

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni

Šiklův ústav patologie



**Nodální a extranodální lymfomy:
klinickopatologická, imunohistochemická,
molekulárně-biologická charakteristika**

**Nodal and Extranodal Lymphomas: Clinicopathological,
Immunohistochemical, Molecular-Biological Characteristics**

MUDr. Pavla Veselá

Dizertační práce

Plzeň 2016

Obor: Patologie

Školitelka: Doc. MUDr. Ludmila Boudová, Ph.D.

Abstrakt

Práce je rozdělena na dvě studie. Obě jsou věnovány prognostickým faktorům lymfomu z pláštěvých buněk (mantle cell lymphoma, MCL).

První část se věnuje ověření prognostického vlivu mezinárodního prognostického indexu pro lymfom z pláštěvých buněk (Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index, MIPI) a proliferační aktivity u MCL diagnostikovaných v letech 1996–2008 v celé České republice. Tato populační studie byla prováděna v rámci Kooperativní lymfomové skupiny ČR a klinická data pacientů byla zkompletována k dubnu 2012. Do studie bylo zahrnuto 235 pacientů, u nichž byla naším druhým čtením preterapeutických histologických vzorků potvrzena diagnóza MCL. Medián celkového přežití (OS) činil 47 měsíců, medián doby přežití bez progresu (PFS) 22 měsíců. Byl prokázán vliv proliferační aktivity, MIPI i typu léčby (intenzivní/neintenzivní) na přežití pacientů (na OS i PFS), a to i v multivariátní analýze. Dále byl pomocí univariátní analýzy prokázán vliv na OS i PFS i u variant indexu MIPI, a to MIPI_b, s-MIPI a v r. 2016 nově navrženého kombinovaného MIPI, u agresivních variant oproti ostatním cytomorfológickým variantám MCL a u nodální vs. extranodální lokalizace primárního vzorku. Prognostický vliv architektonické varianty ani výsledků imunohistochemického barvení s protilátkami CD23, CD5 či cyklin D1 však prokázán nebyl.

Druhá část práce je věnována prognostickému vlivu mikrovaskulární denzity (MVD) u MCL. Jedná se o vůbec první studii prognostického vlivu MVD u MCL. Do studie bylo zařazeno 177 pacientů s extramedulárními histologickými vzorky. Byla použita imunohistochemická protilátka CD34. Pro stanovení mikrovaskulární denzity byla použita metoda systematického rovnoměrného náhodného vzorkování obrazových polí a následně počítací rámeček pro tzv. nevychýlené počítání. Hodnota byla následně přepočítána na 1 mm². Byl prokázán negativní prognostický vliv vyšších hodnot MVD na OS pouze u souboru pacientů léčených konvenční (neagresivní) terapií (P = 0,04), nikoli u případů léčených agresivní terapií, ani u celého souboru. Významně vyšší hodnoty MVD byly zjištěny u pacientů s infiltrací kostní dřene v době diagnózy (P = 0,001). MVD koreluje s hodnotami MIPI, ale nikoli s proliferační aktivitou, s cytomorfológickou či architektonickou variantou, s primární lokalizací vzorku. MVD se tak u MCL neukazuje jako vhodný prognostický faktor na rozdíl od jiných lymfomů. Dle multivariátní analýzy se jako nejvhodnější prognostický faktor u MCL jeví MIPI a proliferační aktivita.

Abstract

The doctor thesis is composed of two major studies, both of them focused on the mantle cell lymphoma (MCL).

The first part deals with the verification of the prognostic influence of Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index (MIPI) and of the proliferative activity in 235 patients with MCL diagnosed in 1996–2008 in the Czech Republic. This population study was performed in the collaboration with the Czech Lymphoma Study Group. The clinical data of patients were completed in April 2012. The diagnosis of MCL was confirmed by our central histopathologic examination of pretherapeutic histological samples. The median overall survival (OS) was 47 months, median progression free survival (PFS) was 22 months. We demonstrated the influence of proliferative activity, MIPI and of the therapy type (intensive/non-intensive) on OS and PFS in univariate and multivariate analysis. Using univariate analysis we showed the prognostic influence of aggressive/other cytomorphological variants of MCL, nodal/extranodal localization of primary sample and also of the variants of MIPI – s-MIPI, MIPI_b and a completely new variant of MIPI – combined MIPI. The prognostic influence of growth pattern and of the results of immunohistochemical reaction with CD23, CD5 and cyclin D1 antibodies were not confirmed.

The other part of the thesis is focused on the prognostic influence of the microvessel density (MVD) in MCL. This is the first study of the prognostic influence of MVD in MCL. We studied MVD using systematic uniform random sampling and unbiased counting frames in immunohistochemical reactions with anti-CD34 antibody in extramedullary MCL samples of 177 patients. The number of microvessels was recounted to 1 mm². High MVD is associated with worse OS in patients treated by conventional (non-intensive) therapy ($P = 0.04$), but not in the intensive treatment group and in the whole series. Higher MVD was associated with bone marrow infiltration at the time of diagnosis ($P = 0.001$). MVD correlated positively with MIPI scores but not with the proliferation, morphological variant, growth pattern, or localization. MVD is not a good prognostic marker in MCL in contrast to other lymphomas. Multivariate analysis showed MIPI and proliferative activity as the most suitable prognostic markers of MCL.

Předmluva

Dizertační práce je tvořena dvěma studiemi.

První část tohoto projektu vznikla na žádost našich klinických kolegů sdružených v Kooperativní lymfomové skupině České republiky. Ti již dlouhá léta sbírají data o pacientech s různými lymfomy. Po dohodě s prof. MUDr. Markem Trněným bylo naším úkolem zajistit z pracovišť patologie po celé České republice bločky z biopsií, z nichž byl lymfom z pláštěvých buněk diagnostikován, a následně centrálně potvrdit diagnózu lymfomu z pláštěvých buněk u těchto případů, aby tato ověřená data mohla být v registru Kooperativní lymfomové skupiny dále zpracovávána. Tím však naše spolupráce neskončila. Tehdy v r. 2008 totiž Hoster publikovala návrh mezinárodního prognostického indexu pro lymfom z pláštěvých buněk MIPI a my jsme se ve spolupráci s MUDr. Davidem Šálkem, Ph.D. rozhodli ho na těchto datech ověřit. Tak vznikla první část této dizertační práce věnovaná prognostickým faktorům lymfomu z pláštěvých buněk.

Tato část začíná teoretickým úvodem, který je věnován základním informacím o lymfomu z pláštěvých buněk a shrnutí dosavadních znalostí o jeho prognostických faktorech. Následně je uvedena vlastní studie pacientů s tímto lymfomem. Jejím cílem bylo ověřit nejen prognostický vliv proliferativní aktivity a mezinárodního prognostického indexu pro lymfom z pláštěvých buněk MIPI, ale také dalších parametrů, jakými jsou cytomorfoloická varianta, architektonická varianta nebo výsledky imunohistochemického barvení (jmenovitě CD5, cyklin D1, CD23), jejichž prognostický vliv již sice v minulosti prověřován byl, avšak výsledky těchto prací jsou rozporuplné.

Materiál a data z tohoto souboru byly zpracovávány i ve druhé části této práce. Ta je věnována zkoumání prognostického vlivu mikrovaskulární denzity u lymfomu z pláštěvých buněk. Tato část začíná teoretickým úvodem, který je věnován mikrovaskulární denzitě a způsobům jejího stanovování a jsou v něm také shrnuty stávající poznatky o mikrovaskulární denzitě v lymfomech včetně jejího prognostického vlivu. Vlastní práce je vůbec první publikovanou studií věnovanou mikrovaskulární denzitě v lymfomu z pláštěvých buněk a jejímu prognostickému vlivu. Byla provedena na velkém souboru 177 případů. Doposud byly publikovány jen malé skupiny případů tohoto lymfomu v rámci srovnávání mikrovaskulární denzity mezi různými druhy lymfomů.

V přílohách je pak v anonymizované podobě uveden seznam jednotlivých případů z obou studií se všemi použitými údaji a dále jsou přiloženy kopie plných znění publikací autorky, týkající se této dizertační práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi UK LF Plzeň a s možností zapůjčování tištěné verze této práce.

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat své školitelce doc. MUDr. Ludmile Boudové za odborné vedení během celého doktorského studia, za její trpělivost a za cenné připomínky při zpracovávání jednotlivých publikací i celé dizertační práce.

Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Davidu Šálkovi, Ph.D. z Hematoonkologické kliniky Fakultní nemocnice Brno a jeho spolupracovníkům z Kooperativní lymfomové skupiny České republiky, vedené prof. MUDr. Markem Trněným, CSc., za možnost zapojit se do projektu věnovanému lymfomu z plášťových buněk a za doplnění aktuálních klinických údajů od jednotlivých pacientů.

Velké poděkování patří doc. MUDr. Zbyňku Tonarovi, Ph.D. z Ústavu histologie a embryologie LF UK v Plzni za zajištění vlastního stanovení mikrovaskulární denzity v našem souboru případů a za spolupráci při přípravě publikací.

Také chci poděkovat všem lékařům a lékařkám z různých pracovišť patologie po celé České republice, kteří na naši žádost o zaslání reprezentativních bločků z biopsií jednotlivých případů velmi rychle reagovali a hledané vzorky nám obratem zaslali.

Poděkování patří také vedení Šiklova ústavu patologie LF UK a FN v Plzni v čele s prof. MUDr. Michalem Michalem za možnost realizace této práce a všem pracovníkům a pracovnícím imunohistochemické a molekulárně biologické laboratoře za pečlivé zpracování velkého množství materiálu z našeho souboru. Za pomoc při fotografování mikroskopických preparátů bych ráda poděkovala prim. MUDr. Petrovi Mukenšablovi, Ph.D.

Tato dizertační práce vznikla za podpory grantu Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR NT 12193-5 – Difúzní velkobuněčný a folikulární lymfom – analýza vlivu prognostických faktorů a léčebných postupů na osud nemocných, lymfomový projekt České republiky.

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Prognostické faktory lymfomu z pláštěvých buněk	9
1.1 Úvod do problematiky lymfomu z pláštěvých buněk	9
1.1.1 Cytomorfologické varianty lymfomu z pláštěvých buněk	11
1.1.2 Architektonické varianty lymfomu z pláštěvých buněk	12
1.1.3 Extranodální lokalizace postižení lymfomem z pláštěvých buněk	14
1.1.4 Diferenciální diagnostika	16
1.1.5 Prognostické markery lymfomu z pláštěvých buněk	18
1.1.5.1 Prognostický vliv cytomorfologických a architektonických variant lymfomu z pláštěvých buněk	19
1.1.5.2 Prognostický vliv imunohistochemických markerů používaných při diagnostice lymfomu z pláštěvých buněk	19
1.1.5.3 Prognostický vliv proliferační aktivity	20
1.1.5.4 Prognostický vliv dalších markerů buněčného dělení	20
1.1.5.5 Prognostický vliv survivinu	21
1.1.5.6 Molekulárně genetické prognostické markery	21
1.1.5.7 Mezinárodní prognostický index pro lymfom z pláštěvých buněk	22
1.1.5.8 Prognostický vliv lymfocytózy	23
1.2 Cíle práce	25
1.3 Materiál a metody	26
1.3.1 Výběr případů	26
1.3.2 Proliferační aktivita	26
1.3.3 Statistické metody	27
1.4 Výsledky studie	28
1.4.1 Klinické údaje a terapie pacientů	28
1.4.2 Prognostický vliv primární lokalizace vzorku	31
1.4.3 Prognostický vliv výsledků imunohistochemického barvení cyklinem D1	32
1.4.4 Prognostický vliv výsledků imunohistochemického barvení CD23	33
1.4.5 Prognostický vliv výsledků imunohistochemického barvení CD5	33
1.4.6 Prognostický vliv cytomorfologické varianty	34
1.4.7 Prognostický vliv architektonické varianty	35
1.4.8 Prognostický vliv proliferační aktivity	36
1.4.9 Prognostický vliv MIPI	38
1.4.10 Prognostický vliv s-MIPI	38
1.4.11 Prognostický vliv MIPI _b	39
1.4.12 Multivariátní analýza	39
1.5 Diskuze	41
1.5.1 Vliv druhu terapie na prognózu	41
1.5.2 Prognostický vliv primární lokalizace vzorku	41
1.5.3 Prognostický vliv imunofenotypu	42
1.5.4 Prognostický vliv cytomorfologických variant	42
1.5.5 Prognostický vliv architektonických variant	44
1.5.6 Prognostický vliv proliferační aktivity	44
1.5.7 Prognostický vliv mezinárodního prognostického indexu pro lymfom z pláštěvých buněk	46
1.5.8 Multivariátní analýza	47
1.6 Závěr	49

2	Mikrovaskulární denzita v lymfomu z plášťových buněk.....	50
2.1	Úvod do angiogeneze v lymfomech.....	50
2.1.1	Mechanismus angiogeneze v nádorech.....	50
2.1.2	Mikrovaskulární denzita.....	51
2.1.2.1	Protilátky užívané při stanovení mikrovaskulární denzity.....	51
2.1.2.2	Způsoby stanovení mikrovaskulární denzity.....	52
2.1.3	Praktické využití mikrovaskulární denzity v nádorech.....	54
2.1.3.1	Mikrovaskulární denzita v hodnocení efektivity antiangiogenní léčby.....	54
2.1.3.2	Prognostický vliv mikrovaskulární denzity v lymfomech.....	55
2.2	Cíle studie mikrovaskulární denzity v lymfomu z plášťových buněk.....	57
2.3	Materiál a metody.....	58
2.3.1	Výběr pacientů.....	58
2.3.2	Mikrovaskulární denzita.....	58
2.3.3	Statistické zpracování.....	59
2.4	Výsledky studie mikrovaskulární denzity v lymfomu z plášťových buněk.....	60
2.4.1	Klinická data a terapie pacientů.....	60
2.4.2	Mikrovaskulární denzita a přežití.....	61
2.4.3	Mikrovaskulární denzita a lokalizace primárního vzorku.....	63
2.4.4	Mikrovaskulární denzita a cytomorfoloická varianta.....	64
2.4.5	Mikrovaskulární denzita a architektonická varianta.....	64
2.4.6	Mikrovaskulární denzita a proliferační aktivita.....	65
2.4.7	Mikrovaskulární denzita a mezinárodní prognostický index pro lymfom z plášťových buněk.....	65
2.4.8	Mikrovaskulární denzita a infiltrace kostní dřeně v době diagnózy.....	67
2.4.9	Výsledky multivariátní analýzy prognostického vlivu jednotlivých faktorů.....	67
2.5	Diskuze.....	70
2.6	Závěr.....	74
	Použitá literatura.....	75
	Přílohy.....	89
	Seznam příloh.....	89

Seznam použitých zkratk

ASCT	autologní transplantace kmenových krvetvorných buněk
B-CLL/SLL	B-chronická lymfatická leukémie/lymfom z malých B-buněk
CNS	centrální nervová soustava
DLBCL	difúzní velkobuněčný B-lymfom
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group scale
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FLIPI	mezinárodní prognostický index pro folikulární lymfom (Follicular Lymphoma International Prognostic Index)
H-E	hematoxylin-eosin
hpf	high power field – zorné pole při 400× zvětšení
CHOP	cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin a prednison
CHOP/AraC	cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison a cytarabin
IPI	mezinárodní prognostický index (International Prognostic Index)
LDH/ULN	poměr hodnoty laktátdehydrogenázy pacienta v séru a horní hranice její normy v laboratoři
MCL	lymfom z plášťových buněk (mantle cell lymphoma)
MIPI	mezinárodní prognostický index pro lymfom z plášťových buněk (Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index)
MIPI _b	kombinovaný biologický index (combined biologic index)
MIPI-c	kombinované MIPI
MVD	mikrovaskulární denzita
OS	celkové přežití (overall survival)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PFS	doba přežití bez progrese (progression free survival)
PTCL	periferní T-lymfom
R-CHOP	rituximab, cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison
RT-PCR	PCR spojená s reverzní transkripcí
s-MIPI	zjednodušená varianta mezinárodního prognostického indexu pro lymfom z plášťových buněk MIPI označovaná jako simplified MIPI
t(11;14)	translokace t(11;14)(q13;q32)
TNF	tumor nekrotizující faktor
VEGF	vascular endothelial growth factor
WBC/ μ l	počet leukocytů v μ l periferní krve
WHO	Světová zdravotnická organizace

