mikroglobulinu,



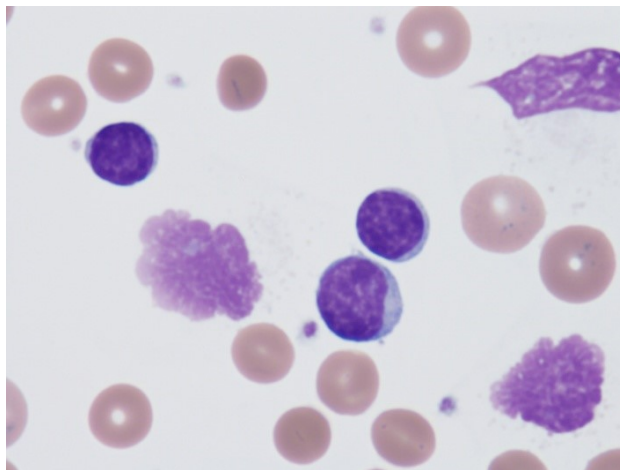
exprese CD38, CD49d, ZAP-70 a zvýšení počtu lymfocytů na dvojnásobek za 12 měsíců jsou ukazatele špatné prognózy. Geneticky má 80 % všech CLL abnormální karyotyp. Bývá přítomnost trizomie 12. chromozomu, delece postihující geny p53, ATM. (Adam, 2001; Kačírková, 2007; Jaffe, 2017)

Část maligních buněk mohou tvořit velké prolymfocyty a paraimmunoblasty. Morfologicky lze CLL/SLL rozdělit podle vzhledu lymfocytů na tzv. **typickou CLL**, lymfocyty jsou malé, kulaté, uniformního vzhledu a maximálně dvakrát větší než erytrocyty. Jádro bývá lehce excentricky uložené, okrouhlé. Chromatin je hutný, tvořící hrudkovitou strukturu, připomínající mozaiku. Jadérka nejsou zřetelná. Cytoplazma tvoří jen jasně ohraničený úzký lem a je slabě bazofilní. Může obsahovat granula a vzácněji vakuoly. Podíl prolymfocytů je u typické CLL maximálně do 10 % ze všech lymfoidních buněk v PK. Lymfocyty při CLL jsou fragilní, a tak je v nátěru PK i KD přítomno velké množství rozpadlých buněk tzv. Gumprechtových stínů. Druhá tzv. **atypická CLL**, nebo také smíšeně buněčná CLL, zahrnuje dvě varianty. V první mohou být v PK vidět lymfocyty s prolymfocyty do 55 % z celkového počtu lymfocytů, tzv. CLL/PL, anebo jsou lymfocyty vzhledově heterogenní, různě velké s různě objemnou cytoplazmou. Jádro je nepravidelné, přeložené, zvláště rozštěpené. Chromatin není typicky hrudkovitý. U této varianty je zastoupení prolymfocytů menší, a také morfologicky variabilnější. Histopatologické vyšetření kostní dřeně pro diagnostiku není nezbytné, ale je užitečné v určení rozsahu úbytku krvetvorné tkáně a typu infiltrace maligními buňkami, která může být intersticiální, modulární, smíšená nebo difúzní. (Haferlach, 2014; Jaffe, 2017)

Diagnostika a klasifikace onemocnění se opírá o anamnestické údaje, výsledky krevního obrazu, morfologie PK, případně i KD, histologii uzlin a imunofenotypizaci pro odlišení od folikulárního lymfomu, lymfomu z pláštěvé zóny a prolymfocytární leukemie. (Haferlach, 2014)



Obrázek č. 7a



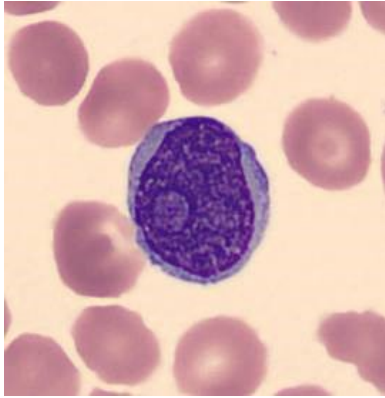
Obr. 7b

**Obrázky č. 7a a 7b:** 7a Malý lymfocyt při CLL; 7b Gumprechtovy stíny při CLL (pořízeno na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)

#### **4.2.1.3 Prolymfocytární leukemie**

B-prolymfocytární leukemie (B-PLL) je podle WHO klasifikace definována jako klonální proliferace B-prolymfocytů postihujících kostní dřeň, periferní krev a slezinu. Infiltraci lze nalézt také v játrech. V periferní krvi bývá výrazná lymfocytóza s hodnotami nad  $100 \cdot 10^9/L$  a více. Počet prolymfocytů v PK překračuje 55 % všech lymfoidních buněk. Současně bývá přítomná anémie a trombocytopenie. Častěji postihuje starší věkové skupiny kolem 67 let a muže. B-PLL je vzácná, vyskytuje se v rozmezí 1-10 % všech lymfoproliferací ze zralých buněk. B-PLL častěji vede k transformaci v agresivnější typy lymfoproliferativních chorob. Při diagnostice onemocnění je potřeba zahájit chemoterapii, při výrazném postižení sleziny se doporučuje její chirurgické odstranění nebo ozáření. (Adam, 2001; Mayer, 2002)

Pro odlišení od CLL je důležité klinické vyšetření pacienta, cytomorfolgie PK a KD a stanovení imunofenotypu. V nátěru periferní krve a aspirátu kostní dřeně u B-PLL jsou prolymfocyty středně velké buňky maximálně dvakrát větší než malý lymfocyt, s okrouhlým jádrem a méně kondenzovaným chromatinem než u lymfocytů CLL. V jádře je výrazně viditelné kulaté jádro. Cytoplazma prolymfocytů je objemnější, méně bazofilní a agranulární. Při histopatologickém vyšetření KD je viditelná masivní difúzní infiltrace. Pro B-PLL je společná pozitivita znaků CD19, CD20, CD24, CD37, CD 43, CD79b, FMC7, povrchový imunoglobulin IgM/IgD a lehké řetězce ( $\kappa/\lambda$ ). Densita těžkých řetězců je výrazně vyšší než u B-CLL. Znaky CD5 a CD23 jsou zpravidla negativní a odlišují B-PLL od B-CLL. Pozitivita znaku CD5 je popisována některými autory u třetiny případů B-PLL, které mohou pocházet z B-CLL. U části případů se popisuje exprese ZAP-70 bez evidentní prognostické korelace. Až u 60 % pacientů se vyskytují chromozomální aberace. Časté je postižení lokusu pro p53 na 17. chromozomu p-raménka. V případě pozitivní t(11;14) často s expresí CD5 se řadí mezi podtyp lymfomu z plášťových buněk (MCL) s prolymfocytoidními rysy. (Mayer, 2002; Haferlach, 2014; Jaffe, 2017)



**Obrázek č. 8:** Prolymfocyt (pořízen na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)

#### **4.2.1.4 Leukemie z vlasatých buněk**

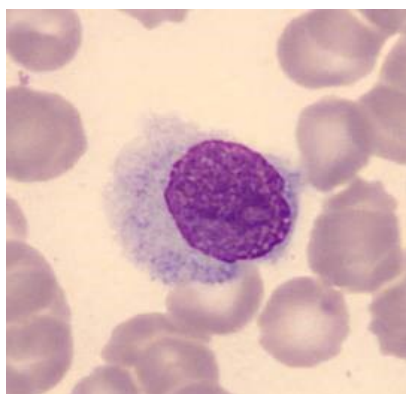
Leukemie z vlasatých buněk (*Hairy cell leukaemia* – HCL) je vzácné pomalu progredující onemocnění, s přítomností lymfocytů v PK, KD, játrech a pro něž je typické výraznější postižení sleziny s afinitou k infiltraci červené pulpy. Z nedostatku hematopoetických růstových faktorů a produkce tlumivých cytokinů se rozvíjí pancytopenie. Z těchto důvodů pacienti s HCL často trpí rekurentními infekčními onemocněními a hořečnatými stavy z defektu imunity. Postihuje spíše mužské pohlaví v poměru muž/žena 4:1 průměrně kolem 55. roku života, u dětí se nevyskytuje. Na rozvoji se mohou podílet faktory vnějšího prostředí a genetická zátěž. Byly popsány případy spojené s haplotypem HLA-A1, B7. Většina případů vzniku je spíše idiopatická. (Chrobák, 1999; Jaffe, 2017)

K diagnostice onemocnění se provádí nátěr PK, KD a histopatologické vyšetření KD. Aspirace KD je obtížná, někdy nemožná díky fibrotizaci. Mikroskopicky jsou lymfocyty středně velké buňky s centrálně nebo lehce excentricky uloženým jádrem. Tvar jádra je okrouhlý nebo oválný někdy fazolovitý až prstenčitý. Chromatin má jemnou vláknitou strukturu často bez patrného jadérka, nebo jen s jedním jadérkem. Cytoplazma je variabilně objemná, neohraničená, lehce bazofilní žilkovité struktury, vybíhající v charakteristické vláskovité výběžky po celém svém povrchu. Někdy může obsahovat vakuoly nebo inkluze. Výběžky jsou nejlépe patrné v elektronovém mikroskopu. (Kačírková, 2007)

„Vlasaté“ lymfocyty exprimují antigeny CD19, CD20 a CD22 asociované s B-buňkami, charakteristicky jsou také pozitivní CD103, CD25, CD11c, CD123, DBA44, annexin A1 a cytochemický test na tartarát rezistentní kyselou fosfatázu (TRAP). U většiny HCL lymfocytů se vyskytuje bodová mutace onkogenu BRAF V600E, a klonální přestavba genů pro imunoglobuliny, která se ověří genetickými testy, například pomocí PCR. (Jaffe, 2017)

Podobnou morfologii a expresi povrchových znaků mají lymfoproliferace řadící se dle WHO klasifikace 2016 mezi splenický B-lymfom/leukemie, blíže neurčený (SMZL), kam se řadí splenický difúzní B-lymfom červené pulpy a variantní HCL (vHCL). Pomocí genetiky se odliší také lymfom z marginální zóny.