1 Prognostické faktory lymfomu z pláštěvých buněk

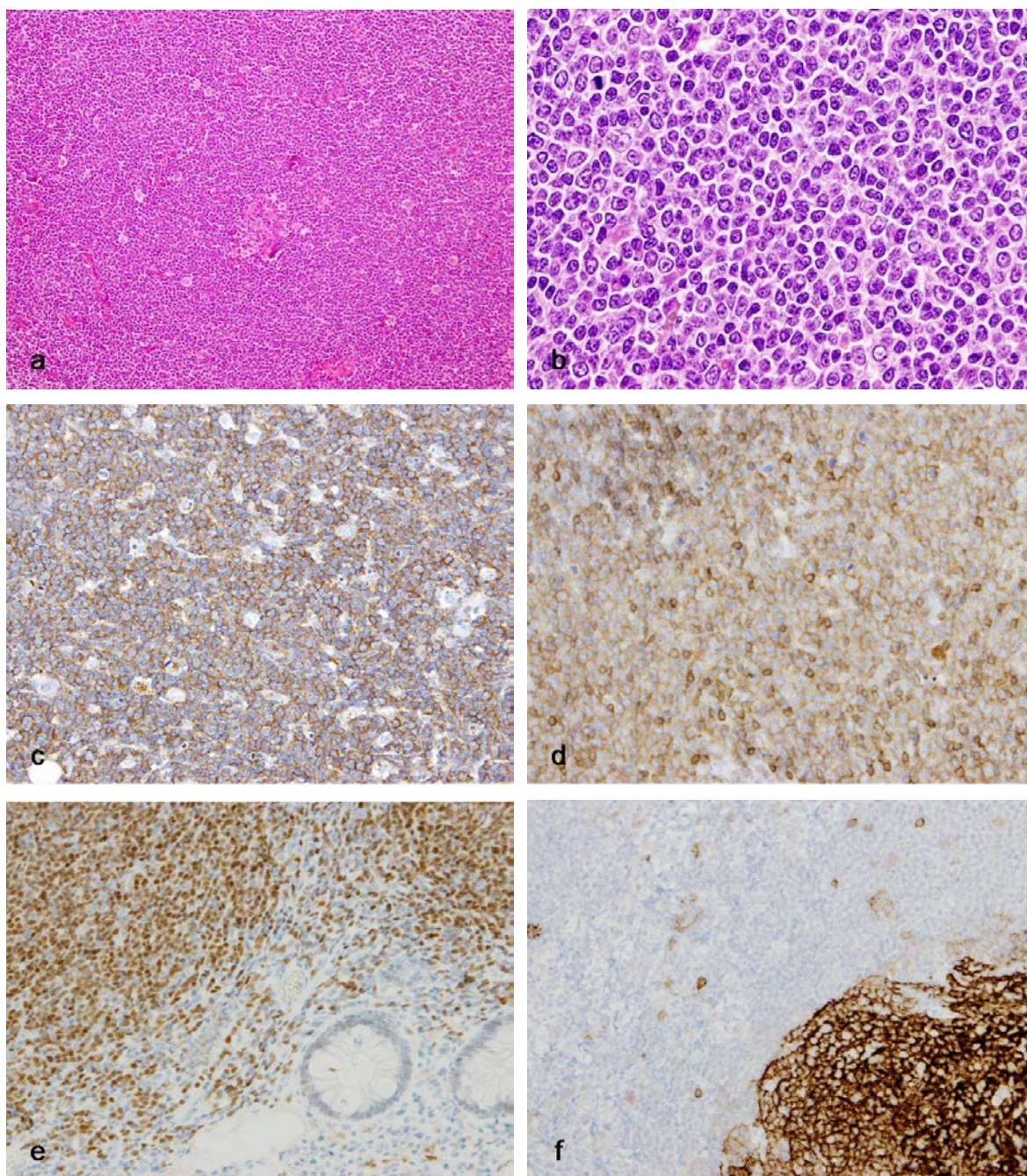
1.1 Úvod do problematiky lymfomu z pláštěvých buněk

Lymfom z pláštěvých buněk (mantle cell lymphoma, MCL) odpovídá 3–10 % ne Hodgkinsonských lymfomů [Swerdlow et al. 2008]. Tento B-lymfom je častější u mužů než u žen (poměr 2 : 1 [Swerdlow et al. 2008] i 3 : 1 [Ioachim et al. 2008b]) a častěji se vyskytuje u bílé rasy [Ioachim et al. 2008b]. Nejčastěji postihuje pacienty v šesté a sedmé dekádě života. Většina diagnostikovaných pacientů je již v pokročilých stádiích (stádium III a IV dle Ann Arbor klasifikace) s generalizovanou lymfadenopatií, u níž velikost uzlin obvykle nepřesáhne 5 cm. Časté je i současné extranodální postižení, a to kostní dřeň, sleziny, trávicího traktu či jater [Ioachim et al. 2008b].

Histologicky je lymfom z pláštěvých buněk tvořen monomorfní populací malých a středně velkých lymfoidních buněk. Tyto buňky jsou imunohistochemicky pozitivní v reakcích s B-markery, a to jak s CD79a, PAX-5, tak i s CD20. Dále je v reakci s protilátkou CD5 v nádorových buňkách přítomna slabá aberantní koexprese. Nádorové elementy jsou negativní s protilátkami proti CD23, CD10 i BCL6, pozitivní s anti-CD43, FMC7 a BCL2 a téměř vždy bývají pozitivní v reakci s cyklinem D1 [Swerdlow et al. 2008], viz obrázek 1.

Pozitivita reakce s cyklinem D1, která je hlavní imunohistochemickou známkou při diagnostice MCL, je způsobena translokací $t(11;14)(q13;q32)$, která je pro tento lymfom typická. Diagnostika MCL pomocí protilátky cyklinu D1 však přináší i určitá úskalí, a to proto, že tato protilátka není specifická pouze pro MCL. Pozitivita reakce může být zjištěna i u mnohočetného myelomu [Ioachim et al. 2008b] či u dalších lymfomů, např. u leukémie z vlasatých buněk či u chronické lymfatické leukémie/lymfomu z malých B-buněk (B-CLL/SLL) [Abboudi et al. 2009, Gradowski et al. 2012, Liu et al. 2015, O'Malley et al. 2005]. Na druhou stranu některé lymfomy z pláštěvých buněk jsou negativní v reakci s cyklinem D1. V těchto případech je pro určení správné diagnózy klíčový molekulárně cytogenetický průkaz translokace $t(11;14)$. Další imunohistochemickou protilátkou, která pozitivně reaguje s většinou MCL, je SOX11. Avšak ani v tomto případě se nejedná o protilátku specifickou pouze pro MCL. Byla totiž zjištěna pozitivita i u případů T- i B-akutní lymfoblastické leukémie či u části případů Burkittova lymfomu [Mozos et al. 2009].

Translokace $t(11;14)(q13;q32)$ je cytogeneticky prokazatelná téměř ve všech lymfomech z pláštěvých buněk. Tato translokace je mezi genem cyklinu D1 (CCND-1) na dlouhém raménku chromozómu 11 a genem těžkého řetězce (IgH) na dlouhém raménku chromozómu 14. Cyklinový gen normálně tvoří komplexy s cyklin dependentními kinázami 4 a 6, které hrají roli v fosforylaci (inaktivaci) retinoblastomového genu (aktivovaný gen potlačuje buněčné dělení), tento gen tak podporuje progresi z G1 do S fáze buněčného cyklu [Ioachim et al. 2008b]. Přítomnost této translokace je ke vzniku lymfomu z pláštěvých buněk sice nutná, ale sama ke vzniku nádoru nestačí, jsou třeba i další změny.



Obrázek 1 – typický vzhled lymfomu z plášt'ových buněk s obrazem připomínajícím až tzv. hvězdné nebe (a), v detailu (b) v barvení hematoxylin-eosin (H-E), imunohistochemická pozitivita s protilátkou CD20 (c), typická slabá aberantní koexprese nádorových elementů s CD5 se zastiženými silněji pozitivními reaktivními T-lymfocyty (d), pozitivita MCL s cyklinem D1 ve stěně tlustého střeva (e), negativita MCL s CD23 v nádorových buňkách, CD23 zobrazuje pouze síť folikulárně dendritických buněk (f); zvětšení (a) 50×, (b) 400×, ostatní 200×

V 40–75 % případů MCL se vyskytuje delece 11q22–23, kde je též uložen gen pro ATM kinázu. Tato delece vede ke zvýšení instability genomu a ke zvýšení pravděpodobnosti dalších mutací, protože za normálních okolností tento gen pomocí

transkripčního faktoru p53 vede k zastavení buněčného cyklu a k případné opravě DNA, či k apoptóze poškozené buňky [Camacho et al. 2002, Stilgenbauer et al. 2000]. Tyto mutace mohou být dostačující pro vznik klasické varianty MCL, avšak při vzniku blastoidní varianty dochází k dalším mutacím genů, které pomáhají zvyšovat proliferaci [Swerdlow et al. 2008]. Podrobněji jsme se tímto tématem zabývali v naší publikaci z r. 2013 [Šálek et al. 2013], jejíž plný text je uveden v příloze 7.

Průkaz t(11;14) je jednou z diagnostických metod MCL. Za nejvhodnější metodu pro její průkaz je považována fluorescenční in situ hybridizace (FISH), která detekuje 97 % případů a je rutinně použitelná u běžných bioptických vzorků, které jsou fixované formalínem a zalité v parafínu. Oproti tomu pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) je prokazatelných jen 37 % případů [Belaud-Rotureau et al. 2002], pomocí Southern Blott 70–80 % případů [Sun et al. 2003], při užití PCR spojené s reverzní transkripcí (RT-PCR) dokonce 100 % [Belaud-Rotureau et al. 2002]. Ostatně u imunohistochemického vyšetření cyklinu D1 je v práci Suna uváděna citlivost jen 69 %, ve zbylých případech byl k diagnostice MCL nutný průkaz t(11;14) [Sun et al. 2003].

1.1.1 Cytomorfologické varianty lymfomu z pláštěvých buněk

Cytologicky bývá MCL obvykle tvořen populací malých a středně velkých lymfoidních buněk s nepravidelnou jadernou konturou vzhledu „naštěpených jader“, s disperzním jaderným chromatinem, se špatně patrným jadérkem a s chudou cytoplazmou. Běžně bývají zřejmé i hyalinizované drobné cévy a v mnoha případech i rozptýlené epiteloidní histiocyty připomínající obraz hvězdného nebe [Swerdlow et al. 2008]. Tato nejčastější cytomorfologická varianta se nazývá klasická varianta (viz obrázek 2). Ta odpovídá většině případů MCL, a to 87,5 % [Tiemann et al. 2005], resp. 88 % [Hoster et al. 2016].

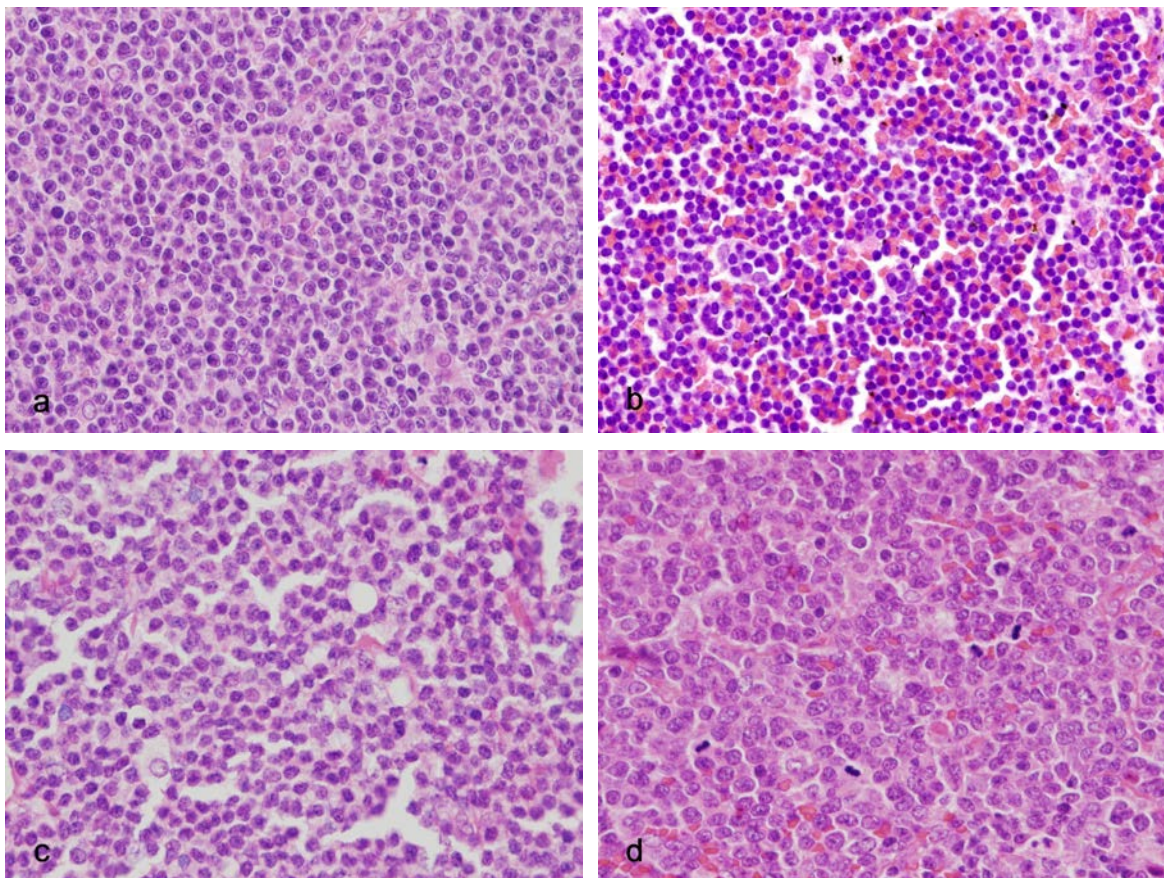
Další variantou je malobuněčná (small cell) varianta MCL (viz obrázek 2), která je tvořena malými kulatými lymfocyty s hutnějším chromatinem [Swerdlow et al. 2008]. Tato varianta napodobuje B-CLL/SLL, odlišení obou jednotek je s jistotou možné až za pomoci imunohistochemického vyšetření, příp. s použitím molekulární genetiky. Tato varianta odpovídá 3,6 % případů MCL [Tiemann et al. 2005], resp. 2 % [Hoster et al. 2016].

Dále je to varianta podobná marginální zóně (marginal zone-like) (viz obrázek 2), která připomíná elementy marginální zóny. Jsou v ní totiž zastíženy okrsky buněk s bohatou bledou cytoplazmou. Tato varianta napodobuje B-lymfom marginální zóny [Swerdlow et al. 2008].

Další cytomorfologické varianty jsou někdy souhrnně nazývány agresivními variantami, jmenovitě se jedná o pleomorfní a blastoidní variantu. U pleomorfní varianty jsou přítomny buňky rozmanitých tvarů, z nichž mnohé odpovídají velkým lymfocytárním elementům s oválnými či nepravidelnými jadernými konturami, bledou cytoplazmou a v části buněk s prominujícím jadérkem [Swerdlow et al. 2008]. Tato varianta připomíná difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL), její zastoupení je 5,9 % MCL [Tiemann et al. 2005]. V případě blastoidní varianty (viz obrázek 2) buňky připomínají lymfoblasty s disperzním chromatinem a s vysokou mitotickou aktivitou (nejméně 20–30 mitóz/10 hpf) [Swerdlow et al. 2008]. Zastoupení této varianty je 2,6 % [Tiemann et al. 2005]. Výskyt obou agresivních variant, tedy blastoidní a pleomorfní varianty, je dle některých zdrojů vyšší, a to 10–16 %. V jejich případě jsou uváděny hodnoty kratšího mediánu přežití oproti ostatním variantám [Hoster et al. 2016, Rätty et al. 2002].

Cytomorfologická varianta však není stacionární, ale v průběhu onemocnění se může měnit, a to jak směrem od neagresivních k agresivním variantám, tak i opačným směrem. Ve

studii porovnávající případy recidivujících MCL, kde byl kromě primárního vzorku odebrán i vzorek při recidivě onemocnění, bylo zjištěno, že u 22 % případů klasických/malobuněčných variant zjištěných z primárního vzorku byla ze vzorku při recidivě onemocnění diagnostikována blastoidní varianta. Naopak u 50 % blastoidních variant MCL zjištěných z primárního vzorku byla při recidivě prokázána klasická varianta [Vogt et al. 2013].



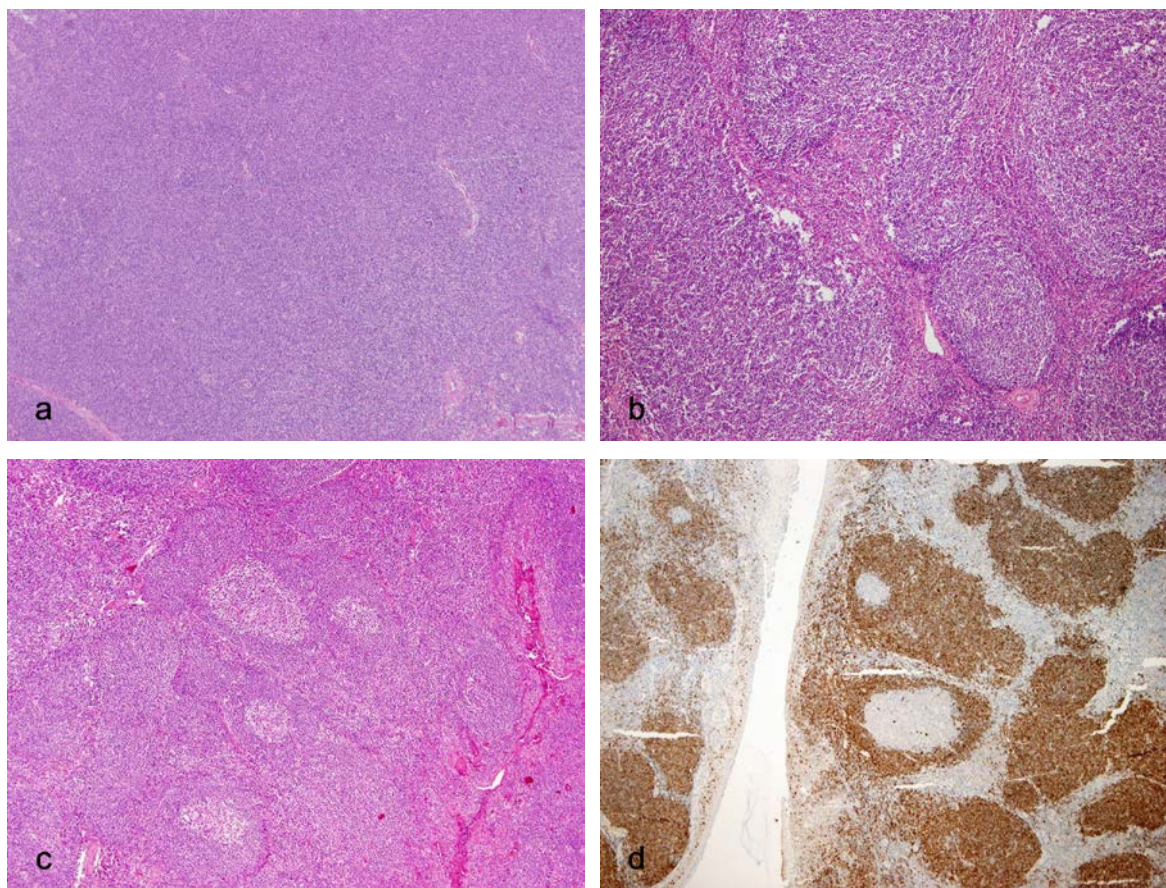
Obrázek 2 – cytomorfologické varianty MCL – klasická (a), malobuněčná (small cell) (b), z buněk podobných marginální zóně (marginal zone-like) (c), blastoidní (d), barvení H-E, zvětšení 400×

1.1.2 Architektonické varianty lymfomu z pláštěvých buněk

Nejčastěji lymfom z pláštěvých buněk postihuje lymfatické uzliny. V nich rozeznáváme několik způsobů infiltrace tkáně, tzv. architektonických variant. Jedná se o variantu difúzní, nodulární a pláštěvé zóny (mantle zone) [Swerdlow et al. 2008]. V difúzní variantě je patrná homogenní nádorová infiltrace zcela nahrazující architekturu lymfatické uzliny (viz obrázek 3). Tato varianta odpovídá 80,5 % případů MCL [Tiemann et al. 2005], resp. 63 % [Hoster et al. 2016].

U nodulární varianty nacházíme naznačené noduly, v nichž nejsou zastíženy ani reziduální struktury zárodečného centra (viz obrázek 3). Tato varianta se vyskytuje u 18,1 % MCL [Tiemann et al. 2005], resp. u 27 % [Hoster et al. 2016].

Poslední, nejméně častou variantou (1,4 % případně 11 % případů MCL [Hoster et al. 2016, Tiemann et al. 2005]) je varianta pláštěvé zóny (mantle zone). V tomto případě nádorové buňky infiltrují pouze rozšířenou pláštěvou zónu obklopující malá, či naopak



Obrázek 3 – architektonické varianty MCL – difúzní (a), nodulární (b) a plášťové zóny (mantle zone) v barvení H-E (c) a zvýraznění nádorové infiltrace u varianty plášťové zóny pomocí imunohistochemického barvení s cyklinem D1 (d), zvětšení 50×

hyperplastická zárodečná centra (viz obrázek 3).

Speciálním, velmi řídkým diagnostikovaným nálezem, je tzv. „in situ“ varianta lymfomu z plášťových buněk („in situ mantle cell lymphoma“). V tomto případě je struktura lymfatické uzliny zachovalá, zárodečná centra jsou obklopena přiměřeně širokou či jen mírně rozšířenou plášťovou zónou, v níž se nacházejí rozptýlené elementy MCL odpovídající malým až středně velkým buňkám s chudou cytoplazmou, s mírně členitými a nepravidelnými jádry, v nichž není patrné jadérko. U těchto elementů je typický nález při imunohistochemickém vyšetření svědčící pro MCL, tedy pozitivita s cyklinem D1 a CD 5. Interfolikulárně však tyto buňky zastiženy nejsou. Toto rozvrstvení je patrné také imunohistochemicky. Tento stav je považován za iniciální postižení lymfatické uzliny lymfomem z plášťových buněk [Aqel et al. 2008, Richard et al. 2006], i když plně vyvinutý MCL, případně jiný B-lymfom, se časem objeví jen u malého procenta těchto pacientů. Carvajal-Cuenca uvádí z 12 zkoumaných případů, u nichž v době diagnózy „in situ“ lymfomu z plášťových buněk nebyl diagnostikován jiný lymfom, pouze jednoho pacienta, u něhož se po 4 letech od diagnózy „in situ“ lymfomu z plášťových buněk objevil plně vyvinutý MCL [Carvajal-Cuenca et al. 2012].

Výše uvedené architektonické varianty odpovídají míře infiltrace lymfatické tkáně elementy MCL. Za iniciální postižení lymfatické tkáně MCL je považován „in situ“ lymfom z plášťových buněk, který přechází do varianty infiltrace omezené pouze na plášťovou zónu, která časem progreduje do nodulární a pak do difúzní varianty [Adam et al. 2012,

1.1.3 Extranodální lokalizace postižení lymfomem z pláštěvých buněk

Mimo lymfatické uzliny mohou být lymfomem z pláštěvých buněk postiženy i další lokalizace, nejčastěji to bývá kostní dřev a slezina [Siddiqui et al. 2009, Thakral et al. 2015]. 65 % případů MCL je spojeno s extranodálním postižením, avšak většinou bývá současně přítomna i lymfadenopatie (přítomna u 97 % případů MCL). Extranodální postižení bez současné lymfadenopatie je u MCL málo časté [Baheti et al. 2015].

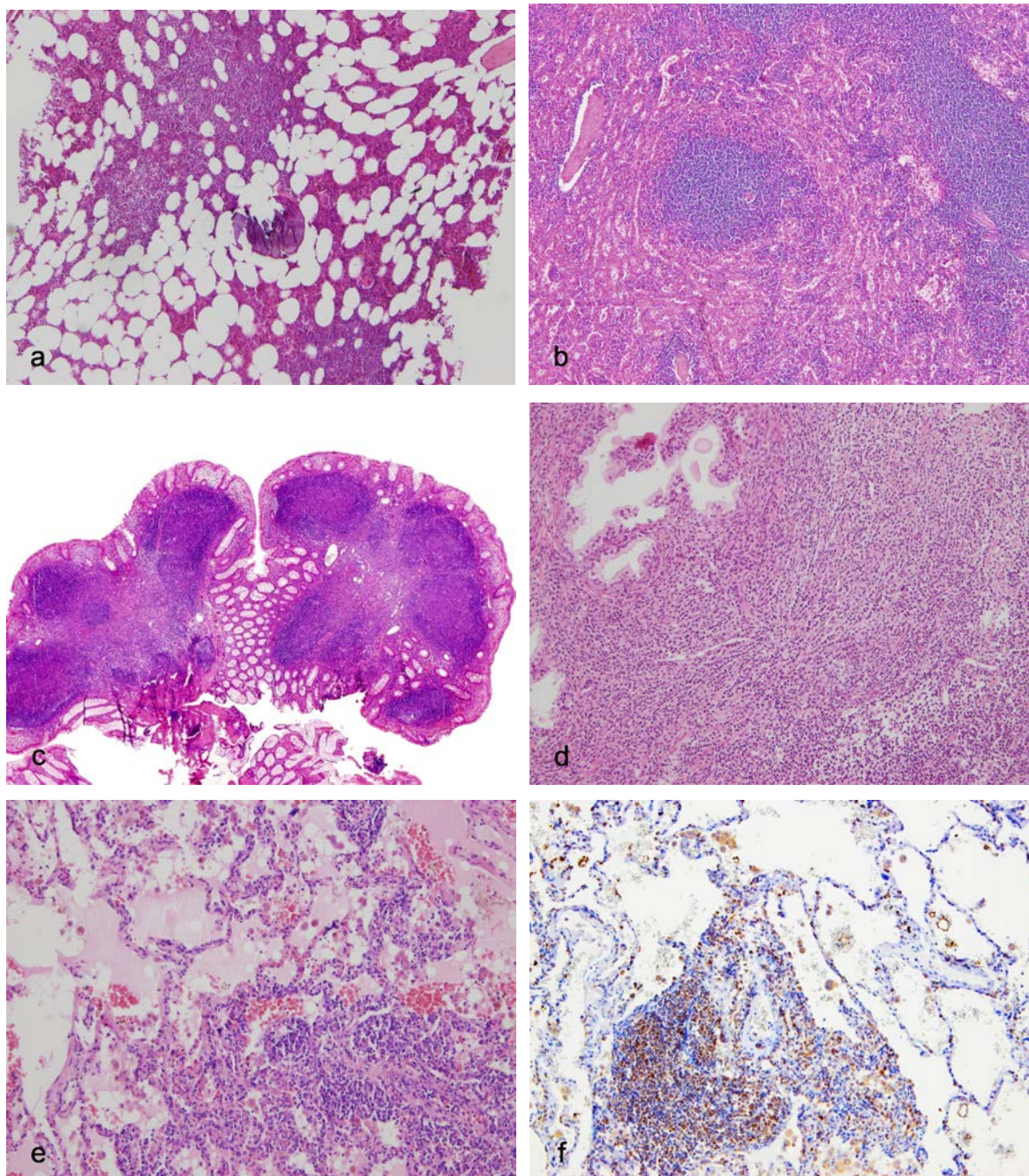
Nejčastější extranodální lokalizací u MCL je infiltrace kostní dřevě, a to u 60–80 % případů [Ioachim et al. 2008b], následuje postižení sleziny se splenomegalií u 27–50 % případů [Baheti et al. 2015, Ioachim et al. 2008b], v 24 % je zjištěno postižení trávicího traktu, ve 13 % postižení plic, ve 12 % kůže a podkoží, postižení mozku ve 4 % případů [Baheti et al. 2015], časté je též postižení Waldeyerova mízního okruhu [Siddiqui et al. 2009, Thakral et al. 2015].

Kostní dřev je nejčastější extranodální lokalizací u MCL. Cytologicky mají nádorové buňky typický vzhled MCL, tedy středně velké lymfoidní buňky s nepravidelnými jadernými konturami včetně „naštěpených jader“. Strukturálně je většinou přítomna nodulární infiltrace lokalizovaná spíše mimo sousedství trabekul než paratrabekulárně (viz obrázek 4). V menším množství případů bývá zjišťována infiltrace intersticiální či difúzní [Ioachim et al. 2008b]. Rozsáhlá infiltrace kostní dřevě bývá především u pacientů s leukemickou fází postižení. V periferní krvi se běžně nachází malé množství cirkulujících nádorových lymfocytů u 75 % pacientů s MCL, při flow-cytometrickém vyšetření až u 90 % pacientů [Ioachim et al. 2008b]. Za leukemickou fází u MCL jsou považovány hodnoty absolutní lymfocytózy, tedy nad $9 \times 10^9/l$, někteří autoři však za rizikové považují již hodnoty nad $5 \times 10^9/l$ [Ferrer et al. 2007].

Při postižení sleziny bývá postižena nejdříve bílá pulpa, která je většinou kompletně nahrazena nádorem (viz obrázek 4). Při rozsáhlejší postižení může být infiltrována i červená pulpa. Nádorové buňky mohou také nahradit pouze pláštěvou zónu či plášť spolu se zárodečným centrem, a imitovat tak B-lymfom marginální zóny [Ioachim et al. 2008b].

Mimo lymfadenopatie, splenomegalie a postižení kostní dřevě se další lokalizace u MCL vyskytují v menšině případů (viz obrázek 4). Z nich je na prvním místě trávicí trakt [Ferry 2008, Siddiqui et al. 2009]. Ten bývá obvykle postižen ve formě mnohočetné lymfomatózní polypózy, která se šíří ze žaludku do rekta. Tato forma postihuje 10 % pacientů s MCL. Většinou bývá postiženo ileum a cékum, naopak bez postižení je obvykle oblast řiti a jícnu [Romaguera et al. 2003]. Infiltrace trávicího traktu MCL se však může projevit také jako difúzní infiltrace stěny až celého trávicího traktu [Tamura et al. 2004], či pouze jako jediná objemná nádorová masa vyklenující se do lumen [Kelkitli et al. 2014], nebo jako povrchově ulcerovaná masa makroskopicky imitující karcinom [Petranovic et al. 2012]. Avšak i histologické vyšetření u makroskopicky normální sliznice vykazuje pozitivitu nádorových buněk až v 84 % vzorků z tlustého střeva a u 45 % vzorků sliznice z horní části trávicího traktu s tím, že při postižení horní části trávicího traktu bývá téměř vždy postižena i dolní část trávicího traktu [Romaguera et al. 2003]. Zajímavé zjištění ohledně zjištění rizika postižení trávicího traktu přináší Geissmann, který zkoumal expresi protilátky proti $\alpha 4\beta 7$ integrinu v lymfatických uzlinách u malého souboru pacientů s MCL, u nichž bylo následně provedeno vyšetření trávicího traktu, i když klinicky pacienti neměli žádné potíže [Geissmann et al. 1998]. Pozitivita reakce bývá u případů s infiltrací trávicího

traktu (5 ze 7 případů), ale nikoli u případů, kde trávicí trakt postižen není. $\alpha 4\beta 7$ integrin totiž funguje jako receptorový ligand kontrolující migraci T- a B-lymfocytů do střevní sliznice a je selektivně exprimován ve stěně střeva a také ve slezině. Dle Geissmana je možné pomocí tohoto imunohistochemického vyšetření identifikovat pacienty, u nichž bude vyšetření trávicího traktu přínosné i v případě absence klinických symptomů. Další práce ověřující jeho závěry na větším souboru pacientů však publikovány nebyly.



Obrázek 4 – extranodální lokalizace MCL – nodulární infiltrace kostní dřeně (a), infiltrace bílé pulpy sleziny (b), nádorový polyp sliznice tlustého střeva (c), infiltrace prostaty (d), infiltrace plic v barvení H-E (e) a v imunohistochemickém barvení s cyklinem D1 (f), zvětšení (a)–(c) 50 \times , (d)–(f) 100 \times

Infiltrace MCL může být i ve Waldeyerově mízním okruhu. Obvykle bývá postižena patrová mandle. MCL je v této lokalizaci po DLBCL druhým nejčastějším lymfomem [Vasilakaki et al. 2015].

Postižení kůže se může projevit jako papulární erytematózní léze či jako ulcerovaná léze [de Paz et al. 2011].

Z extranodálních lokalizací MCL je prognosticky nejzávažnější infiltrace centrální nervové soustavy. Ta se většinou objevuje až jako pozdní komplikace onemocnění. Medián doby od diagnózy MCL k rozvoji postižení centrální nervové soustavy (CNS) byl 25 měsíců, medián přežití po zjištění postižení centrální nervové soustavy jsou pouhé 3 měsíce, všichni pacienti zemřeli do 9 měsíců [Ferrer et al. 2008]. V této studii byly rizikovými faktory pro rozvoj postižení CNS určeny: blastoidní varianta MCL, hodnota Ki-67 nad 50 %, vysoká hladina laktátdehydrogenázy v séru a vysoká hodnota mezinárodního prognostického indexu IPI (International Prognostic Index [International non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project 1993]).

1.1.4 Diferenciální diagnostika

Lymfom z pláštěvých buněk je typicky tvořen populací monomorfních malých a středně velkých lymfocytů imunohistochemicky pozitivních s CD5 a cyklinem D1 a s molekulárně genetickým průkazem t(11;14).

V některých případech může činit obtíže odlišení architektonické varianty pláštěvé zóny u MCL od reaktivní folikulární hyperplázie. Oproti této variantě MCL bývají u folikulární hyperplázie tenčí pláštěvé zóny a buňky bývají menší, avšak rozhodující metodou pro odlišení obou jednotek je imunohistochemie s nálezem positivity reakce s CD5 a cyklinem D1 v MCL, případně také molekulárně genetický průkaz t(11;14) [Ioachim et al. 2008b]. Zajímavý nález u folikulární hyperplázie ve vztahu k MCL popisuje Edlefsen, který u pacienta s nově diagnostikovaným MCL revidoval 4 roky starý biotický materiál z kolektomie, prováděné pro kolorektální karcinom, a v mezenterálních lymfatických uzlinách byla prokázána infiltrace hyperplastických germinálních center lymfatické uzliny elementy pozitivními s cyklinem D1 a slabě pozitivními s CD5, tedy struktury odpovídající „in situ“ lymfomu z pláštěvých buněk, který nazývá jeho folikulární variantou [Edlefsen et al. 2011].

Architektonická varianta pláštěvé zóny MCL může morfologicky imitovat také hyalinně vaskulární formu Castlemannovy choroby. U té bývají přítomny typicky široké pláštěvé zóny tvořené koncentrickými prstenci z malých lymfocytů. Tyto prstence obkružují částečně hyalinizovaná atrofická germinální centra. Diagnózu Castlemannovy choroby lze však stanovit až po imunohistochemickém vyšetření vylučujícím přítomnost lymfomu, a to nejen MCL, ale i folikulárního lymfomu, lymfomu z marginální zóny či DLBCL, které mohou morfologii Castlemannovy choroby také imitovat [Siddiqi et al. 2011].