Vzor HCL v kostní dřeni je vysoce charakteristický a je odlišný od ostatních malých B-buněčných lymfomů. Dobrá biopsie jádra kostní dřene je nezbytná, protože aspirát kostní dřene je často špatně buněčný nebo nedosažitelný kvůli fibróze dřene. Není-li možno dosáhnout aspirace, diagnostický HCL imunofenotyp lze obvykle prokázat v periferní krvi, protože cirkulující neoplastické buňky jsou přítomny u všech pacientů. Vyšetření periferní krve a kostní dřene (včetně imunofenotypizace) pomáhá při přesném rozlišení MALT lymfomu. (Kačírková, 2007; Jaffe, 2017)



**Obrázek č. 9:** „Vlasatá buňka“ (pořízen na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)

#### **4.2.1.5 Burkittův lymfom**

Burkittův lymfom (BL) je podle aktuální WHO klasifikace považován za vysoce agresivní lymfoproliferativní onemocnění, které se projevuje mimouzlinovým postižením nebo jako akutní leukemie. BL je dnes členěn do tří klinických variant: endemický BL, sporadický BL a BL asociovaný s imunodeficientními stavy. Varianty se liší v anatomické lokalizaci primárního nádoru, jemnými rozdíly v morfologii, expresi části povrchových znaků a variabilní molekulární genetikou. Lymfom je charakterizován středně velkými B-buňkami s bazofilní cytoplazmou a vysokým mitotickým indexem a s translokací chromozomu 8 (8q24) postihující MYC gen. Na vzniku BL se také podílí infekce EBV. (Jaffe, 2017; Longo, 2010)

Endemický BL se typicky vyskytuje v rovníkové Africe a Nové Guinei, kde je také souběžně vyšší výskyt malárie. Tato forma BL je spojená s nákazou EBV, s chronickou antigenní stimulací a supresí imunitního systému vyvolanou perzistující malarickou infekcí. Postihuje

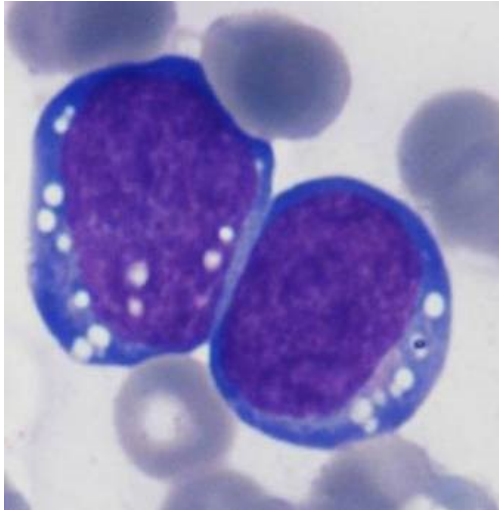
především děti ve věku 4-10 let s vyšší prevalencí u chlapců. Nádor nejčastěji postihuje čelist, očníci či jiné obličejové kosti. Postižení PK a KD u této formy BL nebývá. (Jaffe, 2017)

Sporadický BL se vyskytuje po celém světě u dětí a mladých dospělých. Tato varianta BL postihuje častěji dutinu břišní v ileocekální oblasti. Mohou být postiženy vaječníky, ledviny, slinivka břišní i prsy. EBV pozitivita bývá jen asi u 10-30 % pacientů. Možná je i leukemizace lymfomu v tzv. „bulky disease“ či přechod do formy akutní leukemie, podle FAB klasifikace označována jako L3-ALL s postižením PK a KD s charakteristickou morfologií nádorových buněk. (Jaffe, 2017)

BL asociovaný s imunodeficity se primárně projevuje ve spojení s HIV infekcí a AIDS, kde každý třetí lymfom je BL. Výskyt u pacientů AIDS v posledních letech klesá díky antiretrovirové terapii. U této formy jeví buňky atypické cytologické znaky s často plazmocytoidní diferenciací. Jádro těchto buněk je mírně excentricky uložené s výrazným, centrálně uloženým jadérkem. Cytoplazma je silně bazofilní a můžeme v ní prokázat cytoplazmatický monoklonální imunoglobulin. Postižení KD bývá časté. (Kačírková, 2007; Jaffe, 2017)

Lymfomové buňky v KD a PK jsou středně velké, s relativně uniformním vzhledem. Jádro je většinou okrouhlé až oválné s jemnou strukturou chromatinu a zřetelnými jadérky v počtu 1 – 5. Cytoplazma je objemnější, silně bazofilní a často vakuolizovaná, někdy s přítomností lipidů (cytochemický průkaz olejovou červení O, imunohistochemicky adipofilinem). Tyto vakuoly jsou nejlépe vidět v otiskových preparátech lymfatických uzlin nebo v nátěrech z aspirátů KD. (Yang)

Příslušnost buněk k BL při imunofenotypizačním vyšetření je určena expresí znaků CD19, CD20, CD79a, CD10, BCL6 a sIgM s restrikcí lehkých řetězců. Znaky CD5, CD23, CD34, cyklin-D1 a TdT pro vývojově nezralá stadia buněk jsou negativní. CD21 pozitivita odlišuje endemickou formu od sporadické. Exprese proliferačního znaku Ki-67 je téměř ve 100 % buněk BL. Genetické vyšetření prokáže klonální přestavbu genu MYC, ze 75-80 % s translokací t(8;14)(q24;q32), nebo t(8;14)(q24;q11), či t(2;8)(p12;q24). Existuje velmi vzácná translokace BL t(8;14;22). (Kačírková, 2007; Jaffe, 2017)



**Obrázek č. 10:** Buňka Burkittova lymfomu s vakuolizací cytoplazmy i jádra (pořízen na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)

#### **4.2.1.6 Plasmocytární myelom**

Plasmocytární myelom (mnohočetný myelom, MM) je onemocnění, charakterizované klonální proliferací plazmatických buněk odvozených z B lymfocytů primárně postihující kostní dřeň. Dochází k invazivnímu osteolytickému poškození vedoucí k bolesti kostí a patologickým frakturám. Buňky produkují monoklonální imunoglobulin prokazatelný v séru anebo v moči. Rozvíjí se insuficience ledvin z nadprodukce lehkých řetězců (Bence Jonesova bílkovina) a anémie. Onemocnění postihuje starší pacienty nad 50 let. (Adam, 2001; Kyle, 2009)

Diagnóza myelomu se provádí kombinací klinických, morfoloických, imunologických a radiografických vyšetření. Kritéria pro stanovení diagnózy se řídí WHO modifikací dle Durieho a Salmona, která kladou důraz na klinické výsledky, viz následující tabulka 6, a podle kritérií International Myeloma Working Group (IMWG) kladou větší důraz na symptomy, které provázejí MM (Hematoonkologický atlas). Mezi klasické symptomy doprovázející MM patří bolest kostí, zejména bederní páteře, patologické fraktury kostí, časté infekce způsobené imunopresí, anémie, trombocytopenie, nefropatie, polyneuropatie a otoky končetin. (Adam, 2001; Jaffe, 2017)

Pro stanovení přítomnosti monoklonálních imunoglobulinů (M-komponenta, paraprotein) slouží elektroforéza a imunofixace séra a moči, přítomnost Bence-Jonesovy bílkoviny. Krevní obraz s diferenciálním rozpočtem, biochemické stanovení koncentrace kalcia a kreatinu. Cytomorfologické, imunofenotypizační a genetické vyšetření PK a KD. Neméně důležité je radiologické vyšetření pomocí CT, MRI či PET-CT. (Adam, 2001)

Plazmocytární myelom je členěn na několik variant, které se lehce liší v klinickém nálezu u pacientů a progresí onemocnění, ne však morfologickými aspekty. Řadí se sem nesekreční myelom, asymptomatický (doutnající „*smouldering myeloma*“) a plazmocytární leukemie. (Kačírková, 2007)

**Tabulka 6: Diagnostická kritéria plazmocytárního myelomu podle Durieho a Salmona, 1975.**

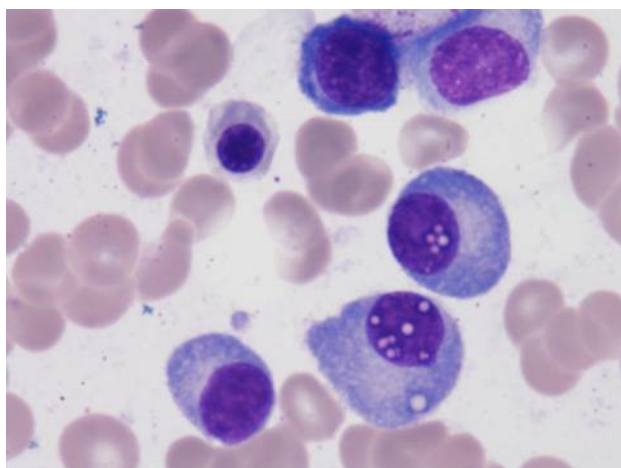
Velká kritéria	Malá kritéria
<b>1)</b> počet plazmocytů v KD $\geq 30\%$	<b>a)</b> počet plazmocytů v KD 10-30 %
<b>2)</b> plazmocytom v biopsii	<b>b)</b> koncentrace M-Ig nižší než v 3
<b>3)</b> koncentrace monoklonálního imunoglobulinu (M-Ig) v séru:  M-IgG > 35 g/l; M-IgA > 20 g/l  koncentrace monoklonálního imunoglobulinu v moči: množství lehkých řetězců/24hod >1 g	<b>c)</b> osteolytická ložiska  <b>d)</b> snížení ostatních fyziologických imunoglobulinů pod 50 % normální hodnoty:  IgG < 6 g/l; IgA < 1 g/l; IgM < 0,5 g/l
Diagnóza MM vyžaduje přítomnost alespoň 1 velkého kritéria a 1 malého kritéria, nebo 3 vedlejších kritérií (vždy a + b). Platí pro nemocné s klinickou symptomatologií	

(Převzato a upraveno: [www.myeloma.cz](http://www.myeloma.cz))

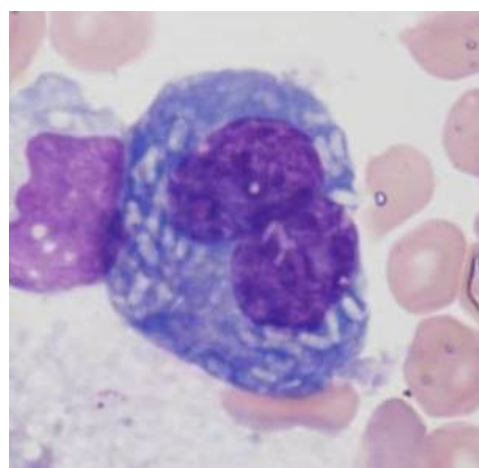
V nátěru PK bývá při MM vidět leukoerytroblastický obraz, penízkovatění (rouleaux) erytrocytů a bazofilně zbarvené pozadí způsobené přítomností paraproteinu. Ojedinele se nacházejí plazmocyty, jejich vyšší počet značí spíše plazmocytární leukemii. Jedním z nejdůležitějších prvků diagnostiky MM je vyšetření kostní dřeně, poskytující také prognostické informace a identifikaci reakci pacienta na léčbu, případně na recidivu. V aspirátu KD jsou zmnoženy plazmocyty, které mohou být morfologicky velmi heterogenní – od normálních plazmatických buněk až po formy blastické, anaplastické. Normální zralé plazmocyty je nutné rozeznat od velmi podobných osteoblastů. Neoplastické plazmocyty mají zřetelnou nukleocytoplazmatickou asynchronii, kdy cytoplazma je vyžralá, bazofilní, ale jádro má jemnou chromatinovou strukturu s viditelnými jádry. Jádro plazmocytů je značně pleomorfní, někdy jsou buňky i multinukleární, přítomné jsou mitotické figury. Cytoplazma může být velmi objemná a obsahovat Russelova tělíčka (mukopolysacharidy a imunoglobulin). Mottovy buňky jsou vyplněny inkluzemi připomínající tato tělíčka, vzhledem vypadají jako hrozen či morula. Dále mohou obsahovat tzv. Dutcherova tělíčka, pseudo-nukleoly, která vznikají invaginací cytoplazmy