Diferenciální diagnostika vůči ostatním B-lymfomům kopíruje jednotlivé cytomorfologické varianty MCL. Jmenovitě B-chronická lymfatická leukémie/lymfom z malých B buněk (B-CLL/SLL) přichází v úvahu u difúzní architektonické varianty u mírně nepravidelných buněk a obzvláště u malobuněčné (small cell) cytomorfologické varianty. U B-CLL/SLL však bývá k infiltraci, tvořené malými lymfocyty, patrná příměs prolymfocytů a paraimunoblastů s bohatší cytoplazmou a prominujícím jádrem [Zhao 2009]. Další známkou typickou pro B-SLL/CLL v extramedulárních vzorcích bývají světlejší nodulární okrsky odpovídající proliferačním centrům, která jsou také nazývána pseudofolikly [Ioachim et al. 2008a]. V nich je vyšší proliferační aktivita zobrazená

proliferacími markery (obvykle Ki-67) oproti zbytku postižené lymfatické tkáně. Při imunohistochemickém vyšetření lze obě jednotky, které jsou obě pozitivní s CD5, odlišit pomocí protilátek CD23, která je pozitivní u B-CLL/SLL, a cyklinu D1, který je obvykle pozitivní u MCL. Diagnostické potíže způsobuje cca 5–10 % případů B-CLL/SLL, které jsou negativní s CD23, a cca 10% MCL, které jsou naopak pozitivní i s CD23 [Ioachim et al. 2008a]. Případy B-CLL/SLL jsou však negativní s cyklinem D1, i když je třeba mít na paměti, že v části případů v proliferacích centrech B-CLL/SLL může být také zjištěna pozitivita cyklinu D1, i když se o MCL nejedná [Abboudi et al. 2009, Gradowski et al. 2012], a stejně tak může být zjištěna slabá pozitivita cyklinu D1 v malém procentu elementů B-CLL/SLL [O'Malley et al. 2005, Zhao 2009]. V těchto případech je k diagnostice nápomocné molekulárně genetické vyšetření t(11;14), jehož pozitivita případně potvrdí diagnózu MCL.

Monocytoidní cytomorfoloická varianta MCL může díky bohaté bledé cytoplazmě buněk imitovat lymfom z marginální zóny. V tomto případě však imunohistochemická pozitivita s CD5 a cyklinem D1, příp. průkaz t(11;14) bývají dostačující k zjištění správné diagnózy [Ioachim et al. 2008b]. Problémem u části případů monocytoidní varianty MCL je negativita CD5, která může vést k chybné diagnóze lymfomu marginální zóny, pokud není současně provedeno i imunohistochemické vyšetření s cyklinem D1 ozřejmující správnou diagnózu [Golardi et al. 2009, Hashimoto et al. 2012, Mansoor et al. 2007].

Nodulární architektonická varianta MCL může v některých případech imitovat folikulární lymfom, obzvláště v případech s ložiskově zachovalými germinálními centry, či s příměsí centroblastů. Pro odlišení jednotek bývá dostačující imunohistochemické vyšetření, a to ve folikulárním lymfomu pozitivita s CD10 či BCL6 a negativita s cyklinem D1, obvykle také s CD5 a CD43, popřípadě průkaz translokace t(14;18) [Ioachim et al. 2008b].

Blastoidní cytomorfoloická varianta může imitovat B-lymfoblastickou leukémii/lymfoblastický lymfom, avšak k jejímu odlišení od MCL je dostačující imunohistochemické vyšetření prokazující pozitivitu s TdT a negativitu s cyklinem D1 a CD5 [Cortelazzo et al. 2011].

Pleomorfní cytomorfoloická varianta je tvořena středně velkými až velkými buňkami připomínajícími difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL), který je na rozdíl od MCL obvykle negativní s CD5, cyklinem D1 i SOX11 a není v něm prokázána translokace t(11;14) [Ioachim et al. 2008b, Zeng et al. 2012]. Je však třeba podotknout, že jsou popsány případy DLBCL s pozitivitou cyklinu D1, kde byla zjištěna pozitivita MUM-1 či BCL6, u nichž při molekulárně genetickém vyšetření nebyla prokázána t(11;14) [Ehinger et al. 2008, Lucioni et al. 2011]. Byly však diagnostikovány také případy DLBCL, u nichž byla prokázána mimo pozitivitu cyklinu D1 i translokace t(11;14), avšak další nálezy včetně imunohistochemie (pozitivita s BCL6, MUM-1 a negativita s CD5 a SOX11 a také průkaz rearanže genu BCL6) svědčily spíše pro DLBCL. Tyto jednotlivé případy však patří spíše do šedé zóny mezi MCL a DLBCL [Al-Kawaaz et al. 2015, Ehinger et al. 2008, Juskevicius et al. 2014].

Avšak DLBCL a B-CLL/SLL nejsou jediné lymfomy, u nichž byla popsána pozitivita hlavního diagnostického imunohistochemického markeru MCL, tedy cyklinu D1. Pozitivita byla popsána také u leukémie z vlasatých buněk [Liu et al. 2015], u jednotlivých případech folikulárního lymfomu [Rudzki et al. 2013], ale i u T-lymfomů, jmenovitě periferního T-lymfomu [Aquino et al. 2012], anaplastického velkobuněčného T-lymfomu či mycosis fungoides [Mao et al. 2006] a také u cca 1/4 případů mnohočetného myelomu [Pruneri et al. 2000]. V těchto případech je však z morfologie nádoru i z dalších výsledků imunohistochemického, příp. molekulárně genetického vyšetření možné dovodit správnou diagnózu.

Byl také popsán jeden případ folikulárního lymfomu s pozitivitou nejen cyklinu D1, ale také translokace t(11;14) i t(14;18). Jednalo se morfologicky o běžně vypadající low-grade folikulární lymfom, u něhož byla i přes tyto výsledky vyloučena varianta kompozitního lymfomu s MCL [Olsen et al. 2009]. Translokace t(11;14) se také nachází u části případů mnohočetného myelomu [Pruneri et al. 2000], avšak morfologie odpovídající plazmocytům v kombinaci s pozitivitou CD138 a negativitou B-antigenů a CD5 bývá dostačující ke stanovení správné diagnózy [Ioachim et al. 2008b].

Větší potíže při stanovení diagnózy způsobují případy MCL, které jsou cyklin D1 negativní. U těchto nálezů s pozitivitou CD5 a negativitou CD23 je vhodné provést molekulárně genetické vyšetření t(11;14), které diagnózu MCL obvykle ozřejmí. Diagnostický přínos positivity cyklinu D2 či cyklinu D3, která je u případů negativních s cyklinem D1 uváděna v některých publikacích [Fu et al. 2005], je na rozdíl od cyklinu D1 nízký, neboť byla zjištěna jejich pozitivita také v DLBCL, folikulárním lymfomu, lymfoplazmocytickém a lymfoblastickém lymfomu, v lymfomu marginální zóny, v klasickém Hodgkinově lymfomu, v T-lymfomech i v akutní myeloidní leukémii [Metcalf et al. 2010, Quintanilla-Martinez et al. 2009]. Nápomocnou u těchto případů může být spíše protilátka SOX11, která je pozitivní ve většině MCL, včetně případů negativních s cyklinem D1. U SOX11 byla pozitivita zjištěna i v části Burkittových lymfomů, lymfoblastických lymfomů, leukémie z vlasatých buněk i jednotlivých případů DLBCL a splenického lymfomu marginální zóny [Dictor et al. 2009, Chen et al. 2010, Mozos et al. 2009, Nakashima et al. 2014, Zeng et al. 2012].

Samozřejmě pro potvrzení diagnózy je vhodné následně provést vyšetření t(11;14). Avšak ani toto vyšetření není pro MCL zcela specifické. Nejenže jsou popsány případy mnohočetného myelomu [Pruneri et al. 2000] a DLBCL [Al-Kawaaz et al. 2015, Ehinger et al. 2008] s prokázanou t(11;14) (viz výše), ale také jsou popsány případy MCL, u nichž t(11;14) nebyla prokázána, přestože morfologicky včetně difúzní imunohistochemické positivity cyklinu D1 odpovídají MCL. U těchto nádorů byly prokázány jiné genetické abnormality, jmenovitě translokace t(6;14), t(11;22), t(11;19), t(2;14) či monosomie 11. chromozómu [Hunt et al. 2008, Wlodarska et al. 2008]. Proto je nutné jednotlivé výsledky imunohistochemického vyšetření, ale i molekulární genetiky interpretovat v morfologickém kontextu nádoru.

1.1.5 Prognostické markery lymfomu z plášťových buněk

Délka přežití u lymfomu z plášťových buněk bývá 3–5 let při použití konvenční terapie [Hoster et al. 2008], avšak postupně dochází ke zlepšování prognózy pacientů díky zavedení nových léčebných postupů, ať už to je zavedení monoklonální protilátky rituximabu, intenzivních léčebných protokolů obsahujících vysokodávkový cytarabin či autologní transplantaci krvetvorných buněk a následnou udržovací léčbu rituximabem [Geisler et al. 2008, Kluin-Nelemans et al. 2012]. Existuje však i malá skupina pacientů s indolentním průběhem onemocnění, u nichž je doba přežití i délka trvání remise po terapii první linie delší než 10 let [Hoster et al. 2008, Swerdlow et al. 2008]. Někteří z těchto pacientů dokonce po diagnóze MCL nevyžadují po dobu nejméně dvou let žádnou terapii [Fernández et al. 2010, Nygren et al. 2012]. Podle retrospektivních studií je těchto pacientů 3–9 % [Nygren et al. 2012, Ondrejka et al. 2011].

Problémem je, že ve většině prací jsou tyto případy stanoveny až retrospektivně. A proto je hledán způsob, jak tyto skupiny pacientů od sebe již v době diagnózy MCL odlišit a následně zvolit terapeutický postup na jednu stranu dostatečně účinný proti nádoru, ale současně co nejšetrnější k pacientovi. Toto je hlavním důvodem, proč jsou hledány

prognostické markery, které by tyto skupiny od sebe s vysokou pravděpodobností odlišily.

1.1.5.1 Prognostický vliv cytomorfologických a architektonických variant lymfomu z plášťových buněk

Dle WHO klasifikace je jako negativní prognostický faktor u cytomorfologických variant popisována přítomnost některé z agresivních variant, tedy blastoidní a pleomorfní varianty [Swerdlow et al. 2008]. Výsledky publikovaných studií však nejsou tak jednoznačné. Zatímco Rätty negativní vliv agresivních variant proti ostatním variantám na celkové přežití potvrzuje (medián přežití u agresivních variant 11 měsíců, u ostatních variant 40 měsíců, $P < 0,001$ [Rätty et al. 2002]) stejně jako Hoster (medián OS 2,6 vs. 8,5 roku, $P < 0,001$ [Hoster et al. 2016]), další autoři jej jako nevýznamný nepotvrzují [Geisler et al. 2008, Romaguera et al. 2003, Tiemann et al. 2005].

U architektonických variant MCL byl zjištěn lepší prognostický vliv u varianty plášťové zóny oproti ostatním variantám (třileté přežití 100 % proti 55 %) [Majlis et al. 1997]. V jiných pracích byl zjištěn prognostický vliv variant nodulární a plášťové zóny proti variantě difúzní (mediány OS 43 a 29 měsíců, $P = 0,0074$ [Tiemann et al. 2005]; medián OS nedosažen a 7,8 roku, $P = 0,0466$ [Hoster et al. 2016]; medián OS 70 vs. 35 měsíců [Rätty et al. 2002]). Výsledky však nejsou jednoznačné, protože v další práci prognostický vliv architektonických variant prokázán nebyl [Argatoff et al. 1997].

1.1.5.2 Prognostický vliv imunohistochemických markerů používaných při diagnostice lymfomu z plášťových buněk

Vliv rozdílného imunofenotypu na prognózu oproti klasickému imunofenotypu (negativita s CD23, pozitivita s CD5 a cyklinem D1) byl zkoumán pouze v jednotlivých studiích. Byla zjištěna lepší prognóza u případů MCL pozitivních s CD23 proti případům negativním (bezpříznakové čtyřleté přežití u 45 % případů proti 19 %, $P = 0,02$) [Kelemen et al. 2008]. Byla zjištěna lepší prognóza u případů negativních s cyklinem D1 oproti případům pozitivním (pětileté přežití 86 % a 30 %, $P = 0,0002$) [Yatabe et al. 2000], avšak podle jiné studie se prognóza u případů negativních i pozitivních s cyklinem D1 významněji neliší [Fu et al. 2005]. U případů imunohistochemicky negativních s protilátkou CD5 jsou popsány pouze jednotlivé případy s lepší prognózou pacientů [Alvarez-Argote et al. 2014, Hashimoto et al. 2012], ale systematická studie porovnávající prognostický vliv positivity a negativity reakce s CD5 u MCL publikována zatím nebyla.

Dalším diagnostickým imunomarkerem pro MCL je SOX11 (neuronální transkripční faktor SRY (sex determining region Y)-box 11), který je popisován jak ve většině MCL pozitivních s cyklinem D1, tak i negativních (93 % a 100 % [Mozos et al. 2009]). V jiných studiích věnovaných SOX11 je zastoupení této protilátky nižší, je pozitivní např. v 72 % případů [Navarro et al. 2012]. Objevují se však studie, podle nichž je tento marker nejen diagnostickým, ale i prognostickým. Výsledky jednotlivých studií jsou však rozporuplné, protože bylo zjištěno jak významně lepší přežití pacientů s MCL negativním se SOX11 oproti pozitivním případům [Fernández et al. 2010, Navarro et al. 2012], tak i výsledek opačný, tedy lepší přežití pacientů s MCL pozitivním se SOX11 v porovnání s negativními případy [Nygren et al. 2012].

1.1.5.3 Prognostický vliv proliferační aktivity

Pravděpodobně nejužívanějším, již delší dobu známým prognostickým faktorem MCL je míra proliferace. Ve starších studiích byla počítána jako počet mitóz na určitý počet hpf [Weisenburger et al. 1981] či na mm^2 . Dnes je spíše používáno stanovení procenta pozitivních buněk pomocí imunohistochemického barvení proliferačního markeru Ki-67 (proliferační aktivita).

Ki-67 vykazuje pozitivitu jak v interfázi (G1, S, G2 fázi), tak v mitotické (M) fázi buněčného cyklu, ale chybí v klidové (G0) fázi [Scholzen et al. 2000]. Čím vyšší je procento pozitivních buněk, tím je nižší očekávaná délka dalšího přežití pacienta s MCL. Vliv proliferační aktivity na přežití pacientů byl potvrzen mnohými pracemi [Determann et al. 2008, Garcia et al. 2009, Hoster et al. 2016, Tiemann et al. 2005]. Problémem je cut-off pro odlišení skupin nízkého a vysokého rizika, protože rozptyl této hodnoty je v jednotlivých pracích obrovský, pohybuje se od 10 % [Schrader et al. 2004] do 50 % [Martinez et al. 2004].

Je zajímavé, že při porovnání proliferační aktivity u případů, kde byl k dispozici vzorek z primární diagnózy MCL a z následné recidivy, hodnota proliferační aktivity u 74 % případů vzrostla, u zbývajících 26 % případů naopak poklesla, medián proliferační aktivity byl u prvního vzorku 15,5 %, u druhého již 23,5 %, u třetího již 28,5 %. Proliferační aktivita tedy v průběhu recidivujícího onemocnění většinou postupně roste [Vogt et al. 2013].

1.1.5.4 Prognostický vliv dalších markerů buněčného dělení

Další prognostické markery popisované v literatuře jsou proteiny exprimované během některé fáze buněčného dělení, tj. jsou velmi podobné účelu markeru Ki-67. Jedním z nich je topoizomeráza $\text{II}\alpha$. Úkolem topoizomeráz typu II je zajištění terciální struktury DNA, a to jak jejího stočení, tak i rozvinutí. Uplatňují se během replikace, transkripce, kondenzace a segregace chromozómů [Schrader et al. 2004]. U typu II jsou známy dvě formy, a to alfa a beta. Zatímco hodnoty topoizomerázy beta jsou konstantní po celý buněčný cyklus, množství topoizomerázy alfa roste rapidně v proliferačních buňkách, konkrétně je exprimovaná v S a G2 a M fázi buněčného cyklu [Korkolopoulou et al. 2004]. Také proto je topoizomeráza $\text{II}\alpha$ cílem některých cytotoxických léků užívaných v hematologii (inhibitory topoizomerázy $\text{II}\alpha$) jako je etoposid, teniposid, doxorubicin, epirubicin, mitoxantron a amsakin užívané v některých kombinacích pro terapii lymfomu z plášťových buněk [Korkolopoulou et al. 2004]. Prognostické výsledky exprese topoizomerázy $\text{II}\alpha$ u nádorových onemocnění jsou však sporné, např. u adenokarcinomu žaludku prognostický vliv prokázán nebyl [Wang et al. 2011], u Hodgkinova lymfomu byl v jedné studii prokázán negativní prognostický vliv 4. kvartilu hodnot zastoupení buněk pozitivních v reakci s topoizomerázou $\text{II}\alpha$ (hodnoty nad 78 %) [Doussis-Anagnostopoulou et al. 2008], avšak dle jiné studie mají horší prognózu případy s expresí do 30 % [Provencio et al. 2003]. U MCL byla exprese topoizomerázy $\text{II}\alpha$ do 10 % spojena s mediánem přežití 49 měsíců proti 17 měsícům u případů s více než 10 % pozitivních buněk [Schrader et al. 2004]. V uvedené studii [Schrader et al. 2004] je nadřazována hodnota exprese topoizomerázy $\text{II}\alpha$ ve vztahu k přežití pacienta nad Ki-67 i tehdy udávanému mezinárodním prognostickému indexu IPI (International Prognostic Index [International non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project 1993]), nadřazený vztah k Ki-67 je však zpochybňován [Korkolopoulou et al. 2004].