či cysteren endoplazmatického retikula do jádra. Plazmocyty při trepanobiopsii KD destruktivně infiltrují, dochází velmi často k osteolýze s viditelnými osteoklasty. (Kačírková, 2007)

U morfoloicky atypických forem MM má význam imunofenotypizační vyšetření. Fyziologické plazmocyty exprimují CD19+, CD38+, CD138+, CD45+ a CD56-, u maligních plazmocytů bývá exprese značně variabilní. V cytoplazmě je přítomen paraprotein IgG, méně často IgA, vzácně IgD, IgE nebo IgM anebo jen lehké řetězce ( $\kappa/\lambda$ ). Silně exprimují znak CD38+, pozitivní je též CD56, CD79a, CD 138. Znaky CD19, CD20, CD22, CD 45 jsou často negativní. Pro stanovení prognózy se určuje tzv. *labeling index* plazmatických buněk vyjadřující míru procentuálního zastoupení buněk aktivně syntetizujících DNA. Geneticky jsou pozitivní přestavěné geny pro lehké i těžké řetězce. Může být přítomna monozomie chromozomu 13. Delece 17p13, translokace t(4;14) nebo t(14;16). (Kačírková, 2007; Jaffe, 2017)



Obrázek č. 11a



Obrázek č. 11b

**Obrázky č. 11a a 11b:** Patologické plazmocyty s inkluzemi paraproteinu v cytoplazmě i jádře (pořízeno na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)

## 4.2.2 Maligní lymfomy T řady

Maligní T lymfomy se obdobně jako B lymfomy člení podle WHO klasifikace na prekurzorové a periferní. Prekurzorové nádorové T lymfoidní buňky vycházejí z kostní dřeně a periferní, zralé nádorové T lymfocyty z thymu. Jedná se o relativně vzácné malignity s variabilní expresí antigenů CD2, CD3, CD5, CD7, CD4, CD8 a TCR receptoru. Na jejich vzniku se mohou podílet infekce viry HTLV-1 (Human T-lymphoma Virus-1) a EBV. (Češka, 2015)

### 4.2.2.1 Prekurzorová lymfoblastická leukemie T/lymfoblastický lymfom T



Prekurzorová lymfoblastická leukemie T (T-ALL) a lymfoblastický lymfom T (T-LBL) je způsoben klonální proliferací T lymfoblastů. T-ALL postihuje kostní dřeň a periferní krev a T-LBL primárně postihuje extramedulární orgány. Obě jednotky jsou svým biologickým chováním jednotné. Hranice mezi nimi se určuje procentuálním zastoupením lymfoblastů v kostní dřeni. Pro T-LBL platí jejich zastoupení do 25 % v KD, pokud jsou hodnoty lymfoblastů vyšší, jedná se již o T-ALL. Morfologicky je nelze odlišit od prekurzorových B lymfoblastů, proto je pro určení nutná imunofenotypizace. (Kačírková, 2007)

Příčina vzniku dosud není přesně známa. T-ALL a T-LBL postihuje častěji děti. Onemocnění se může projevovat anémií, trombocytopenií s variabilními hodnotami leukocytů v PK. Při extramedulárním postižení, dominují lymfatické uzliny v oblasti mediastina a krku. Cytologicky mohou být lymfoblasty velmi variabilní: od malých blastů s vysokým N/C poměrem s kondenzovaným chromatinem a nenápadnými jádérky až po poměrně velké blasty s objemnější bazofilní, někdy vakuolizovanou cytoplazmou, nepravidelným tvarem jádra s jemnějším chromatinem a různými počty jadérek. Pomocí cytochemického vyšetření lze v T lymfoblastech prokázat enzym kyselou fosfatázu, jejíž pozitivita se blokuje tartarátem sodným. (Kačírková, 2007)

Společným znakem T lymfoblastů při imunofenotypizačním vyšetření je pozitivita znaků TdT, CD3, CD7. Variabilně v závislosti na vývojovém stádiu mohou být exprimovány CD1a, CD2, CD5, CD4, CD8. Genetické vyšetření prokáže mnoho kryptických aberací, u kterých však nebyl prokázán klinický význam. Nadále probíhá výzkum k nalezení aberací, které by vedly k posunu v otázce cílenější léčby. (Kačírková, 2007; Jaffe, 2017)

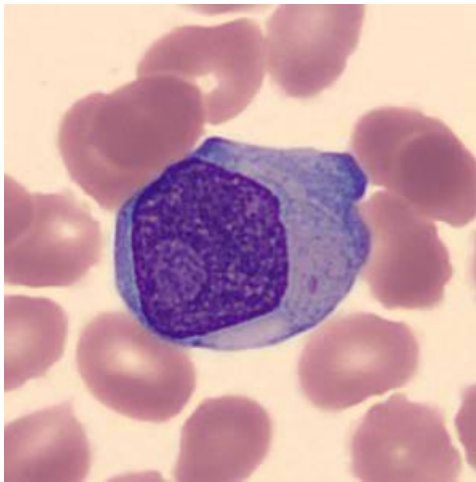
#### **4.2.2.2 T - Prolymfocytární leukemie**

Prolymfocytová leukemie T-buněk (T-PLL) je vzácné agresivní onemocnění charakterizované proliferací malých až středně velkých lymfocytů s post-thymickým fenotypem. Při této leukemii jsou často postiženy onkogeny TCL1 na 14. chromozomu (14q32). Postihuje PK, KD, lymfatické uzliny, játra, slezinu i kůži. Diagnostika T-PLL je cytologická, imunohistochemická a imunofenotypizační. (Penka, 2011; Češka, 2015)

V KO je často přítomná anemie a trombocytopenie s leukocytózou s hodnotami nad  $100 \cdot 10^9/l$ . T prolymfocyty se od B prolymfocytů výrazně neliší. Jedná se o středně velké lymfoidní buňky s vyšším N/C poměrem, okrouhlým jádrem se středně kondenzovaným chromatinem a výrazným nukleolem. Cytoplazma je bazofilní bez přítomnosti granul a velmi často tvoří drobné protruze „blebs“. Popisují se také dvě variantní formy T-PLL: **malobuněčná**

**varianta** připomínající vzhledem CLL a **cerebriformní varianta** připomínající Sézaryho syndrom přítomností prolymfocytů s přeloženými jádry a cytoplazmou s protruzemi. KD bývá výrazně infiltrována nádorovými buňkami s potlačením normální hematopoézy. KD při histologickém vyšetření bývá obvykle výrazně intersticiálně někdy difúzně infiltrována. (Kačírková, 2007)

T-PLL exprimuje znaky CD2+, CD3+, CD7+, TCR $\alpha\beta$ . Většina je CD4+ a CD8-. Existuje však i fenotyp CD4+ a CD8+ a velmi vzácně CD4- a CD8+. T-PLL není pozitivní na znaky prekurzorových malignit, jako je TdT a CD1a . Při genetickém vyšetření se prokáže klonální přestavba TCR $\alpha\beta$ , četné abnormality v karyotypu buněk, zejména na chromozomech 8, 11 a 14. (Kačírková, 2007)



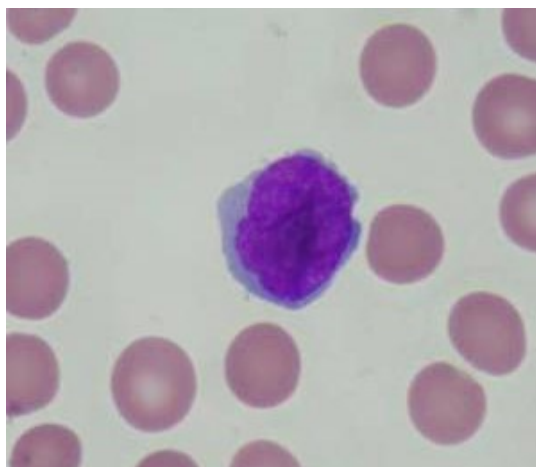
**Obrázek č. 12:** Prolymfocyt s výrazným excentricky uloženým jadérkem. (pořízen na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)

#### **4.2.2.3 Sézaryho syndrom**

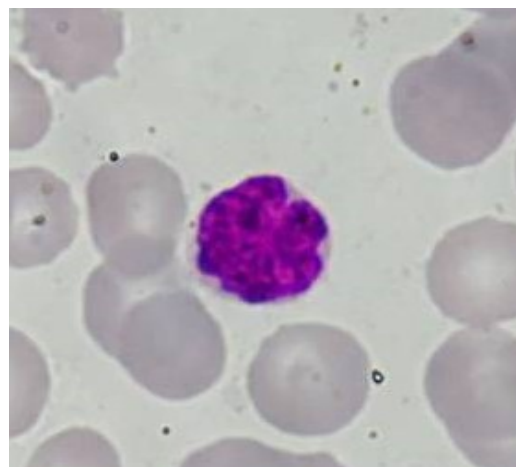
Sézaryho syndrom (SS) je vzácnější periferní T-lymfom postihující kůži ve formě erythrodermie, lymfatické uzliny a periferní krev. Považuje se za agresivní leukemickou variantu mycosis fungoides, která je na rozdíl od SS indolentní a postižení KD a PK je i v pokročilých stádiích vzácné. (Kačírková, 2007)

V periferní krvi bývá přítomna leukocytóza s lymfocytózou a specifické Sézaryho a/nebo Lutznerovy buňky pocházející z kožních lézí. Sézaryho buňky jsou velké s vysokým N/C poměrem. Jádro je konvultované, cerebriformního vzhledu s kondenzovaným chromatinem a nepatrnými jadérky. Lutznerovy buňky jsou malé ale obdobného vzhledu, struktura jádra je kompaktnější. Cytochemickým vyšetřením lze detekovat PAS pozitivní prsteneček vakuol kolem jádra. Postižení KD bývá časté v pokročilém stádiu onemocnění. Pro komplexní diagnostiku je nutné imunohistochemické vyšetření společně s průtokovou cytometrií. Pro stanovení diagnózy je nutná přítomnost alespoň  $1 \cdot 10^9/l$  těchto buněk v PK. (Penka, 2011)

Sézaryho buňky jsou pozitivní ve znacích CD2, CD3, CD5 a TCR $\alpha\beta$ , dále exprimují CD4 a CD45RO, znaky typické pro paměťové T-helpery. Geny pro TCR vykazují klonální přestavbu. Vyskytují se časté aberace na chromozomech 1, 17, 10 a 14. (Kačírková, 2007)



Obrázek č. 13a



Obrázek č. 13b

**Obrázek č. 13a a 13b:** 13a Sézaryho buňka; 13b Lutznerova buňka (pořízeno na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)

### 4.2.3 Hodgkinova choroba

Hodgkinův lymfom (HL) patří mezi lymfoproliferativní onemocnění, vycházející z B lymfocytů, které se ale podle WHO klasifikace 2016 řadí samostatně. Důvodem je přítomnost charakteristických Hodgkinových resp. Reed-Sternbergových buněk (H-RS), které znaky B lymfocytů nenesou. Podle klinického a laboratorního vyšetření se HL dělí na **nodulární HL s predominancí lymfocytů** a **klasický HL**, který v sobě zahrnuje čtyři podtypy (viz Tabulka 3). HL postihuje převážně uzliny. H-RS buňky tvoří jen 0,2 – 2 % z buněčné populace postižené tkáně. Nejvyšší incidence HL je u pacientů mezi 20. – 30. rokem života a po 50. roce. Muži bývají postiženi častěji. (Češka, 2015)