Dalším navrhovaným prognostickým markerem MCL je repp-86 (restrictedly expressed proliferation associated protein), což je protein 86 kDa, který je specifický pro

fáze S, G2 a M mitotického dělení [Schrader et al. 2005], ale nikoli pro fázi G1. Repp-86 je charakterizován jako lidský homolog *Xenopus* proteinu TPX2, což je protein asociovaný s mikrotubuly, který je nutný během mitózy pro shromáždění mikrotubulů indukované chromatinem. V jednotlivých studiích byl zjištěn jako prognostický faktor u karcinomu hrtanu [Cordes et al. 2010], endometriálního karcinomu [Bonatz et al. 1999] a neuroblastomu [Krams et al. 2003]. U MCL byl při expresi do 5 % nádorových buněk zjištěn medián přežití 48 měsíců, nad 5 % pak pouze 19,9 měsíce ($P < 0,0001$) [Schrader et al. 2005].

1.1.5.5 Prognostický vliv survivinu

Navrhovaným prognostickým markerem u lymfomu z pláštěvých buněk je také survivin, což je inhibitor apoptózy [Martinez et al. 2004]. Je exprimován během mitózy, jeho hladina je za normálních okolností nedetekovatelná, je vysoká během embryogeneze a v nádorech. Zvýšená exprese v nádorech je spojena s horší prognózou a agresivním chováním, například u karcinomu prsu [Li et al. 2014], žlučníku [Nigam et al. 2015] či u DLBCL [Markovic et al. 2012]. U MCL byla aktivita survivinu stanovována pozitivitou buněk při imunohistochemickém vyšetření pomocí anti-survivinové protilátky a analýzou survivinové m-RNA pomocí RT-PCR. Při expresi survivinu ve více než 20 % nádorových buněk odpovídá medián celkového přežití 8 měsícům, pod 20 % pak 60 měsícům ($P = 0,0003$). Při použití stanovení m-RNA survivinu je medián celkového přežití u vysoké exprese 24 měsíců a u nízké exprese 80 měsíců ($P = 0,00023$) [Martinez et al. 2004].

1.1.5.6 Molekulárně genetické prognostické markery

Další velmi rozsáhlou oblastí výzkumu je hledání prognostických markerů zjišťovaných molekulárně genetickými metodami. Jedním z nich je mutace tumor supresorového genu p53, která byla diagnostikována pomocí PCR. Případy MCL s mutací p53 měly medián přežití 1,3 roku, zatímco případy bez této mutace 5,1 roku ($P = 0,023$) [Greiner et al. 1996]. Je však třeba poznamenat, že mutace p53 jsou zjišťovány pouze u malé části případů MCL, konkrétně u 15 % [Greiner et al. 1996]. Pro průkaz zvýšené exprese p53 lze samozřejmě použít imunohistochemické vyšetření, taktéž zde byl prokázán negativní prognostický vliv zvýšené exprese p53, $P = 0,001$ [Chiarle et al. 2000].

Prognostický vliv byl také zjištěn při zvýšené degradaci proteinu p27, inhibitoru cyklin dependentní kinázy, který za normálních okolností vyvolává zastavení buněčného cyklu v reakci na inhibiční stimuly, jakými jsou cyklický adenosin monofosfát či transformující růstový faktor β . U pacientů s nedetekovatelným p27 pomocí RT-PCR i Western-blotu byl medián přežití 44 měsíců, zatímco u pacientů se střední či vysokou expresí 67 měsíců, $P = 0,002$ [Chiarle et al. 2000].

Dalším navrhovaným způsobem je stanovení kvantitativní genové exprese pomocí míry exprese pěti genů, a to RAN, MYC, TNFRSF10B, POLE2 a SLC29A2 [Hartmann et al. 2008]. RAN gen kóduje guanointrifosfát vázící protein sloužící pro translokaci RNA i pro kontrolu syntézy DNA a kontrolu buněčného cyklu. MYC je gen pro transkripční faktor ovlivňující progresi cyklu a apoptózu. TNFRSF10B je gen, který kóduje jeden z receptorů tumor nekrotizujícího faktoru (TNF), který spouští apoptotický signál k aktivaci cytokinu TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL, ligandu indukujícího apoptózu spojeného s TNF). Jeho inaktivace je popsána u některých nádorů a nehodgkinských lymfomů. POLE2 kóduje epsilon B-podjednotku DNA polymerázy odpovídající za replikaci DNA a kontrolu cyklu. SLC29A2 je protein kódující gen, který patří do rodiny SCL29, tedy nosičů

nukleosidů, které přenášejí purinové a pyrimidinové nukleosidy. Vyšetřovací metodou je RT-PCR ve zmrazených i parafinových řezech, vliv každého z genů je přibližně srovnatelný. Vysoká exprese RAN, MYC, POLE2, SLC29A2 je spojena s horší prognózou, zatímco vysoká exprese TNFRSF10B je spojena s výrazně lepší prognózou. Tento molekulární test prognózy přežití v době diagnózy má s prognózou korelační koeficient 0,76, zatímco Ki-67 jen 0,72, to znamená, že tento předpovědní systém se zdá nadřazený imunohistochemickému stanovení Ki-67 [Hartmann et al. 2008].

Další oblastí je výzkum v oblasti mikro-RNA, tedy nekódujících krátkých jednovláknových řetězců RNA, které se váží jen k určitým m-RNA a tím snižují jejich transkripci v proteiny. Na malém počtu pacientů byl navržen model 6-mikroRNA známek (vysoká exprese miR129-3p, miR-135a, miR-146a, miR-424 a miR-450-5p a nízká exprese miR-222) odlišující případy MCL s horší prognózou [Iqbal et al. 2012]. V případech leukemických MCL byl zjištěn prognostický vliv v závislosti na nízké či vysoké míře exprese miR-34a [Navarro et al. 2013].

Stanovení vhodného prognostického modelu na podkladě analýzy některých genů, či míry exprese mikro-RNA, je však zatím stále otázkou dalšího výzkumu.

1.1.5.7 Mezinárodní prognostický index pro lymfom z pláštěvých buněk

Pro běžné klinické použití byly pro rozlišení rizikovosti pacientů navrženy indexy, počítané z klinických a laboratorních parametrů zjistitelných v době diagnózy MCL. Nejdříve byl u MCL používán mezinárodní prognostický index IPI (International Prognostic Index) využívaný pro určení prognózy pacientů s ne Hodgkinskými lymfomy [International non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project 1993]. Pro jeho určení je jeden bod započítán za každý z pozitivních faktorů, jmenovitě za věk nad 60 let, stav 2–4 podle ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group scale), za zvýšenou hladinu sérové laktátdehydrogenázy, za více jak jednu extranodální lokalizaci či za stádium III–IV dle Ann Arbor klasifikace (stádium I odpovídá postižení jedné skupiny lymfatických uzlin, stádium II postižení jedné skupiny lymfatických uzlin na stejné straně bránice, stádium III odpovídá postižení lymfatických uzlin na obou stranách bránice, stádium IV postižení jednoho či více extralymfatických orgánů s či bez postižení lymfatických uzlin). Celková hodnota IPI 0–1 bodů odpovídá nízkému riziku, 2 body nízkému střednímu riziku, 3 body vysokému střednímu riziku, 4–5 bodů vysokému riziku. Jeho použití bylo pro MCL limitované, protože většina pacientů spadala do skupiny nízkého a vysokého rizika a jen málo pacientů bylo ve skupinách středního rizika [Hoster et al. 2008].

Dále byla zkoumána použitelnost mezinárodního indexu pro folikulární lymfom (Follicular Lymphoma International Prognostic Index, FLIPI) [Møller et al. 2006]. Jeho slabou stránkou u MCL bylo, že špatně odlišoval skupiny nízkého a středního rizika a skupina vysokého rizika měla naopak relativně dobrou prognózu [Hoster et al. 2008]. FLIPI je počítán po 1 bodu za věk nad 60 let, za stádium III a IV dle Ann Arbor klasifikace, za postižení více jak 4 skupin uzlin, za sérový hemoglobin pod 12 g/dl a za zvýšení hladiny laktát dehydrogenázy v séru. Hodnoty 0–1 bod odpovídají skupině nízkého rizika, 2 body skupině středního rizika a 3 a více bodů skupina vysokého rizika [Møller et al. 2006].

Přímo pro MCL byl v r. 2008 navržen mezinárodní prognostický index pro lymfom z pláštěvých buněk (Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index, MIPI) [Hoster et al. 2008].

Ten je počítán dle vzorce:

$$\text{MIPI skóre} = 0,03535 \times (\text{věk}) + 1,367 \times \log_{10}(\text{LDH/ULN}) + 0,9393 \times \log_{10}(\text{WBC}/\mu\text{l}) (+ 0,6978 \text{ při ECOG} \geq 2)$$

Ve vzorci je věk uveden v letech, LDH/ULN odpovídá poměru hodnoty laktátdehydrogenázy v séru pacienta a horní hranice její normy v příslušné laboratoři, WBC/ μl odpovídá počtu leukocytů v μl periferní krve, hodnota 0,6978 je připočítávána pouze v případě, že hodnocení výkonnostního stavu dle ECOG je dva a více (0 – pacient nemá žádné symptomy; 1 – má symptomy, ale je chodící; 2 – pacient upoutaný na lůžko méně jak polovinu dne; 3 – pacient upoutaný na lůžko více jak polovinu dne; 4 – pacient dlouhodobě upoutaný na lůžko a vyžaduje asistenci s běžnými činnostmi).

Pomocí tohoto indexu byly stanoveny přibližně stejně velké rizikové skupiny pacientů, kdy hodnota nízkého rizika je pod 5,7, středního rizika od 5,7 (včetně) až k 6,2 a vysokého rizika nad 6,2 včetně. V souboru, na němž byl index vytvořen, spadalo do kategorie nízkého rizika 44 % pacientů, u nichž medián přežití nebyl dosažen, do skupiny středního rizika 35 % pacientů s mediánem přežití 51 měsíců a do skupiny s vysokým rizikem 21 % pacientů s mediánem přežití 29 měsíců [Hoster et al. 2008].

Pro snazší užití MIPI v klinické praxi byla navržena zjednodušená varianta výpočtu MIPI (simplified MIPI, s-MIPI), kritéria pro výpočet jsou uvedena v tabulce 1, kde skupina nízkého rizika odpovídá 0–3 bodům, středního rizika 4–5 bodům a vysokého rizika 6–11 bodům.

Tabulka 1 – kritéria pro výpočet s-MIPI [Hoster et al. 2008]

body	věk	ECOG	LDH/ULN	WBC/ μl
0	< 50	0–1	< 0,67	< 6700
1	50–59	–	0,67–0,99	6700–9999
2	60–69	2–4	1,00–1,49	10000–14999
3	≥ 70	–	$\geq 1,50$	≥ 15000

Dále byla do výpočtu MIPI mimo klinických parametrů započtena i proliferační aktivita stanovená jako procenta pozitivních buněk pomocí imunohistochemického markeru Ki-67. Varianta indexu MIPI s touto hodnotou byla nazvána kombinovaný biologický index (combined biologic index, MIPI_b):

$$\text{MIPI}_b = \text{MIPI skóre} + 0,02142 \times (\text{hodnota Ki-67 pozitivních buněk v \%})$$

Hraniční hodnoty jsou u skupiny nízkého rizika do 5,7, středního rizika od 5,7 včetně do 6,5 a skupina vysokého rizika skupina nad 6,5 včetně [Hoster et al. 2008].

Následně publikované studie pacientů s MCL, kteří jsou léčeni jednotlivými léčebnými protokoly, většinou potvrzují prognostický vliv MIPI [Budde et al. 2011, Geisler et al. 2010, Hoster et al. 2008, Hoster et al. 2014, Martin et al. 2009, van de Schans et al. 2010, Todorovic et al. 2012], pouze ve dvou případech nebyl prognostický vliv prokázán [Shah et al. 2008, Schaffel et al. 2010].

1.1.5.8 Prognostický vliv lymfocytózy

Za leukemickou fází MCL jsou považovány hodnoty absolutní lymfocytózy, tedy nad

$9 \times 10^9/l$, někteří autoři za rizikové hodnoty považují již hodnotu nad $5 \times 10^9/l$ [Ferrer et al. 2007]. Hodnoty lymfocytózy nad $10 \times 10^9/l$ jsou nacházeny u 10 % případů MCL a tito pacienti mají horší prognózu [Pittaluga et al. 1996]. Ferrer však uvádí výrazně vyšší počty pacientů, a to 35 % pacientů, a u hladiny $5 \times 10^9/l$ dokonce 52 % pacientů. Medián přežití u pacientů nad $5 \times 10^9/l$ byl 23 měsíců a pod touto hodnotou 35 měsíců [Ferrer et al. 2007]. Některé zdroje udávají medián přežití pacientů s leukemickou fází MCL podstatně nižší a to 13 měsíců [Wong et al. 1999], resp. 8 měsíců [Molina et al. 2000], taktéž odpověď na terapii bývá v těchto případech horší. V případě splenomegalie je léčebným úkonem splenektomie, která snižuje medián hladiny leukocytů z $60 \times 10^9/l$ na $29 \times 10^9/l$ [Ruchlemer et al. 2002] a prodlužuje dobu remise. Ke stabilizaci vede u cca poloviny pacientů. Medián přežití po splenektomii byl 24 měsíců a celkově 71 měsíců. Hmotnost sleziny byla průměrně 2,6 kg oproti 1 kg u chronické lymfatické leukémie [Ruchlemer et al. 2002].

1.2 Cíle práce

Stanovili jsme si tyto cíle naší práce:

- Ověřit, které z faktorů, jenž jsou zjistitelné při diagnostice MCL, mají prognostický vliv, zda:
 - proliferační aktivita,
 - mezinárodní prognostický index pro lymfom z plášťových buněk MIPI a jeho varianty s-MIPI a MIPI_b [Hoster et al. 2008],
 - cytomorfologická či architektonická varianta tohoto lymfomu [Swerdlow et al. 2008],
 - primární lokalizace vzorku,
 - výsledky imunohistochemického vyšetření zjištěné při diagnostice MCL (CD5, CD23, cyklin D1).
- Provéřit prognostický vliv jednotlivých faktorů pomocí multivariátní analýzy a podle výsledků navrhnout nejvhodnější prognostické faktory u MCL

Tyto faktory byly ověřovány na retrospektivní populační studii pacientů pocházejících z celé České republiky s lymfomem z plášťových buněk diagnostikovaným v letech 1996–2008, která byla prováděna v rámci Kooperativní lymfomové skupiny ČR.

1.3 Materiál a metody

1.3.1 Výběr případů

Databáze Kooperativní lymfomové skupiny je založena na prospektivním sledování pacientů s diagnostikovanou hematologickou malignitou z většiny hematologických pracovišť v České republice. Po podepsání informovaného souhlasu pacientů jsou sbírána data o diagnóze a pokročilosti onemocnění (staging), demografické a laboratorní parametry pacientů, údaje o léčbě onemocnění a jejich výsledcích. V této databázi bylo nalezeno 279 pacientů s MCL, který byl nově diagnostikován v letech 1999 až 2008. Dále bylo do studie zařazeno dalších 50 pacientů s nově diagnostikovaným MCL z let 1996–2008 z Hematologicko-onkologického oddělení Fakultní nemocnice v Plzni.

Od těchto celkem 329 pacientů byly pro centrální potvrzení diagnózy vyhledávány na pracovištích patologie po celé České republice parafinové bločky, z nichž byl MCL diagnostikován. Celkem byly získány bločky od 265 z 329 pacientů. U těchto pacientů byla prováděna revize diagnózy. U každého případu bylo kromě preparátů barvených hematoxylin-eosinem provedeno imunohistochemické vyšetření s protilátkami CD20 (L26, ředění 1 : 2000, výrobce DakoCytomation, Glostrup, Dánsko), CD5 (NCL-CD5-4C7, ředění 1 : 50, výrobce Novocastra, Newcastle, Velká Británie), cyklin D1 (cyclin D1/bcl-1 Ab-1 (DCS-6), ředění 1 : 100, výrobce Neomarkers, Westinghouse, USA), CD23 (NCL-CD23-1B12, ředění 1 : 100, výrobce Novocastra, Newcastle, Velká Británie) a v případech diagnostických nejasností byly použity i další protilátky, jmenovitě CD3, CD10, CD21, CD35, CD79a, CD138, lehké řetězce imunoglobulinů kappa a lambda, BCL6, p27. Diagnóza MCL byla potvrzena u 242 z 265 případů. V části případů byla pro diagnostiku použita i molekulární genetika, konkrétně v 57 případech byla detekována translokace t(11;14) pomocí FISH, ve dvou dalších případech byla juxtapozice bcl1/JHA genu detekována pomocí PCR [Lasota et al. 1996]. V celkem 23 případech se závěr naší rediagnostiky lišil od původního závěru. V pěti případech byla diagnostikována chronická lymfatická leukémie/lymfom z malých B-buněk (B-CLL/SLL), v jednom případě byl zjištěn folikulární lymfom, v jednom případě MALT lymfom. Ve 3 případech byl závěr blíže nespecifikovaný B-lymfom. Ve 13 případech nebylo možné diagnózu určit nejčastěji pro vykrájení materiálu.

Z potvrzených 242 případů MCL byly podrobné klinické údaje k dispozici pouze u 235 pacientů, tyto případy byly zařazeny do naší studie. U pacientů byla stanovena doba celkového přežití (overall survival, OS), která byla počítána od data diagnózy do data úmrtí pacienta bez ohledu na jeho příčinu, či do data poslední kontroly u žijících pacientů. Dále doba přežití bez progresu (progression free survival, PFS) byla počítána od data diagnózy k datu progresu onemocnění, relapsu, smrti z jakékoli příčiny, nebo do doby poslední kontroly u pacientů v remisi. Hodnoty MIPI, s-MIPI a MIPI_b byly vypočteny dle vzorců a bylo provedeno rozřazení pacientů do skupin podle rizika [Hoster et al. 2008]. Cytomorfologická varianta a architektonická varianta byla určena dle WHO [Swerdlow et al. 2008].

1.3.2 Proliferační aktivita

Proliferační aktivita byla zjišťována pomocí protilátky MIB1 (Ki-67, ředění 1 : 1000, výrobce DakoCytomation, Glostrup, Dánsko). U každého vyšetřovaného případu bylo třeba

nalézt tři zorná pole tvořená pouze MCL, nikoli nenádorovou tkání, kde při čtyřicetinásobném zvětšení objektivu v poli vyznačeném mřížkou v okuláru o 10×10 políčkách (okulár WH10/22; mikroskop BX40F4, Olympus Optical Ltd, Japonsko) byly spočteny pozitivní a negativní buňky pomocí manuálního hematologického počítadla. Následně bylo počítáno procentuální zastoupení pozitivních buněk. Plocha ohraničená v jednom poli pomocí mřížky odpovídala $0,0625 \text{ mm}^2$. Průměrný počet spočtených buněk na případ, tj. na 3 tato zorná pole, byl 3780 buněk, medián 3942 (rozmezí 1360–6783).

1.3.3 Statistické metody

Pro statistické zpracování výsledků byl použit počítačový program MedCalc, verze 11.2.1.0 (výrobce MedCalc software, Mariakerke, Belgie). Za statisticky významný výsledek je považováno $P \leq 0,05$. Vliv hodnot (proliferační aktivity, MIPI, s-MIPI, MIPI_b) na OS a PFS byl stanoven pomocí Coxovy regresní analýzy relativního rizika (Cox proportional-hazards regression) metodou „stepwise“. Vztah jednotlivých skupin (cytomorfologická varianta, architektonická varianta, skupiny rizika podle MIPI, skupiny dle proliferace aktivity, skupiny dle způsobu léčby, lokalizace vzorku) k OS a PFS byl stanoven pomocí log-rank testu. Vizualizace křivek přežití dle těchto skupin byla provedena pomocí Kaplan–Meierových křivek přežití. Při porovnání rozdílnosti hodnot ve stanovených skupinách (např. hodnoty proliferace aktivity či hodnoty MIPI u agresivních vs. ostatních variant) byl použit Kruskal–Wallisův test. Multivariátní analýza byla provedena pomocí multivariátní Coxovy regresní analýzy relativního rizika procedurou „stepwise“.

1.4 Výsledky studie

1.4.1 Klinické údaje a terapie pacientů

V souboru 235 pacientů převažují muži (68,5 %). Průměrný věk pacientů při diagnostikování MCL byl 63,7 roku, medián 64 let (rozmezí 24–86 let). Další klinické údaje jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 – základní demografická data a laboratorní hodnoty 235 pacientů s MCL

		Počet případů	%
Pohlaví	žena	74	31,5
	muž	161	68,5
Věk v době diagnózy	< 50	22	9,4
	50–59	57	24,3
	60–69	76	32,3
	≥ 70	80	34,0
Klinické stádium dle Ann Arbor klasifikace	I	5	2,1
	II	14	6,0
	III	18	7,7
	IV	197	83,8
	neznámé	1	0,4
Infiltrace kostní dřeně	zjištěna	182	77,4
	nezjištěna	49	20,9
	neznámé	4	1,7
B-symptomy	přítomny	109	46,4
	chybí	125	53,2
	neznámé	1	0,4
Hladina bílých krvinek v krvi	pod 10000/ μ l	154	65,5
	nad 10000/ μ l	78	33,2
	neznámá	3	1,3
Hladina laktátdehydrogenázy v krvi	nižší než horní limit laboratoře	104	44,3
	vyšší než horní limit laboratoře	128	54,5
	neznámá	3	1,3
Stav dle ECOG	0	67	28,5
	1	104	44,3
	2	48	20,4
	3	13	5,5
	4	2	0,9
	neznámý	1	0,4

Údaje o postižení jednotlivých orgánů jsou uvedeny v tabulce 3. Postižení kostní dřeně bylo zjišťováno pomocí trepanobiopsie, postižení dalších orgánů s použitím zobrazovacích

metod, nejčastěji počítačové tomografie. Trávicí trakt a centrální nervový systém (CNS) byl vyšetřován pouze při klinickém podezření na jejich postižení, nikoli rutinně.

Tabulka 3 – postižení jednotlivých orgánů a orgánových soustav u 235 pacientů s MCL v době jeho diagnózy

	Počet případů	%
Lymfadenopatie	222	94,5
Kostní dřev	182	77,4
Slezina	98	41,7
Waldeyerův okruh	51	21,7
Trávicí trakt (žaludek, střevo)	38	16,2
Játra	30	12,8
Plíce	13	5,5
Pleura	2	0,9
Exsudáty	20	8,5
Struktury orbity (včetně víček)	10	4,3
Měkké tkáně/podkoží	6	2,6
Slinná žláza	3	1,3
Kosti	3	1,3
Jiné extranodální lokalizace včetně CNS	12	5,1

Přehled terapie pacientů je uveden v tabulce 4. Chemoterapie byla použita u 231 pacientů, u 158 z nich (67,2 %) v kombinaci s monoklonální protilátkou Rituximab. Ze zbývajících případů byla ve třech z nich použita pouze radioterapie, v jednom případě proveden pouze chirurgický zákrok. U 11 pacientů byla chemoterapie použita v kombinaci s radioterapií.

Medián celkového přežití (OS) souboru 235 pacientů byl 47 měsíců, medián doby přežití bez progresu (PFS) byl 22 měsíců. 85 pacientů přežilo více než 60 měsíců, tedy 5ti-leté přežití činilo 36,2 %. Nutno poznamenat, že u 23 žijících pacientů ještě nebyla dosažena doba sledování 5 let.

Pro stanovení vlivu terapie na přežití byly případy rozděleny do dvou skupin, a to na případy léčené neintenzivní (konvenční) chemoterapií a intenzivní chemoterapií.

Do první skupiny neintenzivní terapie lze zařadit 144 pacientů s léčebnými protokoly R ± CVP (rituximab ± cyklofosfamid, vinkristin, prednison), R ± CHOP (rituximab ± cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison), monoterapií fludarabinem či chlorambucilem nebo protokoly s kombinací fludarabinu/cyklofosfamidu.

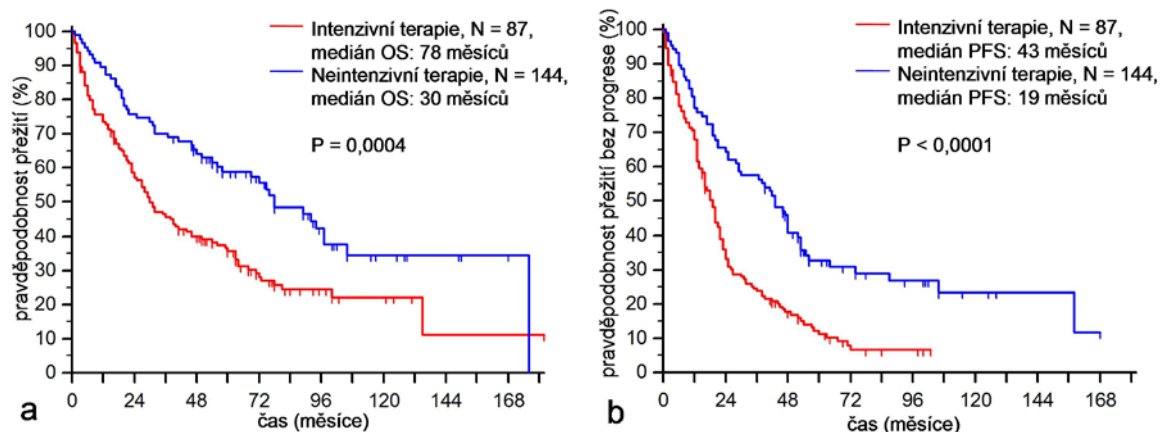
Do skupiny intenzivní léčby lze zařadit 87 pacientů léčených protokoly jako R-hyperCVAD/HD-MTX/AraC (dávkově intenzifikovaný R-CHOP střídaný s vysokodávkovým cytarabinem a methotrexátem), R-maxiCHOP/AraC (dávkově intenzifikovaný R-CHOP střídaný s vysokodávkovým cytarabinem bez ASCT (autologní transplantace kmenových krvetvorných buněk) nebo případy, kdy po použití indukční chemo±imunoterapie následovala autologní či alogenní transplantace kmenových krvetvorných buněk. Ze zbývajících čtyř pacientů byla u třech použita pouze radioterapie a u jednoho pouze chirurgické řešení. Při stanovení vlivu neintenzivní/intenzivní terapie na OS pomocí log-rank testu zjišťujeme, že u pacientů léčených intenzivní terapií je medián OS

78 měsíců, zatímco u neintenzivní terapie jen 30 měsíců, $P = 0,0004$. Obdobným způsobem jsou mediány PFS 43 a 19 měsíců, $P < 0,0001$, viz obrázek 5 a tabulka 5.

Tabulka 4 – metody léčby použité u pacientů s MCL

(CVP – kombinace cyklofosfamidu, vinkristinu a prednisonu; CHOP – kombinace cyklofosfamidu, doxorubicinu, vinkristinu a prednisonu; R-CHOP – kombinace rituximabu, cyklofosfamidu, doxorubicinu, vinkristinu a prednisonu; CHOP/AraC – kombinace cyklofosfamidu, doxorubicinu, vinkristinu, prednisonu a cytarabinu; VAD – kombinace vinkristinu, adriamycinu a dexametazonu; ASCT – autologní transplantace kmenových krvevorných buněk; *např. R-hyperCVAD/HD-MTX/AraC (dávkově intenzifikovaný R-CHOP střídaný s vysokodávkovým cytarabinem a methotrexátem) či R-maxiCHOP/AraC (dávkově intenzifikovaný R-CHOP střídaný s vysokodávkovým cytarabinem bez ASCT); †např. Nordický protokol (dávkově intenzifikovaný R-CHOP střídaný s vysokodávkovým cytarabinem s ASCT) či standardní R-CHOP s ASCT v první linii terapie)

Terapie	Počet případů	%
Pouze chirurgické odstranění	1	0,4
Pouze radioterapie	3	1,3
CVP	14	6,0
CHOP	36	15,3
R-CHOP	52	22,1
Chemoterapie založená na fludarabinu včetně monoterapie	20	8,5
Ostatní neintenzivní protokoly (CHOP/AraC, VAD, chlorambucil)	22	9,4
Intenzivní indukce bez ASCT *	42	17,9
Chemoimunoterapie následovaná vysokodávkovou konsolidační léčbou a ASCT †	41	17,4
Chemo(immuno)terapie následovaná alogenní transplantací kmenových krvevorných buněk	4	1,7



Obrázek 5 – Kaplan–Meierovy křivky OS (a) a PFS (b) podle typu terapie

Tabulka 5 – porovnání proliferace aktivity, MIPI, celkového přežití a PFS u pacientů léčených intenzivní a neintenzivní terapií (Kruskal–Wallisův test použit u proliferace aktivity a MIPI, log-rank test u OS a PFS; N – počet případů)

	Intenzivní terapie			Neintenzivní terapie			
	N	Průměr	Medián	N	Průměr	Medián	
Proliferační aktivita (%)	79	25,32	20,35	129	27,70	24,24	P = 0,2123
MIPI	84	5,96	5,90	140	6,48	6,35	P < 0,0001
OS (měsíce)	87		78	144		30	P = 0,0004
PFS (měsíce)	87		43	144		19	P < 0,0001

1.4.2 Prognostický vliv primární lokalizace vzorku

Lokalizace jednotlivých vzorků, z nichž byl MCL diagnostikován, jsou uvedeny v tabulce 6.

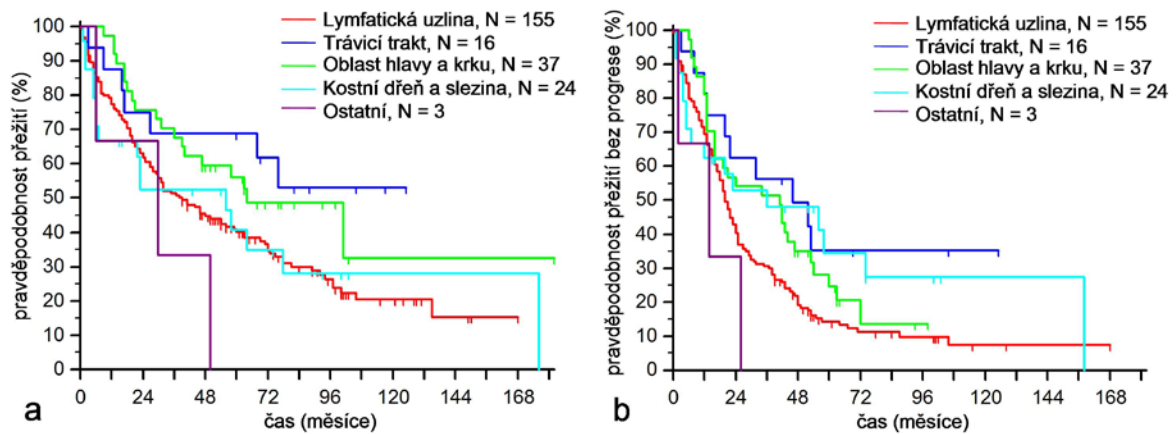
Tabulka 6 – lokalizace primárních vzorků včetně mediánů OS a PFS u jednotlivých skupin

Lokalizace	Počet případů	%	OS (měsíce)	PFS (měsíce)
Lymfatická uzlina	155	66,0	39	20
Trávicí trakt	16	6,8	nedosažen	46
Patrová mandle	22	9,4	58	19
Kostní dřev	19	8,1	56	36
Slezina	5	2,1	6	5
Očnice	4	1,7	nedosažen	nedosažen
Dutina ústní+hltan včetně nosohltanu	11	4,68	nedosažen	63
Plíce+mediastinum+hruďní stěna	3	1,28	30	14

Pro lepší přehlednost a pro provedení analýzy přežití byly případy rozděleny do skupin podle lokalizace obdobně jako u Ambindera, jmenovitě se jedná o lymfatické uzliny, trávicí trakt, oblast hlavy a krku (patrová mandle, orbita, dutina ústní (kořen jazyka, tvrdé patro) či části hltanu), hemopoetický a retikuloendotelový systém (slezina a kostní dřev), zbývající případy byly zařazeny do skupiny „ostatní“ [Ambinder et al. 2013]. Kaplan–Meierovy křivky přežití jsou na obrázku 6, hodnoty mediánů OS a PFS v tabulce 7.

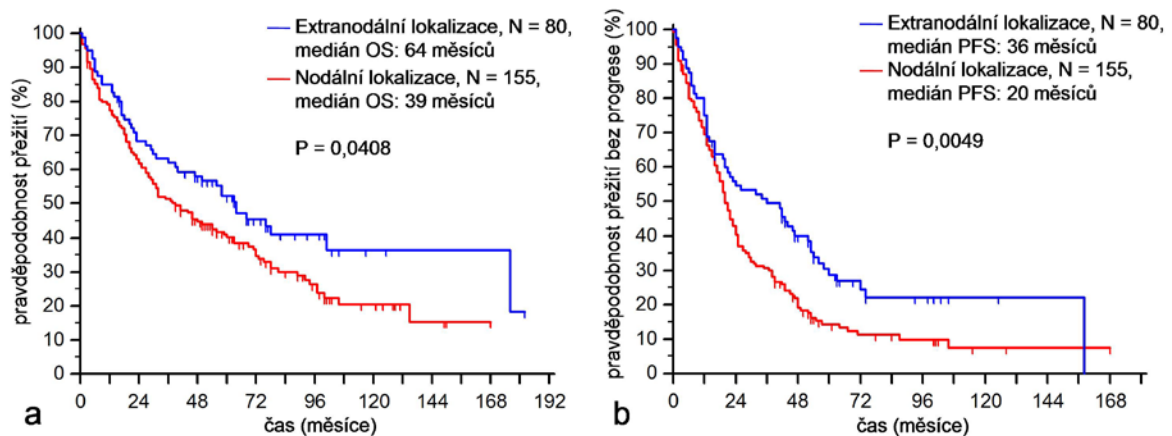
Tabulka 7 – hodnoty mediánů OS a PFS členěné do skupin podle lokalizace vzorku, vliv jednotlivých skupin na OS a PFS porovnán pomocí log-rank testu.

Lokalizace	Počet případů	Medián OS (měsíce)	Medián PFS (měsíce)
Lymfatická uzlina	155	39	20
Trávicí trakt	16	nedosažen	46
Oblast hlavy a krku	37	64	41
Kostní dřev a slezina	24	56	36
Ostatní	3	30	14
	235	P = 0,0469	P = 0,0216



Obrázek 6 – Kaplan–Meierovy křivky OS (a) a PFS (b) podle primární lokalizace vzorku

Z grafů přežití, i z hodnot mediánů OS, resp. PFS je patrné, že nejkratší dobu přežití mají případy primárně lokalizované v lymfatické uzlině. Proto bylo provedeno porovnání přežití v závislosti na nodální vs. extranodální lokalizaci (viz obrázek 7). Byly zjištěny mediány OS extranodálních (80 případů) vs. nodálních vzorků (155 případů) 64 vs. 39 měsíců, $P = 0,0408$, a mediány PFS 36 vs. 20 měsíců, $P = 0,0049$.