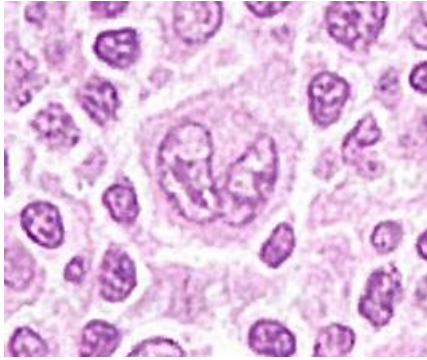
Vznik H-RS buněk se popisuje tzv. „cripling“ mutací VAR genu pro imunoglobuliny a downregulací B buněčných signálních cest a transkripčních faktorů u B lymfocytů germinálního centra, která následně vede ke ztrátě B buněčného fenotypu. V roli mikroprostředí podporujícího růst nádorových buněk se popisuje konstitutivní aktivita transkripčního faktoru NF $\kappa$ B, způsobená náhodnými somatickými mutacemi a až ve 40 % případů způsobená EBV infekcí. I samotné H-RS buňky produkují řadu cytokinů a chemokinů. (www.fnmotol.cz; Češka, 2015)

Onemocnění se charakteristicky projevuje zvětšením lymfatických uzlin, zpravidla v horní polovině těla (krčních, axilárních, mediastinálních). V závislosti na stádiu a progresi onemocnění se přidružují další systémové příznaky, jakými jsou undulující horečka, úbytek na váze, noční pocení a kopřivka. Někdy se objevuje kašel a dušnost z útlaku způsobeného zvětšenými uzlinami. V PK bývá často anémie, lymfopenie, eozinofilie a trombocytóza. Aspirát KD je hypercelulární díky hyperplázii granulocytárních, zejména eozinofilních buněk. Bývají reaktivně zmnožené makrofágy a plazmocyty. V klinickém vyšetření se uplatňuje fyzikální vyšetření, zobrazovací metody RTG, CT, PET a scintigrafie. Diagnostika a klasifikace HL se opírá o histologické a imunohistochemické vyšetření odebraného vzorku extramedulární postižené tkáně s přítomností RS buněk a zánětlivého buněčného infiltrátu. (Kačírková, 2007; Češka, 2015)

**Nodulární HL s predominancí lymfocytů (NPLHL)** se od klasického HL (CHL) liší přítomností polyploidních imunoblastů tzv. LH buněk (lymfoidně histiocytární buňky) mající charakteristickou morfologii a imunofenotyp. LH buňky mají lobulizovaná jádra a četná drobná jádérka připomínající zrna kukuřice („popcorn cells“), naopak H-RS buňky se vyskytují velmi zřídka. Imunofenotyp NPLHL je CD20+, CD30-/+, CD15- a CD45+, buněčné pozadí polyklonálních CD57+ T lymfocytů vytváří kolem nádorových buněk v KD rozety. Postižení KD je vzácné a je většinou spojeno s fibrotizací KD. Infiltrace bývá spíše nodulární. (Adam, 2001; Kačírková, 2007)

**CHL** je charakteristický přítomností diagnostických H-RS buněk a zánětlivého infiltrátu s nekrotizacemi na pozadí. Buňky RS jsou nejčastěji velké dvoujaderné se zrcadlově uloženými oválnými jádry s nápadnými eozinofilními jádérky umístěnými v centru s perinukleárním halo a slabě eozinofilní objemnou cytoplazmou. Mezi další diagnosticky typické buňky patří jednojaderné imunoblasty tzv. Hodgkinovy buňky s nápadnějším centrálním jádérkem a oxyfilní cytoplazmou. Přítomné mohou být tzv. mumifikované buňky podléhající apoptóze. Pro nodulárně sklerotický HL jsou typické ještě lakunární buňky, které jsou pouze v histologicky zpracovaných řezech, vzniklých jako artefakt při formolové fixaci. Rozdělení CHL na jednotlivé typy v kostní dřeni není možné, protože její postižení je často difúzní a vede ke stromálním reaktivním změnám (edému, fibrotizaci, lymfoidním shlukům a nekróze). Imunofenotyp H-RS buněk je CD30+, CD15+, CD45- a CD20-/+. (www.fnmotol.cz; Kačírková, 2007)

CHL se podle současné klasifikace dělí na typ nodulární skleróza (NSCHL), smíšená buněčnost (MCCHL), bohatý na lymfocyty (LRCHL) a deplece lymfocytů (LDCHL). K jejich přesné diagnostice je nutné histologické a imunohistochemické vyšetření postižených tkání, nejčastěji uzlin. (www.fnmotol.cz; Kačírková, 2007)



**Obrázek č. 14:** Reed-Sternbergova buňka se zrcadlově umístěnými jádry (Převzato: Jaffe, 2017, s. 530 obr. C.)

### **4.3 Laboratorní průkaz**

Neoddělitelnou součástí diferenciální diagnostiky maligních lymfoproliferací je jejich laboratorní průkaz zahrnující vyšetření krve, kostní dřeně a zasažených orgánů. Maligní proces lze zachytit již pomocí základních rutinně používaných laboratorních metod, kam patří analyzátorové vyšetření krevního obrazu (KO) a diferenciálního počtu krevních leukocytů (DIF), dále mikroskopické odečtení nátěru PK, případně aspirátu KD. Mezi specifitější metody pak patří cytochemické, imunologické a genetické vyšetření.

Správná interpretace výsledků laboratorních vyšetření se opírá o anamnestické údaje pacienta a další fyzikální vyšetření. (Pecka, 2010)

#### **4.3.1 Krevní obraz a diferenciální rozpočet leukocytů**

Vyšetření krevního obrazu (KO) patří mezi základní diagnostické testy a zahrnuje v sobě stanovení počtu krevních buněk a jejich parametrů. U lymfoproliferativních malignit bývá KO a DIF velmi variabilní, tyto testy však pomáhají k nasměrování lékaře k dalším specifitějším postupům. (Pecka, 2010)

Odběr krve se provádí nejčastěji ze žíly v jamce loketní do zkumavky s  $K_3EDTA$  antikoagulantem po rysku. Ihned po odběru musí dojít k dostatečnému promíchání krve s  $K_3EDTA$  aby se zamezilo vzniku sraženiny. Před odběrem nemusí pacient dodržovat žádná zásadní dietní opatření, pouze by měl být dostatečně zavodněn. Stabilita krve po odběru je 5 hodin při teplotě 15 – 25°C. (Pecka, 2010)

Vyšetření KO probíhá pomocí analyzátorů krevních buněk, kterými se stanoví celkový počet leukocytů (WBC), erytrocytů (RBC) a trombocytů (Plt), hodnoty hemoglobinu (HB) a hematokritu (HCT). Dále se určí parametry erytrocytů a trombocytů: střední objem erytrocytu

(MCV), střední množství HB v erytrocytu (MCH) a střední koncentrace HB v erytrocytech (MCHC), distribuční šíři erytrocytů (RDW) a trombocytů (PDW), destičkový hematokrit (Pct) a střední objem trombocytu (MPV). Zjištění těchto všech hodnot se získává pomocí impedanční metody anebo optické detekce, některé parametry jsou vypočtené. Koncentrace HB se stanovuje spektrofotometricky. (Pecka, 2010)

Doplňujícím vyšetřením je diferenciální rozpočet leukocytů (DIF), tedy stanovení zastoupení jejich jednotlivých podtypů, ke kterým se řadí neutrofilů, bazofilů, eozinofilů, lymfocytů a monocytů. Stanovení na analyzátoch probíhá na podkladě kombinace různých detekčních metod (rozptyl přímého či bočního laserového paprsku, impedance, konduktivita, průtoková fluorescenční cytometrie apod.), pomocí nichž se leukocyty separují podle velikosti, reflektivity, vnitřní struktury či obsahu. (Pecka, 2010)

#### **4.3.2 Mikroskopické vyšetření PK a KD**

Mikroskopické vyšetření PK a KD, jehož součástí je i popis morfologie jednotlivých buněčných linií, se také provádí pro upřesnění či stanovení celé řady diagnóz.

Mikroskopické vyšetření periferní krve se provádí ze stejného odběru jako na KO. Nátěr periferní krve je dobré zhotovit do 2 hodin od odběru, později by mohlo dojít k narušení či rozpadu některých krevních elementů. Nátěr se zhotovuje z kapky krve aplikované na čisté a odmaštěné podložní sklo roztěrovým sklem přibližně pod úhlem 25-30° a nechá se dobře zaschnout. Poté se zafixuje a obarví dle Pappenheimovy panoptické metody. Principem metody je odlišení jednotlivých struktur buněk podle jejich pH a tedy schopnosti vázat barviva. Používají se dva roztoky: May-Grünwald, který slouží k zafixování nátěru a obarvení struktur buněk s afinitou k bazickým barvivům, například granula neutrofilních segmentů a Giemsa-Romanowski, který obarví bazofilní struktury buněk, například jádro. Dnes lze nátěr PK připravit i pomocí nátěrových a barvicích automatů. (Pecka, 2010)

Nátěr KD se zhotovuje přímo po její aspiraci z hrudní kosti nebo lopaty kosti kyčelní speciální punkční jehlou při lokální anestezii. Postup zhotovení a barvení je shodný s postupem pro PK. (Kačírková, 2007; Pecka, 2010)

Odečet preparátů PK a KD se lehce liší. Mikroskopické hodnocení PK a KD začíná prohlednutím obarveného preparátu při malém zvětšení (obvykle 100x - 200x). Hodnotí se celkový vzhled a kvalita obarvení nátěru, buněčnost a distribuce leukocytů, v KD i jiných nukleárních buněk. Při větším zvětšení (obvykle 500x - 1000x) se v nátěru PK provádí rozpočet

leukocytů zpravidla na 100 buněk, v KD se hodnotí 500 jaderných buněk. Dále se při vyšetření nátěru KD sleduje poměrné zastoupení jednotlivých hematopoetických řad, přítomnost patologických buněk a non-hematopoetických buněk. Součástí mikroskopického vyšetření PK i KD je morfologický popis jednotlivých buněčných řad. Výsledné zhodnocení aspirátu KD se vždy interpretuje v kontextu s výsledkem KO a mikroskopickým nálezem v PK spolu se znalostí věku, pohlaví a klinického stavu pacienta, případně dalších laboratorních a jiných vyšetření. (Kačírková, 2007)

### 4.3.3 Cytochemie

Principem cytochemických metod je průkaz substancí nebo enzymů přítomných v buňkách specifickými chemickými reakcemi, při kterých vzniká barevný produkt viditelný ve světelném nebo elektronovém mikroskopu. Tyto látky jsou více či méně charakteristické pro jednotlivé buněčné typy. Jejich průkaz může být buď přímý, nebo nepřímý. K vyšetření se zhotoví krevní nátěr z PK nebo aspirátu KD a po 24 hodinách se šetrně zafixuje a obarví se hledaná složka. Pro lepší přehlednost se dobarví jádra. Následně se nátěr odečítá v mikroskopu. Hodnotí se pozitivita a intenzita zbarvení v cytoplasmě mononukleárních buněk. (Pecka, 2010)

S rozvojem imunofenotypizace a cytogenetiky ustoupila cytochemie do pozadí a má jen zanedbatelný význam. U lymfoproliferativních chorob se z relativně specifických cytochemických metod využívá například tzv. kyselá fosfatáza rezistentní na tartarát (TRAP) pro průkaz klasické HCL s výraznou difúzní až granulární pozitivitou a PAS reakce (*Periodic acid-Schiff*) pro odlišení nediferencovaných stádií PAS pozitivních lymfoblastů od PAS negativních myeloblastů. (Kačírková, 2007; Pecka, 2010)

### 4.3.4 Histopatologické vyšetření

Histopatologické vyšetření je nedílnou součástí diagnostiky maligních lymfoproliferativních chorob a monitorování minimální reziduální nemoci (MRN). Týká se vyšetření nejen KD, ale i dalších postižených orgánů, jako jsou nejčastěji uzliny a slezina.