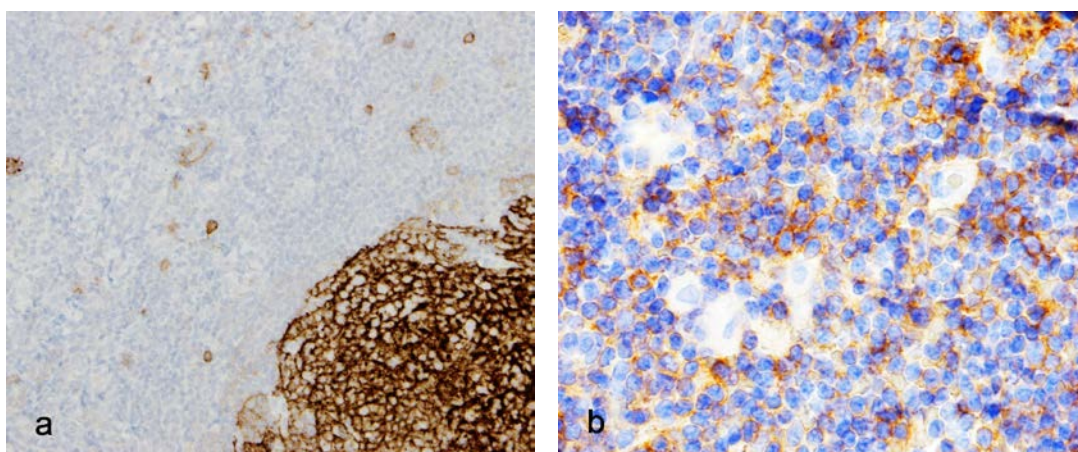
Obrázek 7 – Kaplan–Meierovy křivky OS (a) a PFS (b) podle nodální/extranodální lokalizace vzorku

1.4.3 Prognostický vliv výsledků imunohistochemického barvení cyklinem D1

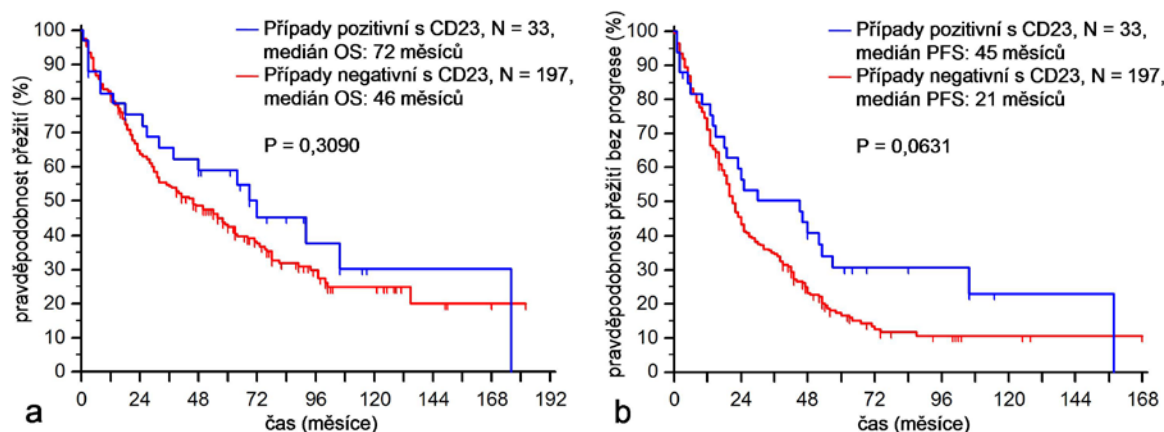
V naší studii byly zjištěny pouze 2 případy MCL, které byly negativní s cyklinem D1. 232 případů bylo pozitivních s cyklinem D1. U OS nebyl medián přežití u případů negativních s cyklinem D1 dosažen, u případů pozitivních činí 48 měsíců, $P = 0,8015$. U PFS také nebyl u případů negativních s cyklinem D1 medián přežití dosažen, zatímco u skupiny pozitivních činí 22 měsíců, $P = 0,6578$.

1.4.4 Prognostický vliv výsledků imunohistochemického barvení CD23

Pozitivita vyšetření s protilátkou CD23 byla zjištěna u 33 případů MCL. U 197 případů byla sice zjištěna negativita tohoto barvení ve vlastním lymfomu, ale ve většině případů byly patrné folikulárně dendritické buňky jako pozůstatek původní struktury lymfatické tkáně (viz obrázek 8). V pěti případech byl nálezhodnotitelný. U případů pozitivních s CD23 je delší OS (72 vs. 46 měsíců) i PFS (45 vs. 21 měsíců), avšak dle log-rank testu se jedná o statisticky nevýznamný rozdíl ($P = 0,3090$, resp. $P = 0,0631$), viz obrázek 9.



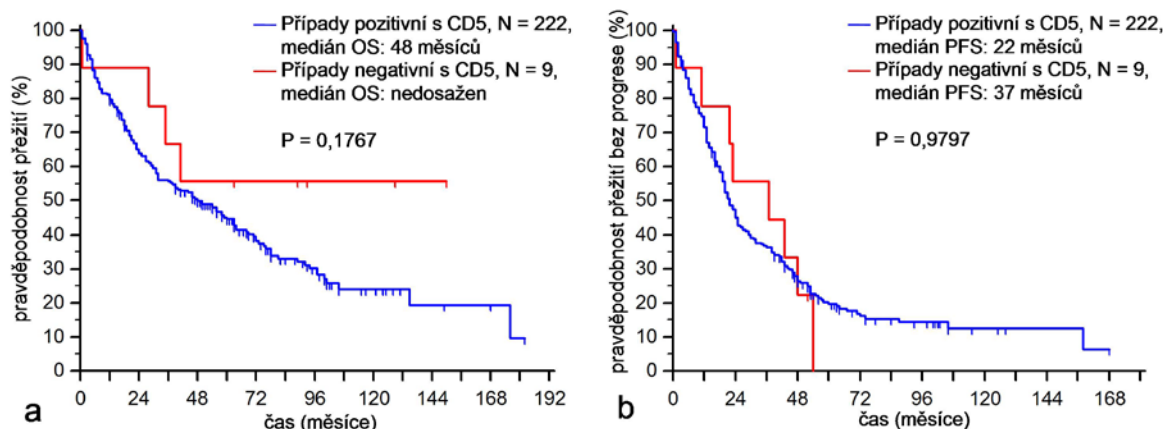
Obrázek 8 – imunohistochemické vyšetření MCL s CD23 – (a) zobrazení folikulárně dendritických buněk pomocí barvení CD23, v jejich okolí infiltrace MCL negativní s CD23; (b) pozitivita části buněk MCL s CD23; zvětšení (a) 200 \times , (b) 400 \times



Obrázek 9 – Kaplan–Meierovy křivky OS (a) a PFS (b) podle výsledku reakce vzorku s CD 23

1.4.5 Prognostický vliv výsledků imunohistochemického barvení CD5

U 222 případů MCL byla zjištěna pozitivita s protilátkou CD5, zatímco negativita byla zjištěna u 9 případů, ve čtyřech případech byl nálezhodnotitelný. Případy negativní s CD5 měly nevýznamně lepší prognózu proti případům CD5 pozitivním (medián OS nedosažen proti 48 měsíců, $P = 0,1767$, medián PFS 37 vs. 22 měsíců, $P = 0,9797$, viz obrázek 10).



Obrázek 10 – Kaplan–Meierovy křivky OS (a) a PFS (b) podle výsledku imunohistochemického vyšetření s protilátkou CD5

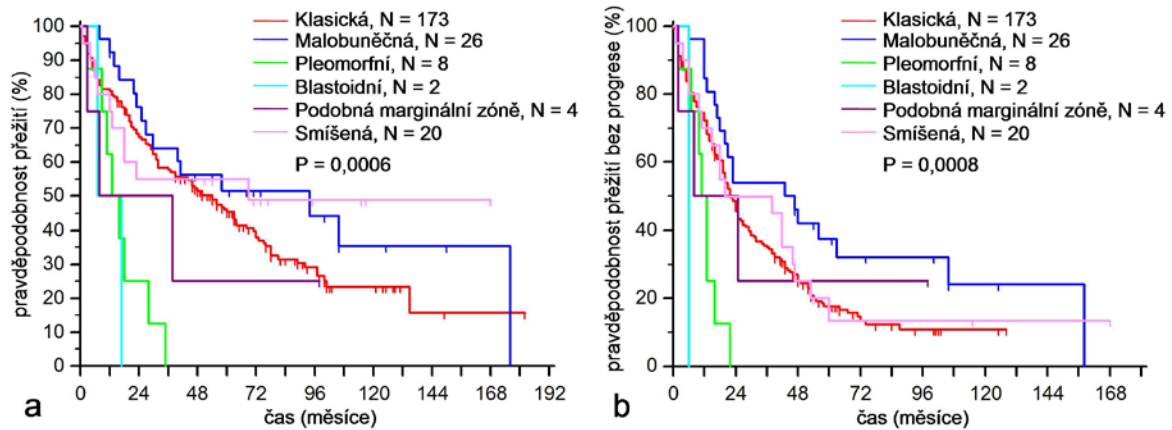
1.4.6 Prognostický vliv cytomorfologické varianty

Početní zastoupení jednotlivých cytomorfologických variant je uvedeno v tabulce 8, Kaplan–Meierovy křivky přežití v obrázku 11.

Tabulka 8 – zastoupení jednotlivých cytomorfologických variant u 235 případů MCL včetně hodnot mediánů OS a PFS v měsících u jednotlivých skupin, v jednotlivých skupinách jsou započteny čisté varianty, jejich kombinace jsou zahrnuty ve skupině smíšené (nedos. – medián přežití nedosažen)

Cytomorfologická varianta	Počet případů	%	Medián OS	Medián PFS
Klasická	173	73,6	54	22
Malobuněčná	26	11,1	94	47
Pleomorfní	8	3,4	14,5	12
Blastoidní	2	0,9	12	6
Podobná marginální zóně	4	1,7	23	16,5
Smíšená	20	8,5	69	20
klasická/podobná marginální zóně	12	5,1	69	20
malobuněčná/klasická	3	1,3	nedos.	42
malobuněčná/podobná marginální zóně	2	0,9	8	7
pleomorfní/klasická	3	1,3	nedos.	46
Nehodnotitelná	2	0,9		

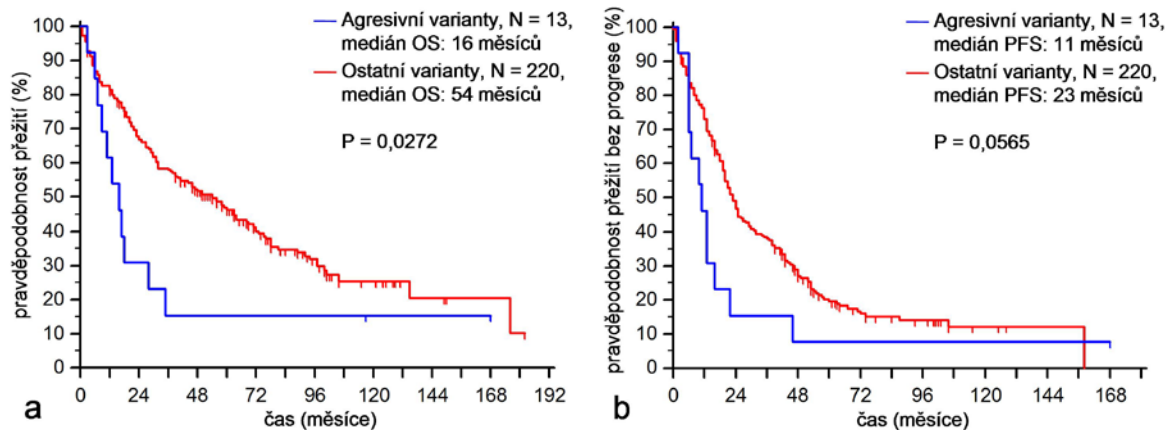
Nejdelší medián OS i PFS má skupina případů s malobuněčnou variantou MCL (94 měsíců, resp. 47 měsíců), naopak nejhorší výsledky jsou u skupin s blastoidní a pleomorfní variantou, které bývají souhrnně označovány jako agresivní varianty [Swerdlow et al. 2008]. Nejprve tedy porovnáme vliv čisté malobuněčné varianty (26 případů) vůči ostatním případům (207 případů), medián OS je 94 vs. 46 měsíců, $P = 0,1934$, medián PFS 47 vs. 21 měsíců, $P = 0,0281$. Při porovnání vlivu malobuněčné varianty včetně případů v kombinaci s jinou variantou (31 případů) a ostatních případů (202 případů) jsou mediány OS 58 a 47 měsíců, $P = 0,2738$, mediány PFS 42 vs. 22 měsíců, $P = 0,0452$. Statisticky významný rozdíl byl tedy prokázán pouze u vlivu na PFS, a to jak



Obrázek 11 – Kaplan–Meierovy křivky OS (a) a PFS (b) podle cytomorfoloických variant

u skupiny čisté malobuněčné varianty, tak u skupiny, kde byly započítané i případy v kombinaci s jinými variantami.

Při porovnání vlivu čistých agresivních variant (10 případů) proti ostatním variantám (223 případů) je medián OS 13 a 54 měsíců, $P < 0,0001$, medián PFS 10 a 23 měsíců, $P = 0,0001$. V případě porovnání agresivních variant včetně případů v kombinaci s jinou variantou (13 případů) a zbývajících variant (220 případů) je medián OS 16 vs. 54 měsíců, $P = 0,0272$, medián PFS 11 a 23 měsíců, $P = 0,0565$ (viz obrázek 12). Z těchto výsledků je patrné, že i pouhý okrsek agresivní varianty má negativní prognostický vliv, a proto je nutné cytomorfoloickou variantu u MCL pečlivě vyhodnotit.



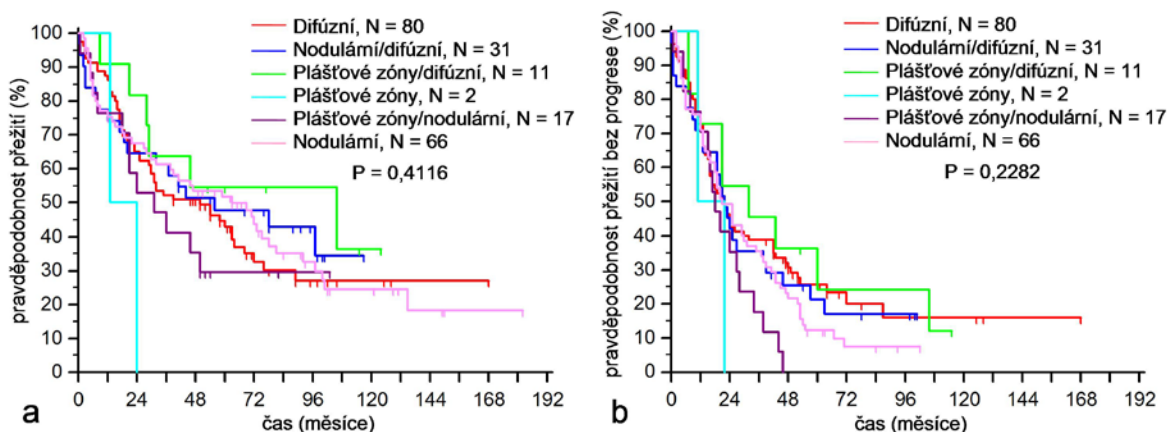
Obrázek 12 – Kaplan–Meierovy křivky OS (a) a PFS (b) dle agresivních/ostatních cytomorfoloických variant, případy agresivních variant jsou uvedeny včetně případů v kombinaci s ostatními variantami

1.4.7 Prognostický vliv architektonické varianty

Architektonickou variantu bylo možné určit u 207 případů. Z hodnocení byly vyřazeny vzorky kostní dřeně. Zastoupení jednotlivých skupin a jejich medián OS a PFS jsou uvedeny v tabulce 9. Mezi jednotlivými variantami není podle log-rank testu prognostický rozdíl ani u OS ani u PFS, $P = 0,4116$, resp. $0,2282$ (viz obrázek 13).