Trepanobiopické vyšetření kostní dřeně se provádí z lopaty kosti kyčelní nejčastěji v analgosedaci. Speciální dutou jehlou se odebere váleček KD velikosti asi 1,5 cm a uloží se do zkumavky s fixačním roztokem, nejčastěji formolem. Vzorek KD se uchovává při pokojové teplotě a do 24 hodin se histologicky zpracuje. Sleduje se struktura a změny ve stromatu KD, zastoupení a morfologie krevních buněk a jejich rozmístění. Také přítomnost nekrotizací, granulomů a jiných zánětlivých změn. S ohledem na věk pacienta se určí, zda je hematopoéza

normocelulární, hypocelulární nebo hypercelulární, zda nejsou přítomné výrazné kostní změny např. osteolytická ložiska či jiné mikroskopicky viditelné významné patologie. (Kačírková, 2007; Češka, 2015)

Indikace histologického vyšetření uzlin a dalších orgánů koreluje s vyšetřením fyzikálním (dlouhodobá nebo bolestivá lymfadenopatie, zvětšená slezina, játra) a s výsledky vyšetření KD a PK. Slouží k definitivnímu zařazení onemocnění, určení stádia a prognózy. Uzliny se zpravidla chirurgicky extirpují, někdy s pomocí zobrazovacích technik. Použití tenkojehlové aspirační biopsie může být neprůkazné. Pokud jsou postižené orgány (splenomegalie, hepatomegalie), odebere se část tkáně. Vzorky se vloží nádoby s fixačním roztokem, uchovávají se při pokojové teplotě a histologicky se zpracují. (Kačírková, 2007)

### 4.3.5 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (*Flow Cytometry*, FCM) je laboratorní metoda, která v sobě zahrnuje princip fluorescenční mikroskopie a hematologického analyzátoru. Umožňuje tak simultánní měření fyzikálních a chemických vlastností na velkém množství buněk v krátkém časovém intervalu. (Mayer, 2002)

K analýze buněk lze použít PK odebranou do heparinu, kostní dřevě, mozkomíšní mok, buňky z aspirátů tělních dutin a biopsie postiženého orgánu (před analýzou homogenizovaný). Vzorky jsou uchovávány při laboratorní teplotě a zpracované do 24 hodin od odběru.

Buňky se nejprve označí monoklonální protilátkou s navázaným fluorochromem, která se váže na příslušný antigen na povrchu nebo uvnitř buněk, a poté jsou tenkou kapilárou na základě hydrodynamické fokusace unášeny jedna za druhou do průtokové komůrky a následně ozářeny laserovým paprskem. Paprsek se v závislosti na vlastnostech buňky specificky láme a odráží. Lineárně rozptýlené světlo je označováno jako přímý rozptyl (*Forward Scatter*, FSC) a je přímo úměrné velikosti buňky. Světlo rozptýlené v úhlu 90°, tzv. *Side Scatter* (SSC) je ovlivněno granularitou buněk (přítomností granul, inkluzí apod.). Současně se detekuje fluorescenční signál excitací fluorochromů navázaných na příslušných monoklonálních protilátkách. Emitované světlo fluorochromů se převádí na elektrické signály, které jsou vyhodnoceny počítačem. (Pecka, 2010)

Naměřená data se dají zobrazit formou histogramů, kterými se určí intenzita signálu nebo procentuální zastoupení antigenu pomocí tzv. gatingu. Intenzita exprese antigenů na



buňkách se vyjadřuje kvalitativně a semikvantitativně (+; slabě + resp. -), nebo pomocí arbitrárních jednotek či fluorescenčních standardů. (Mayer, 2002; Kačírková, 2007; Pecka, 2010)

FCM má v hematologii široké uplatnění. Používá se k imunofenotypizaci buněk, určení fáze buněčného cyklu, vitality buněk, tvorby protilátek, stanovení reziduálních buněk apod. Dále buňky můžeme také třídit a získat tak suspenzi požadovaného typu. Konkrétně na příkladu lymfoproliferací pomáhá objasnit subtypy B a T řady a stupeň zralosti buněk při ALL apod. (Haferlach, 2014)

Zavedení průtokové cytometrie v hematologii zvýšilo objektivitu nálezů a významně urychlilo diagnostiku hematologických malignit. Imunofenotypizace dnes slouží nejen k určení a klasifikaci maligního klonu, ale také pomáhá pochopit biologické vlastnosti leukemických buněk, vybrat nejefektivnější dostupnou léčbu, sledovat její průběh a míru toxicity chemoterapie v rozvoji sekundárních poruch či přítomnost minimální reziduální nemoci schopné vyvolat relaps nemoci. (Mayer, 2002)

#### **4.3.6 Genetika**

Význam cytogenetických a molekulárně genetických metod v diagnostice hematologických onemocnění v posledních letech výrazně vzrostl. Pomáhají k přesnější identifikaci, klasifikaci a zejména k určení prognózy či minimální reziduální choroby u neoplázií. Využití těchto metod vychází z podstaty, že na rozvoji hematologických malignit se významně podílí změny na úrovni DNA kmenových nebo progenitorových buněk. V závislosti na velikosti těchto změn (bodové mutace, delece, amplifikace, translokace až změny na úrovni chromozomů) se využívají různé techniky detekce. (Pecka, 2010)

##### **4.3.6.1 Cytogenetika**

Mezi nejvíce využívané cytogenetické techniky pro diagnostiku hematologických malignit patří **G-pruhování** chromozomů a metoda **FISH** (*fluorescenční in situ hybridizace*). Pro analýzu se využívá odběr do heparinu. (Pecka, 2010)

G-pruhování se využívá pro karyotypizaci množících se buněk KD a PK v metafázi buněčného cyklu. Buňky se zpravidla několik dní kultivují s přidavkem růstových faktorů v kultivační nádobce. Před ukončením kultivace se přidá kolcemid, který zastaví buňky v metafázi mitózy. Poté se buňky rozruší hypotonickým roztokem KCl a zafixované a denaturované trypsinem se na podložním skle obarví Giemsovým roztokem, jenž na chromozomech obarví

DNA ve specifické pruhu (G-pruhy). Pomocí světelné mikroskopie jsou detekovány viditelné chromozomální přestavby (delece, inverze, translokace apod.) a aneuploidie. ( Haferlach, 2014)

Principem FISH metody je hybridizace specifické fluorescenční DNA sondy s hledanou komplementární DNA, kdy po aplikaci excitačního světla dojde k záchytu fluorescence. Metoda FISH umožňuje detekci submikroskopických a známých chromozomálních přestaveb (translokace, amplifikace) v kterékoli fázi buněčného cyklu. Nelze však pomocí ní detekovat aberace neznámé. K tomuto účelu se vytvořily její modifikace, tzv. více barevná FISH (M-FISH) a spektrální karyotypizace (SKY), které umožňují rozdílně označit všechny páry lidských chromozomů, a tedy detekovat komplexnější a méně známé přestavby. Výhodou této metody je rychlost a možnost využití i u neživých buněk. (Pecka, 2010)

#### **4.3.6.2 Molekulární genetika**

Jedna z nejvýznamnějších metod molekulární genetiky pro analýzu a výzkum charakteristických aberací a usnadnění detekce u hematopoetických onemocnění je prováděna pomocí tzv. **DNA-mikročipů**. Ty umožňují posoudit stav exprese až desetitisíců genů a klinicky významných polymorfismů současně. Principem stanovení je přítomnost specifických DNA sond imobilizovaných na pevném podkladě. RNA získaná z leukemických buněk a RNA referenční (zdravé buňky) jsou reverzní transkriptázou převedeny na cDNA a obarveny fluorochromem (leukemické buňky odlišným fluorochromem než referenční). Ve stejném poměru se smísí s imobilizovanými DNA sondami a dojde ke specifickému navázání. Poté se odečítá intenzita a zabarvení fluorescence. Pro analýzu se používá nesrážlivá krev s přídavkem  $K_3EDTA$  nebo citrátu sodného. Následně se statistickým zpracováním výsledků vytvoří genetické expresní profily (GEP), které přinášejí významné informace o biologickém chování buněk v rozvoji nádorů a určení prognózy. Pomocí této metody dokážeme stanovit klíčové geny významněji se podílející na rozvoji malignity a detekovat je rychlejšími, dostupnějšími metodami (PCR, FCM, imunohistochemie). (Pecka, 2010)

**Polymerázová řetězová reakce (PCR)** je molekulárně genetická metoda založená na amplifikaci specifického úseku DNA pomocí DNA-polymerázy, která v teplotních cyklech syntetizuje komplementární řetězec s přítomností primeru. V hematologii se tato metoda využívá k detekci konkrétní genetické přestavby. Existuje řada dalších modifikací PCR, jako je PCR v reálném čase, která umožňuje kvantifikovat DNA a slouží pro studium genové exprese. Pro analýzu se využívá nesrážlivá krev s přídavkem  $K_3EDTA$  nebo citrátu sodného. (Haferlach, 2014)

## 4.4 Léčba

Způsoby léčby se vyvíjely a vyvíjejí na základě nových informací o biologickém chování nádorových buněk, tedy mechanismu maligní transformace, účasti mikroprostředí na kinetice růstu, schopnosti invaze apod. Mezi první účinné léčebné modalitty se řadí chemoterapie a radioterapie. Kombinací chemoterapeutik a steroidních látek s ozařováním je snaha zabránit vzniku rezistence a časně generalizaci nádorových buněk. Další znalosti interakcí imunitního systému s nádorovými buňkami vedly k syntéze nových, cílených léčiv a vzniku tzv. imunoterapie. Velký význam je přikládán vývoji protinádorových vakcín. Nesmíme opomenout, že transplantace KD stále patří mez i možnosti léčby, zejména v případech refrakterních a relabujících maligních onemocnění. (Lincová, 2007)

**Chemoterapie** maligních lymfoproliferací je dosud nejdůležitější léčebnou modalitou pro její vysokou citlivost. Léčba maligních lymfoproliferací zahrnuje co nejčasnější indukční chemoterapii. Léčiva se aplikují v několika cyklech v předem stanoveném časovém období. Během terapie se monitoruje dynamika léčebné odpovědi a toxicita léčby pro organismus. Pokud onemocnění dospělo do stádia remise, zahájí se ještě v některých případech tzv. konsolidační (udržovací) léčba. Pomocí FCM a/nebo genetiky se pak sleduje minimální reziduální nemoc. V této době, pokud je malignita svou povahou velmi riziková, je možné u pacienta provést po předchozím přípravném režimu transplantaci KD. (Lincová, 2007)

Dnes se využívají tzv. konvenční cytostatika dělená do několika tříd podle jejich specifity zasažení DNA a buněčných struktur. Obecně lze říct, že všechna cytostatika účinkují na množící se buňky v proliferační fázi. Vyvolají aktivaci signálních drah, které umožňují poškozenou DNA opravit případně spustit apoptózu. Nejdůležitějšími třídami konvenčních cytostatik jsou alkylační činidla, platinové deriváty, antimetabolity, inhibitory topoizomerázy II a mitotické jedy. K léčbě lymfoproliferací se dnes využívá kombinace chemoterapeutik a steroidních látek v cyklech s monoklonální protilátkou (rituximab), tzv. CHOP (cyklofosamid, doxorubicin, vincristin, prednison). Cílem je vyvinout léky a aplikovat léčebné metody s co nejmenší toxicitou pro zdravé tkáně a buňky, ale s co nejcílenějším a nejvíce selektivním efektem na populaci nádorových buněk, aby mohly být použity u většiny nemocných. (Papajík, 2003)

**Radioterapie** se dnes využívá společně s chemoterapií u vybraných maligních lymfoproliferací, zejména u Hodgkina lymfomu. Její nespornou výhodou oproti chemoterapii je průnik i do zjizvenatých a špatně vaskularizovaných tkání. V kombinaci s chemoterapií lze použít menší dávku ionizujícího záření vedoucí ke zmírnění nežádoucích účinků na zdravé tkáně. S dalším rozvojem přístrojových technik umožňují moderní přístroje zacílit ozařování pouze jedné

postižené uzliny. Podstatou radioterapie je vyvolání dvouvláknových zlomů v DNA vysokou energií částic, která většinou vede ke smrti buněk. Využití aktinoterapie se u ne Hodgkinských lymfomů používá jen ve vybraných situacích, jako je masivní postižení orgánů, nebo k paliativnímu ozáření při útlaku životně důležitých orgánů. V pokročilých stádiích kožních lymfomů lze provést celotělové ozáření elektrony (tzv. „elektronová sprcha“). (Klener, 2013)

V neposlední řadě lze pacienta směřovat k **transplantaci** kostní dřeně. Její historie sahá do 50. let minulého století, přičemž rutinně se začala užívat až v 80. a 90. letech. Původně se alogenní transplantace prováděla za podání vysoké dávky chemoterapie a celotělového ozáření. Cílem bylo vymýtit nádor a až poté podat KD od shodného příbuzenského nebo nepříbuzenského dárce, která navodí novou a funkční krvetvorbu.

Dnes se s novými poznatky z klinických studií provádí i přípravné režimy s redukovanou intenzitou (tzv. RIC minitransplantace), zvláště v případě komorbidních a starších pacientů. Při tomto postupu není snaha eradikovat nádorové buňky intenzivní chemoterapií a aktinoterapií, ale indukovat účinnou imunosupresi v příjemcově organismu, která umožní toleranci štěpu krvetvorných buněk dárce. V organismu tak vzniká chimerismus (v krvi jsou buňky příjemce i dárce), který vede při imunosupresi pacienta k účinné imunitní odpovědi buněk dárce proti nádorovým buňkám. Tento proces může trvat měsíce a obvykle vyžaduje opakované převody dárcovských imunokompetentních buněk. Výhodou tohoto postupu je redukce farmakologické toxicity, těžkých systémových infekcí a akutní formy reakce štěpu proti hostiteli po transplantaci. Možnost použití minitransplantace u maligních lymfoproliferativních chorob (ALL, CLL, MM, indolentní i agresivní lymfomy) zejména refrakterních a relabujících. (Papajík, 2003)

U některých vysoce agresivních forem lymfomů (MM, DLBCL apod.) lze využít tzv. transplantaci periferních kmenových buněk, buď autologní, nebo příbuzenskou alogenní. Princip spočívá v tom, že se pacientovi v remisi nebo příbuzenskému shodnému dárci podávají růstové faktory, kterými se navodí vyplavování kmenových buněk do PK. Při vhodné koncentraci v PK se zahájí jejich separace. Koncentráty těchto buněk se v případě autologní separace zamrazí a podají se pacientovi až po prodělání přípravného vysokodávkového chemoterapeutického režimu. V případě dárcovské separace se mohou separované periferní kmenové buňky podat pacientovi po prodělání přípravného režimu přímo bez předchozího zamražení. (Adam, 2001)

Nejmodernější léčbou jsou **biologická léčiva**. Řadíme do nich rekombinantní růstové faktory a monoklonální protilátky. Prvním takovýmto léčivem se stal interferon-alfa (IFN- $\alpha$ ) užívaný k léčbě HCL. IFN- $\alpha$  aktivuje řadu buněk imunitního systému, které následně rozpoznávají a koordinují zničení nádorových buněk. Fúzní protein *denileukin difitox* váže se na buňky s CD25

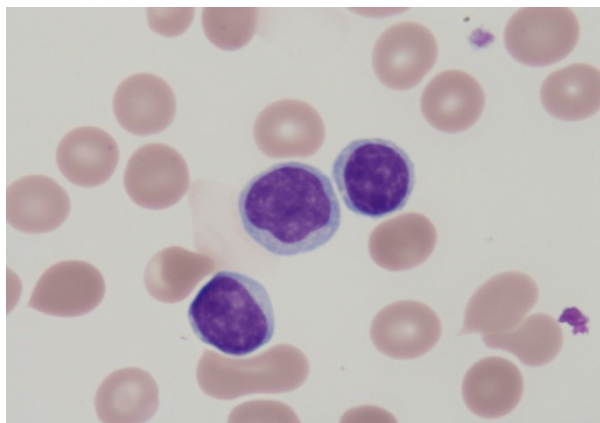
znakem, který je složen z interleukinu 2 (IL-2) a difterického toxinu, se využívá v léčbě T-buněčných lymfomů CD25+. Nejúspěšnější skupinu biologických léčiv dnes představují monoklonální protilátky. Lze je využít buď v čisté bílkovinné podobě nebo ve vazbě s radionuklidem (radioimunofarmaka), či v konjugaci s vysoce toxickým cytostatikem (imunotoxiny). Zástupcem nekonjugované monoklonální protilátky je například rituximab. Jedná se o chimérickou protilátku proti CD20 znaku, vyskytujícího se na povrchu zralých B lymfocytů (fyziologických i nádorových). Využívá se pro terapii lymfomů (FL, DLBCL) v kombinaci s konvenční chemoterapií (CHOP+rituximab) a v terapii postransplantačních lymfoproliferativních chorob. Monoklonální protilátky konjugované s radioizotopem jódu (<sup>131</sup>I-anti-CD20 tositumomab) nebo yttria (<sup>90</sup>Y-anti-CD20 ibritumomab tiuxetan) využívají selektivní vazbu pomocí protilátky na buňku a účinek ionizujícího záření, které buňku nevratně poškodí. Používají se k terapii relabovaných lymfomů či akutních leukemií a jsou stále součástí dalších studií. (Papajík, 2003; Klener, 2013)

## **4.5 Kazuistika č. 1**

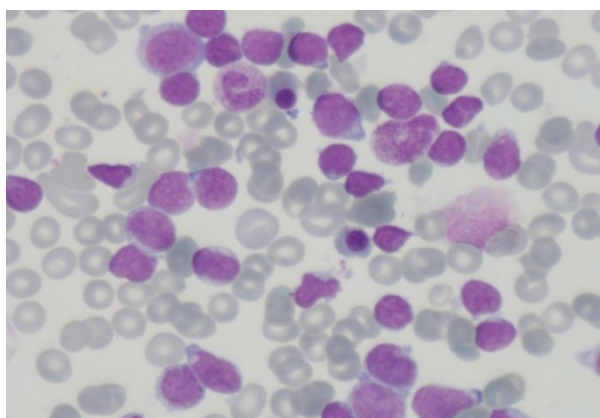
Čtyřletý chlapec byl přijat na dětské oddělení Fakultní nemocnice v Hradci Králové pro těžký průběh planých neštovic – vysoké horečky, malátnost, nechutenství a dehydratace. Klinický stav byl doplněn o laboratorní vyšetření krevního obrazu a diferenciálního počtu leukocytů.

Výsledky testu ukázaly snížené hodnoty leukocytů, erytrocytů a hemoglobinu (WBC  $3,48 \cdot 10^9/l$ , RBC  $1,41 \cdot 10^{12}/l$ , HB 46 g/l, HCT 0,125). Analyzátor současně upozornil na blíže nespécifikované atypie v lymfocytární řadě. Zbylé parametry KO se nacházely v referenčních mezích. Následovalo mikroskopické vyšetření diferenciálního počtu leukocytů, kde byly nalezeny malé lymfoblasty s velkým N/C poměrem, okrouhlými až oválnými jádry, některé se zářezy, s jemně kondenzovaným chromatinem bez zřetelně viditelných jadérek. Cytoplazma lymfoblastů byla bazofilní bez granulace. Pro suspektní podezření na akutní lymfoblastickou leukemii byla provedena aspirace kostní dřeně na cytomorfologické vyšetření. V aspirátu KD byla přítomna téměř 100% infiltrace lymfoblasty mírně heterogenní morfologie a občasné jaderné stíny blastického charakteru. Tímto nálezem se stanovila předběžná diagnóza akutní lymfoblastické leukemie (ALL), která byla následně potvrzena průtokovou cytometrií. Výsledkový scattergram tvořilo 60 % blastů B lymfoidního původu s fenotypem CD45+, CD34+, CD10+ u části buněk, CD79a+ a CD117+. Na základě všech zmíněných vyšetření byla diagnostikována akutní B lymfoblastická leukemie se stádiem diferenciace common B-ALL. Pacient byl předán k léčbě na specializované pracoviště v Praze.

*(Převzato a upraveno z databáze IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)*



**Obrázek č. 15:** Malé lymfoblasty v PK (pořízen na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)



**Obrázek č. 16:** Heterogenní lymfoblasty v aspirátu KD (pořízen na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)

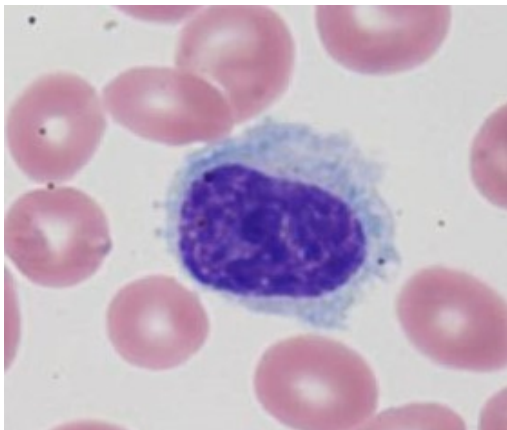
## **4.6 Kazuistika č. 2**

62-letý muž byl odeslán ze spádového pracoviště na IV. interní hematologickou kliniku Fakultní nemocnice v Hradci Králové pro podezření na indolentní lymfoproliferaci z důvodu námahové dušnosti, splenomegalie a úbytku na váze o 5 kg. Klinický stav byl doplněn o vyšetření krevního obrazu a diferenciálního počtu leukocytů.

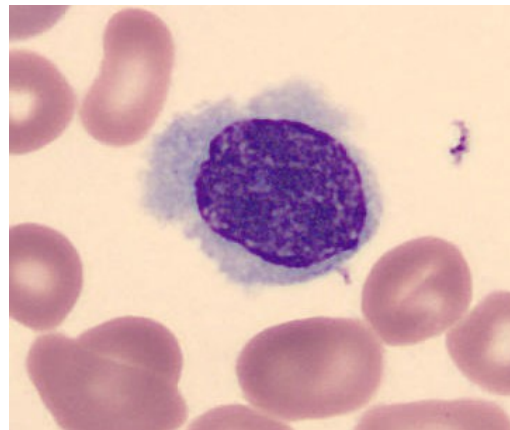
Výsledky testů odhalily pancytopenii s dominující trombocytopenií. Hodnoty KO: WBC  $4,38 \cdot 10^9/l$ , HB 95 g/l, MCV 98,6 fl, PLT  $37 \cdot 10^9/l$ ; hodnoty DIF: 17 % atypických lymfoidních buněk vlasatobuněčného charakteru, 44 % lymfocytů, 38 % neutrofilních segmentů, 1 % bazofilní segmentů; normoblasty 8/100 WBC. Při mikroskopickém vyšetření PK byly přítomny atypické středně velké lymfocyty s pleomorfními jádry a hrubě kondenzovaným chromatinem bez patrných jadérek. Cytoplazma byla objemná, lehce bazofilní bez granulace, vybíhající ve vlasovité

projekce po celém obvodu buňky. Aspirát kostní dřeně byl hypocelulární, s výraznou redukcí granulocytární řady (26 %) a redukcí erytrocytární řady (10 %). Ve 28 % byly přítomné fyziologické lymfocyty a v 36 % atypické buňky s „vlasatou“ cytoplazmou. Atypické buňky byly při cytochemickém testu pozitivní na tartarát rezistentní kyselou fosfatázu (TRAP). Při imunohistochemickém průkazu se prokázala pozitivita znaku DBA44. Následně se provedlo imunofenotypizační vyšetření, kde buňky jevíly pozitivitu ve znacích CD19, CD20, CD11c, CD103, CD25 a CD123. Na základě výsledků zmíněných vyšetření a klinického stavu pacienta byla diagnostikována HCL a pacientovi byla indikována odpovídající léčba. V současnosti je pacient dlouhodobě v remisi a dochází na pravidelné ambulantní kontroly.

*(Převzato a upraveno z databáze IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)*



Obrázek č. 17a



Obrázek č. 17b

**Obrázek č. 17a a 17b:** buňky HCL (pořízeno na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)

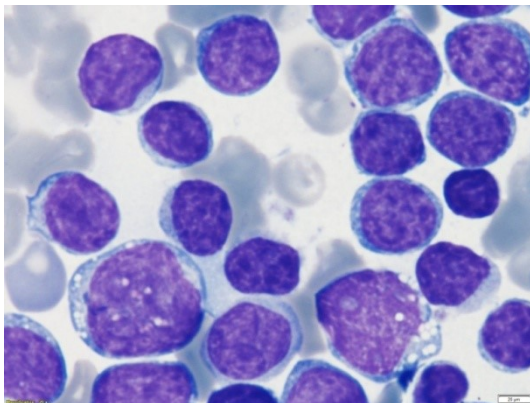
### 4.7 Kazuistika č. 3

72-letý muž byl přijat ze spádového pracoviště na IV. interní hematologickou kliniku Fakultní nemocnice v Hradci Králové pro zhoršující se dušnost. V anamnéze klíště v třísle před 2 měsíci, nechutenství, výrazný váhový úbytek 20 kg za poslední tři měsíce. Týden před přijetím si pacient stěžoval na malátnost, dušnost a slabost. Praktickým lékařem byla nasazena antibiotická léčba suspektně proti borelióze, bez efektu. Pacientovi byla následně odebrána krev a provedeny krevní testy. Výsledky laboratorního vyšetření odhalily extrémní hyperleukocytózu s podezřením na akutní leukemii. Stav se následně vyvinul do respiračního selhání a masivní splenomegalie.

Hodnoty KO: WBC  $1176,63 \cdot 10^9/l$ , HB 91 g/l, MCV 101,7 fl, PLT  $108 \cdot 10^9/l$  prokazující výraznou leukocytózu, anémii a trombocytopenii. Indikovalo se mikroskopické vyšetření periferní krve a kostní dřeně. V nátěru PK a KD se vyskytovaly prakticky jen atypické lymfoidní elementy. Atypické lymfoidní buňky byly charakteru prolymfocytů, střední velikosti s okrouhlými nebo oválnými jádry s jemněji kondenzovaným chromatinem a jedním velkým nukleolem. Bazofilní cytoplazma byla v některých případech s jemnou vakuolizací. V aspirátu KD byla morfologicky a cytochemicky prokázána masivní lymfoproliferativní infiltrace. Imunofenotypizací se odhalila 94% populace monoklonálních B lymfocytů zralého fenotypu.

Předběžně byla diagnostikována prolymfocytární leukemie, zahájena terapie a pro upřesnění diagnózy bylo indikováno cytogenetické vyšetření. Z vyšetření karyotypu metodou FISH byl pacient přehodnocen a veden pod diagnózou lymfomu z pláštových buněk (MCL). Vzhledem k vysoké agresivitě a progresi onemocnění pacient po několika týdnech umírá.

*(Převzato a upraveno z: databáze IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)*



**Obrázek č. 18:** Heterogenní populace prolymfocytů s menšími zralými lymfocyty (pořízen na IV. Interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice Hradec Králové)



## 5. DISKUZE A ZÁVĚR

Cytomorfologické vyšetření krve a aspirátu kostní dřeně je stále důležitou součástí klasifikace hematologických onemocnění. Příkladem může být MIC klasifikace leukemií, nebo REAL klasifikace lymfomů, které se z velké části i přes technické pokroky v identifikaci opíraly o mikroskopické zhodnocení vzhledu buněk. Pro dnešní klasifikaci WHO tomu není jinak, avšak její přístup je již mnohem komplexnější. Díky mikroskopickému zhodnocení morfologie buněk jsme schopni výrazně rychle přispět k rozpoznání nádorového procesu a co k nejčasnějšímu zahájení cílené terapie. Toto platí i u lymfoproliferativních onemocnění.

Mikroskopické vyšetření krve se provádí při každém podezření na přítomnou patologii. Prvotní podezření většinou vyvolá odchylka od fyziologické normy v krevním obraze anebo v diferenciálním rozpočtu leukocytů. V některých případech se jedná o náhodný nález při hospitalizaci primárně z jiného důvodu, jak názorně ukázala kazuistika č. 1. V případě jakéhokoliv výskytu abnormality v krevním obraze nám mikroskopické vyšetření krve pomáhá v rozhodování o dalším postupu vyšetřování.

Morfologie buněk, u lymfoproliferací se to týká především lymfocytů, se hodnotí nejprve v periferní krvi a v indikovaných případech, při podezření na hematologickou malignitu, i v aspirátu kostní dřeně. Při mikroskopickém vyšetření se postupuje komplexně, nejprve se prohlédne preparát při menším zvětšení jako celek a zhodnotí se jeho buněčnost, až poté se sleduje vzhled jednotlivých buněk. Důležité je při rozlišování lymfocytů znát jejich fyziologickou variabilitu a nezaměnit je zejména za blasty a naopak, jak stručně uvádí kapitola o fyziologii lymfocytu. Je důležité hodnotit vzhled buněk komplexně, tzn. jejich velikost, tvar a uložení jádra, strukturu chromatinu, přítomnost jadérek, objem a zbarvení cytoplazmy, případně přítomnost granulí, vakuol apod. U některých diagnóz může přispět také cytochemické vyšetření, které nám může pomoci k průkazu některých typů buněk (viz PAS pozitivita B lymfoblastů, TRAP pozitivita vlasatých buněk). Je však nutné brát v úvahu výsledky dalších laboratorních testů a klinického obrazu. U lymfoproliferací, kde se může diagnosticky uplatnit morfologie, musí dojít k infiltraci kostní dřeně a periferní krve. Příkladem může být chronická lymfocytární leukemie (CLL), popsaná v kapitole B lymfomů, jejíž morfologický obraz tvoří převážně zralé malé leukemické lymfocyty s typickou mozaikovitou strukturou chromatinu, avšak jejich množství je patologicky významně zvýšené. U lymfoproliferací, které se manifestují mimodřeňově v uzlinách či orgánech, nemá morfologické vyšetření KD a PK žádný nebo jen omezený význam. Příkladem je Hodgkinův lymfom, u kterého se vyskytují morfologicky typické buňky, podle kterých často není pochyb o diagnóze, ale kostní dřeň postihuje velmi vzácně.

Morfologie má v procesu rozpoznávání leukemií a lymfomů nadále velmi důležitou roli. Při dnešní klasifikaci zřídka kdy odpoví přímo na otázku, o které konkrétní onemocnění se jedná. Nicméně je to vyšetření stále daleko dostupnější a zpravidla rychlejší než navazující laboratorní metody a má své místo v řetězci vyšetřování, protože dokáže napovědět lékaři, jak má pokračovat v diagnostice či kam má nasměrovat léčbu.

## 6. ZKRATKY

AIDS	Syndrom získaného selhání imunity (acquired immune deficiency syndrom)
ALL	Akutní lymfoblastická leukemie
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated kinase
BCL	„ <i>B-cell lymphoma</i> “
BL	Burkittův lymfom
BRAF V600E	Rapidly accelerated fibrosarcoma valin-600-glutamic acid
CD	Diferenciační skupina (cluster of differentiation)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina (complementary deoxyribonucleic acid)
CFU-L	Progenitorová buňka pro lymfoidní větev (colony-forming unit – lymphocytes)
CLL	Chronická lymfatická leukemie
CMV	Cytomegalovirus
CT	Počítačová tomografie
cyIg	Cytoplazmatický imunoglobulin (cytoplasmatic immunoglobulin)
DIF	Diferenciální rozpočet leukocytů
DLBCL	Difúzní velkobuněčný B-lymfom (diffuse large B-cell lymphoma)
DNA	Deoxiribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
EBV	Virus Epstein-Baarové
FCM	Fluorescenční průtoková cytometrie (fluorescent flow cytometry)
FISH	Fluorescenční in situ hybridizace (fluorescent in situ hybridization)
FL	Folikulární lymfom
FSC	Přímý rozptyl (forward scatter)
GEP	Genetické expresní profily
Hb	Hemoglobin
HCL	Leukemie z vlasatých buněk (hairy cell leukaemia)
Hct	Hematokrit
HIV	Virus lidské imunodeficiency
HL	Hodgkinův lymfom
HLA	Lidský leukocytární antigen (human leukocyte antigen)
H-RS	Hodgkinova resp. Reed-Stenbergova buňka
HSC	Hematopoetická kmenová buňka (hematopoietic stem cells)
HSV	Herpes simplex virus
HTLV-1	Virus lidské T-leukemie (human T-lymphoma virus)

CHL	Klasický Hodgkinův lymfom
CHOP	Cylofosfamid-doxorubicin-vinkristin-prednison
IFN- $\alpha$	Interferon-alfa
IL-2	Interleukin 2
IMWG	International myeloma working group
K <sub>3</sub> EDTA	Trojdraselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt)
KD	Kostní dřeň
KO	Krevní obraz
LBL	Lymfoblastický lymfom
LDH	Laktát dehydrogenáza
LDCHL	Klasický Hodgkinův lymfom, deplece lymfocytů
LRCHL	Klasický Hodgkinův lymfom, bohatý na lymfocyty
MALT	Slizniční lymfatická tkáň (mucous associated lymphoid tissue)
MCCHL	Klasický Hodgkinův lymfom, smíšená buněčnost
MCL	Lymfom z plášťových buněk (mantle cell lymphoma)
MCV	Střední objem erytrocytu (mean corpuscular volume)
MF	Mycosis fungoides
M-FISH	Více barevná fluorescenční in situ hybridizace (multiplex fluorescent in situ hybridization)
MGUS	Monoklonální gamapatie nejasného původu (monoclonal gammopathy of undetermined significance)
MCH	Střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (mean corpuscular hemoglobin)
MCHC	Střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (mean corpuscular hemoglobin concentratio
MIC	Morfologická-imunologická-cytogenetická
MLL	Myeloid/lymphoma leukemia gen
MM	Mnohočetný myelom
MPO	Myeloperoxidáza
MPV	Střední objem trombocytu (mean platelet volume)
MRI	Magnetická rezonance
MRN	Minimální reziduální nemoc
MYC	Myelomatosis
N/C poměr	Nukleo-cytoplazmatický poměr
NK	Přirození zabíječi (natural killers)

NSCHL	Klasický Hodgkinův lymfom, nodulární skleróza
P53	Tumor protein 53
PAS	Kyselina jodistá a Schiffovo reagens (periodic acid Schiff's reagens)
PCR	Polymerázová řetězová reakce
Pct	Destičkový hematokrit
PDW	Šíře distribuční křivky objemů trombocytů (platelet cell distribution width)
PET	Pozitronová emisní tomografie
pH	Potenciál vodíku (potential od hydrogen)
PK	Periferní krev
PLL	Prolymfocytární leukemie
Pit	Celkový počet trombocytů
RBC	Celkový počet erytrocytů (Red blood cell)
RDW	Šíře distribuční křivky objemu erytrocytů (red cell distribution width)
RIC	Redukovaná intenzita chemoterapie (reduced intensity conditioning)
RNA	Ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
slg	Povrchový imunoglobulin (surface immunoglobulin)
SKY	Spektrální karyotypizace
SLL	Lymfom z malých lymfocytů (small lymphocytic lymphoma)
SMZL	Splenický B-lymfom/leukemie (small marginal zone lymphoma)
SS	Sézaryho syndrom
SSB	Sudanová čerň (Sudan black B)
SSC	Boční rozptyl (side scatter)
Tc	T- lymfocyt cytotoxic
TCR	T-buněčný receptor (T-cell receptor)
TdT	Terminální deoxynukleotidyl-transferáza
Th	T- lymfocyt helper
TRAP	Tartarát rezistentní kyselá fosfatáza (tartrate-resistant acid phosphatase)
vHCL	Variantní leukemie z vlasatých buněk (hairy cell leukaemia)
WBC	Celkový počet leukocytů (White blood cells)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World health organization)
ZAP 70	Proteinová kináza asociovaná se zeta řetězcem 70 (zeta-chain-associated protein kinase 70)

## **7. SEZNAMY**

### **7.1 Seznam tabulek**

Tabulka 1: Referenční meze pro analyzátor a mikroskopii, pro celkový počet leukocytů a rozpočet lymfocytů v relativním a absolutním počtu u dětí a dospělých. ....	14
Tabulka 2: WHO klasifikace 2016 prekurzorových lymfomů B/T-buněčné řady. ....	18
Tabulka 3: WHO klasifikace 2016 periferních lymfoproliferací.....	19
Tabulka 4: FAB klasifikace ALL.....	22
Tabulka 5: Imunologická klasifikace B-lymfoblastické leukemie .....	23
Tabulka 6: Diagnostická kritéria plazmocytárního myelomu podle Durieho a Salmona, 1975. .	31

## **7.2 Seznam obrázků**

Obrázek 1: .....	11
Obrázek 2: .....	12
Obrázek 3: .....	12
Obrázek 4: .....	16
Obrázek 5: .....	17
Obrázek 6: .....	22
Obrázek 7: .....	26
Obrázek 8: .....	27
Obrázek 9: .....	28
Obrázek 10: .....	30
Obrázky 11: .....	32
Obrázek 12: .....	34
Obrázek 13: .....	35
Obrázek 14: .....	37
Obrázek 15: .....	46
Obrázek 16: .....	46
Obrázek 17: .....	47
Obrázek 18: .....	48

## 8. LITERATURA

**Adam Z., Vorlíček J.:** *Hematologie II*. Praha: Grada Publishing, a. s., 2001: 680 str. ISBN: 80-247-0116-2.

**Belada D., Trněný M.:** *Diagnostické a léčebné postupy u nemocných s maligními lymfomy*. Hradec Králové: HK CREDIT s.r.o., 2016: 240 str. ISBN: 978-80-86780-55-9.

**Česká myelomová skupina, 2018.** *Mnohočetný myelom – diagnostické testy: Kritéria pro stanovení diagnózy mnohočetného myelomu* [online]. CMG. [cit. 9. 8. 2018]. Dostupné z: <http://www.myeloma.cz/index.php?pg=mnohocetny-myelom--zakladni-udaje--diagnosticke-testy>

**Češka R. a kol.:** *Interna*. 2. vydání. Praha: TRITON, 2015: 909 str. ISBN: 978-80-7387-885-6.

**Členové Laboratorní sekce ČHS ČSL JEP.** *Referenční meze krevního obrazu, retikulocytů, normoblastů a diferenciálního rozpočtu leukocytů dospělých* [online]. Publikované 2013. [cit. 25. 7. 2018]. Dostupné z: [http://www.hematology.cz/doporuceni/laboratorni\\_sekce/referencni\\_meze.php](http://www.hematology.cz/doporuceni/laboratorni_sekce/referencni_meze.php)

**FN Motol, 2012.** *Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol: Lymfomová skupina: Patologie lymfomů (Klasifikace WHO 2008): M-9650/3 Klasický Hodgkinův lymfom, NS* [online]. FN Motol. [cit. 21. 8. 2018]. Dostupné z: <http://www.fnmotol.cz/kliniky-a-oddeleni/spolecne-vysetrovaci-a-lecebne-slozky/ustav-patologie-a-molekularni-mediciny-uk-2lf-a-fn/lymfomova-skupina/patologie-lymfomu-detail/m-965031/>

**Haferlach T. a kol.:** *Kapesní atlas hematologie. 6. překlad, přepracované vydání*. [překl.] Karel Procházka. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 2014: 232 str. ISBN: 978-80-247-4787-3.

**Hořejší V., Bartůňková J.:** *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: TRITON, 2009: 322 str. ISBN: 978-80-7387-280-9.

**Chrobák L.:** *Leukémie s vlasatými buňkami*. Praha: Galén, 1999: 104 str. ISBN: 80-726-2019-3.

**Jaffe E.S. a kol.:** *Hematopathology*. 2. vydání. Philadelphia: Elsevier, 2017: 1216 str. ISBN: 978-0-323-29613-7.

**Jílek P.:** *Základy imunologie*. Praha: Ewopharma, spol s. r. o., 2008: 79 str. ISBN: 978-80-254-2422-3.



**Kačírková P., Campř V.:** *Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 2007: 304 str. ISBN 978-80-247-1853-8.

**Klener, P., Pytlík, R.** *Základní principy léčby hematologických malignit* [online]. Publikované 6. 6. 2013 [cit. 15. 8. 2018]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/zakladni-principy-lecby-hematologicky-malignit-470638>

**Lincová D. a kol.:** *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vydání. Praha: Galén, 2007: 672 str. ISBN: 978-80-7262-373-0.

**Longo D.L., Harrison T.R.:** *Harrison's hematology and oncology*. New York: McGraw-Hill Medical, 2010. ISBN: 978-0-07-166335-9.

**Mayer J., Starý J.:** *Leukemie*. Praha: Grada Publishing, spol. s. r. o., 2002: 392 str. ISBN: 80-7169-991-8.

**Mescher A.L.:** *Junqueira's Basic Histology*. 13. vydání. New York: McGraw-Hill, 2005: 1500 str. ISBN: 978-0-07-180720-3.

**Mokř J.:** *Vývoj B-lymfocytů v primárních a sekundárních lymfatických orgánech*. Hradec Králové: Lék. Zpr. LF UK, 1997; 5(6): str. 111 - 120.

**Papajík T. a kol.:** *Nové směry a perspektivy v léčbě hematologických malignit*. Interní Med. 2003; 5(2): str. 71-77.

**Pecka M.:** *Laboratorní hematologie v přehledu, buňka a krvetvorba*. Český Těšín: FINIDR, s. r. o., 2002: 160 str. ISBN: 80-86682-01-3.

**Pecka M.:** *Laboratorní hematologie v přehledu*. Český Těšín: FINIDR, s. r. o., 2006: 304 str. ISBN: 80-86682-02-1.

**Pecka M.:** *Praktická hematologie, laboratorní metody*. Český Těšín: Infiniti art, 2010: 343 str. ISBN: 978-80-903871-9-5.

**Penka M. a kol.:** *Hematologie a tranfuzní lékařství*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing a. s., 2011: 424 str. ISBN: 9788024734590.

**Rokyta R., Bernášková K.:** *Fyziologie a patologická fyziologie pro klinickou praxi*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 2015: 712 str. ISBN: 978-80-247-4867-2.

**Swerdlow S.H. et al.:** *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Revised 4th ed. Lyon, France. IARC press. 2017.

**Swerdlow S.H. et al.:** *The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms*. Instituto Nacional de Cancerología on May 19, 2016. [From [www.bloodjournal.org](http://www.bloodjournal.org)]

**Yang, G., et al.** *Adipophilin is a useful marker for identification of Burkitt lymphoma*. Cell Marque Corp., Rocklin, CA 95677 [online]. [cit. 10. 8. 2018]. Dostupné na internetu: [www.cellmarque.com/cmsial-literature/62-ACADEMIA\\_Adipophilin.pdf](http://www.cellmarque.com/cmsial-literature/62-ACADEMIA_Adipophilin.pdf)