Tabulka 9 – zastoupení jednotlivých architektonických variant s uvedením hodnot mediánu OS a PFS (měsíce)

Architektonická varianta	Počet případů	%	Medián OS	Medián PFS
Plášťové zóny	2	1,0	18,5	16,5
Nodulární	66	31,9	63	21
Difúzní	80	38,6	50	22
Plášťové zóny/nodulární	17	8,2	31	18
Plášťové zóny/difúzní	11	5,3	106	32
Nodulární/difúzní	31	15,0	56	22



Obrázek 13 – Kaplan–Meierovy křivky OS (a) a PFS (b) podle jednotlivých architektonických variant

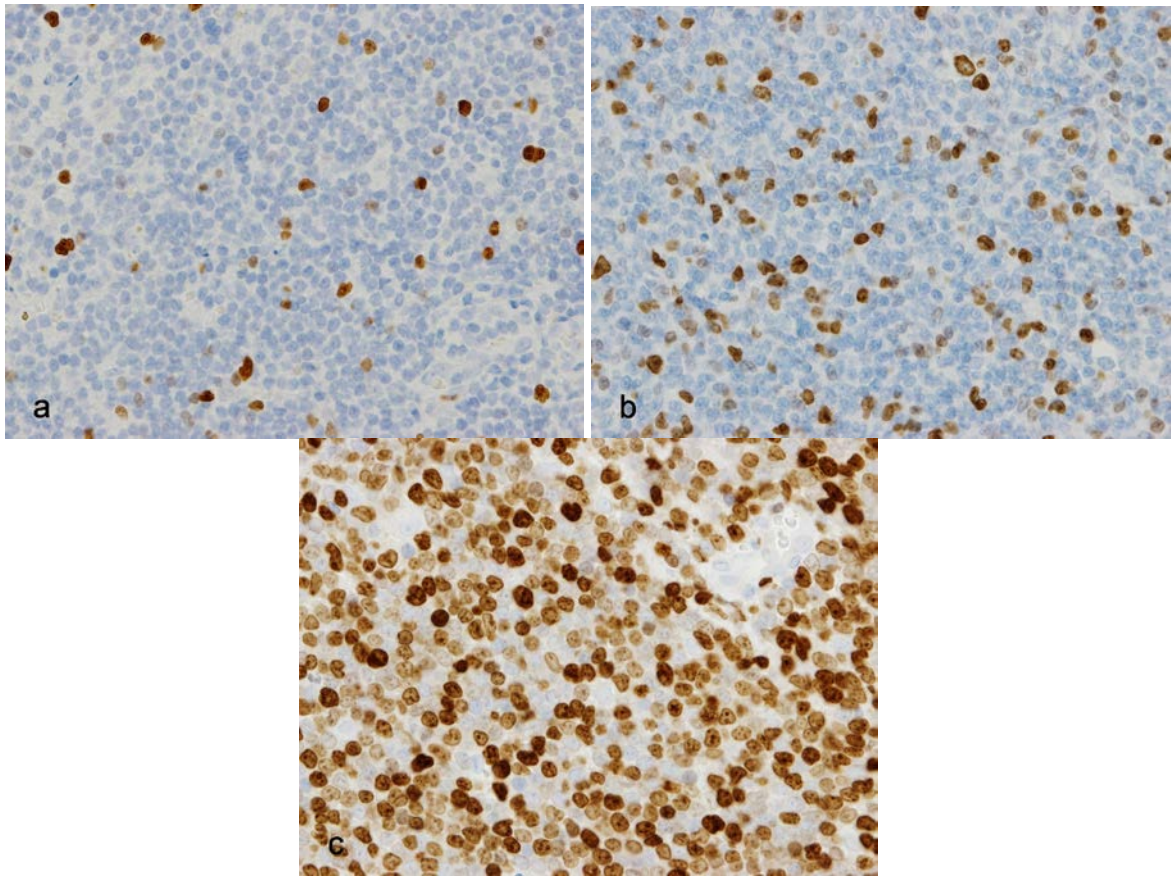
V předchozích publikacích zabývajících se prognostickým vlivem růstových variant bylo zjištěno horší přežití u difúzní varianty proti ostatním skupinám [Räty et al. 2002, Tiemann et al. 2005], a naopak lepší přežití varianty plášťové zóny proti ostatním variantám [Majlis et al. 1997]. Pokud porovnáme v našem souboru případy s architektonickou variantou plášťové zóny včetně případů v kombinaci s jinými variantami (30 případů) proti zbývajícím případům (177 případů), získáme mediány OS 33,5 a 54 měsíců, $P = 0,6670$, a mediány PFS 21 a 22 měsíců, $P = 0,3330$. Prognostický vliv varianty plášťové zóny proti ostatním architektonickým variantám tedy prokázán nebyl.

Při srovnání případů s difúzní architektonickou variantou včetně případů v kombinaci s ostatními variantami (122 případů) proti případům odpovídajícím variantě nodulární a plášťové zóny (85 případů) jsou mediány OS 54 a 46 měsíců, $P = 0,5782$, mediány PFS 22 a 20 měsíců, $P = 0,0453$. Při uvažované hodnotě $P \leq 0,05$ se jedná o statisticky významný rozdíl u PFS, s tím, že lepší prognózu má překvapivě vůči ostatním architektonickým variantám varianta difúzní.

1.4.8 Prognostický vliv proliferační aktivity

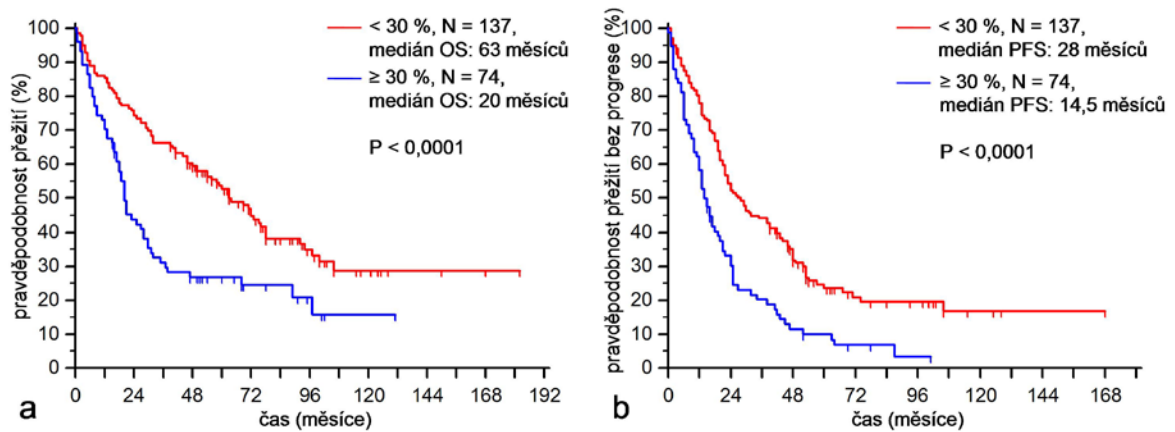
Hodnotu proliferační aktivity bylo možné stanovit u 211 pacientů. Průměrná hodnota proliferační aktivity byla 27,0 %, medián 22,3 % (rozptyl 2,8–80,1 %) (viz obrázek 14).

Pomocí Coxovy univariátní analýzy byl stanovován vliv hodnot proliferační aktivity na OS i PFS pacientů, v obou případech je $P < 0,0001$, tedy s rostoucí proliferační aktivitou se zhoršuje prognóza pacientů.



Obrázek 14 – nízká (a) a vysoká (c) proliferační aktivita a její medián (b) stanovené pomocí proliferačního markeru MIB1 (zvětšení 400×)

Následně byli pacienti rozděleni podle proliferační aktivity do dvou skupin, jedna skupina měla proliferační aktivitu do 30 %, druhá od 30 % včetně. První skupina zahrnovala 137 pacientů, druhá 74 pacientů. Mediány OS byly 63 a 20 měsíců, $P < 0,0001$, mediány PFS 28 a 14,5 měsíců, $P < 0,0001$ (viz obrázek 15).

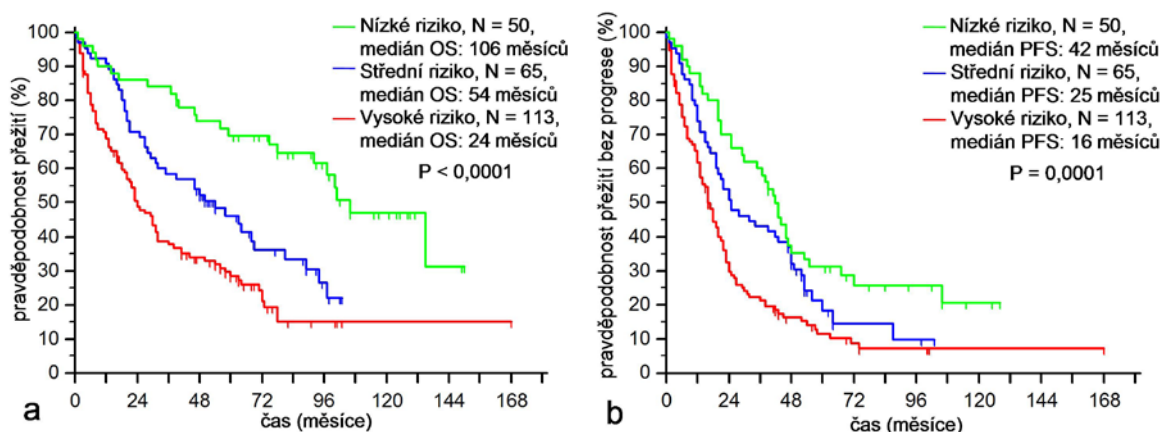


Obrázek 15 – Kaplan–Meierovy křivky OS (a) a PFS (b) podle proliferační aktivity

1.4.9 Prognostický vliv MIPI

Hodnotu MIPI bylo možné stanovit u 228 případů. Průměrná hodnota je 6,28, medián 6,18, rozptyl 4,46–9,42. Při použití Coxovy analýzy prokazujeme na hodnotách MIPI závislost OS ($P < 0,0001$) i PFS ($P < 0,0001$).

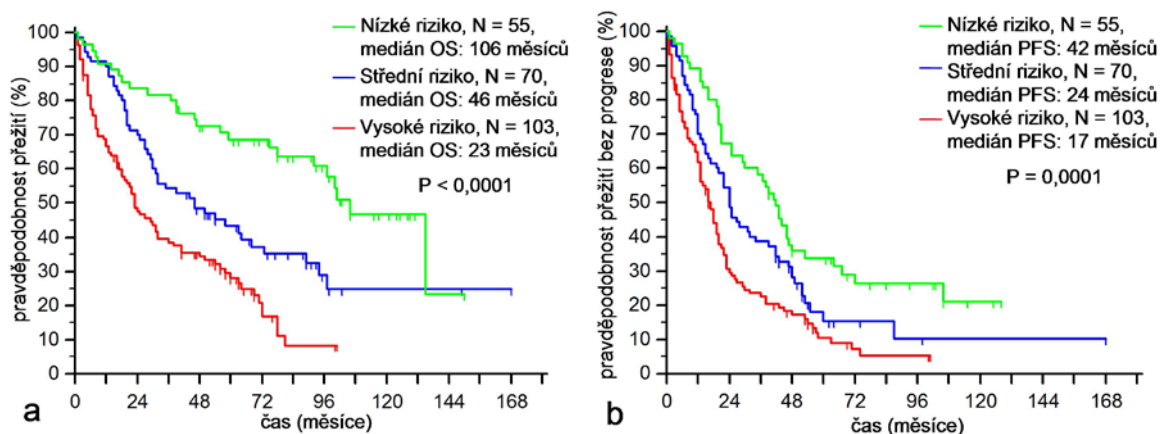
Případy byly dále rozděleny do skupin nízkého (50 případů), středního (65 případů) a vysokého rizika (113 případů) [Hoster et al. 2008]. Medián OS byl 106, 54 a 24 měsíců, $P < 0,0001$, medián PFS 42, 25 a 16 měsíců, $P = 0,0001$ (viz obrázek 16).



Obrázek 16 – Kaplan–Meierovy křivky OS (a) a PFS (b) dle skupin nízkého, středního a vysokého rizika podle MIPI

1.4.10 Prognostický vliv s-MIPI

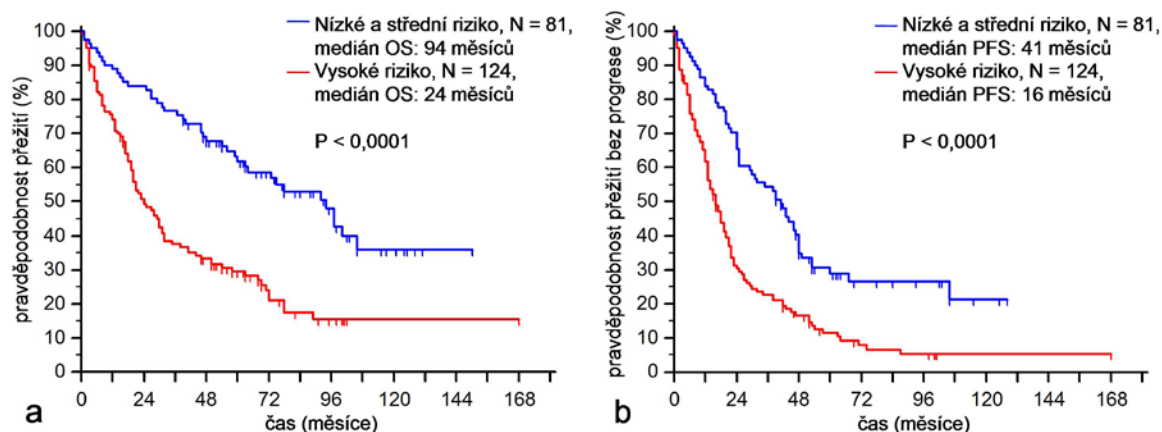
Hodnotu s-MIPI bylo možné stanovit u 228 pacientů, průměrná hodnota je 5,35, medián 5, rozptyl 0–11. Pomocí Coxovy analýzy byl potvrzen vliv hodnot s-MIPI na OS i PFS (v obou případech $P < 0,0001$). Statisticky významný vliv byl prokázán také při použití rozdělení do skupin dle nízkého (55 případů), středního (70 případů) a vysokého rizika (103 případů), a to jak u OS (medián OS je 106, 46 a 23 měsíců, $P < 0,0001$), tak i u PFS (medián PFS je 42, 24 a 17 měsíců, $P = 0,0001$), viz obrázek 17.



Obrázek 17 – Kaplan–Meierovy křivky OS (a) a PFS (b) podle skupin rizika dle s-MIPI

1.4.11 Prognostický vliv MIPI_b

Hodnotu MIPI_b bylo možné spočítat u 205 případů. Medián MIPI_b byl 6,69, aritmetický průměr 6,83, rozptyl hodnot 4,88–9,41. Byl prokázán vliv hodnot MIPI_b na OS ($P < 0,0001$) a PFS ($P < 0,0001$). Při rozdělení na skupiny nízkého, středního a vysokého rizika (12, 69, 124 případů) byl pomocí log-rank testu prokázán vliv na OS (medián OS 100, 92, 24 měsíců, $P < 0,0001$) a PFS (medián PFS 43, 39, 16 měsíců, $P < 0,0001$). Protože rozdíly v přežití mezi skupinami nízkého a středního rizika jsou malé a také skupina nízkého rizika je málo početná, je vhodné je sloučit do jedné skupiny proti skupině vysokého rizika. Pak je medián OS u skupiny nízkého a středního rizika 94 měsíců a u skupiny vysokého rizika 24 měsíců, $P < 0,0001$, u PFS jsou mediány 41 a 16 měsíců, $P < 0,0001$, viz obrázek 18.



Obrázek 18 – Kaplan–Meierovy křivky OS (a) a PFS (b) podle skupin rizika dle MIPI_b

1.4.12 Multivariátní analýza

V multivariátní analýze byly vyhodnocovány všechny faktory, jejichž prognostický vliv byl zkoumán v předchozích odstavcích. Kompletní data byla k dispozici u 183 případů. Výsledky univariátní a multivariátní analýzy, které byly získány pomocí Coxovy analýzy rizik metodou „stepwise“, jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10 – výsledky univariátní a multivariátní Coxovy regresní analýzy u 183 případů MCL

Hodnota	Porovnávaná data	Hodnota P u OS		Hodnota P u PFS	
		Univariátní analýza	Multivariátní analýza	Univariátní analýza	Multivariátní analýza
Proliferační aktivita	absolutní hodnota	< 0,0001	0,0068	< 0,0001	0,0072
MIPI	absolutní hodnota	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0091
Reakce s CD23	pozitivní vs. negativní	0,2465	0,252	0,057	0,0669
Reakce s CD5	pozitivní vs. negativní	0,6116	0,2486	0,6887	0,6488
Reakce s cyklinem D1	pozitivní vs. negativní	0,8366	0,6496	0,6094	0,8499
Lokalizace	uzlina, trávicí trakt, hlava a krk, slezina a kostní dřeň, ostatní	0,0744	0,1569	0,038	0,0227
Cytomorfologická varianta	agresivní i v kombinaci s jinými variantami vs. ostatní	0,0292	0,176	0,051	0,3118
Architektonická varianta	difúzní, nodulární, plášťové zóny, difúzní/nodulární, plášťové zóny/nodulární, plášťové zóny/difúzní	0,7197	0,3633	0,2283	0,2326
Typ terapie	intenzivní vs. neintenzivní	0,0015	0,0338	< 0,0001	0,0012

1.5 Diskuze

Lymfom z pláštěvých buněk je B-nehodgkinský lymfom, který se chová obvykle agresivně s průměrnou délkou přežití 3–5 let [Argatoff et al. 1997, Kimura et al. 2010, van de Schans et al. 2010, Zucca et al. 1995], i když se zaváděním nových léčebných protokolů se prognóza pacientů postupně zlepšuje. V našem souboru 235 pacientů s MCL jsou výsledky podobné jako v dřívějších publikacích, neboť medián celkového přežití pacientů byl 47 měsíců, tedy necelé 4 roky. Avšak v rámci MCL se najde také malá skupina případů (3–9 % [Nygren et al. 2012, Ondrejka et al. 2011]), jejichž dlouhodobá prognóza je naopak dobrá a i po léčbě méně agresivními léčebnými protokoly dosahují remise a doba jejich přežití převyšuje 10 let [Hoster et al. 2008, Swerdlow et al. 2008]. Část z nich dokonce nevyžaduje terapii po dobu nejméně 2 let od diagnózy [Nygren et al. 2012] a mohou být pouze sledováni.

Problémem je, jak tyto skupiny pacientů od sebe odlišit již v době diagnózy MCL, aby bylo možné zvolit dostatečně účinné, ale současně pro pacienta co nejšetnější léčebné protokoly. To byl důvod vzniku naší práce v rámci Kooperativní lymfomové skupiny ČR. V naší retrospektivní studii pacientů s MCL léčených různými léčebnými protokoly byly srovnávány jednotlivé prognostické markery navrhované dřívějšími publikacemi (proliferační aktivita, MIPI včetně variant, cytomorfologická a architektonická varianta, primární lokalizace vzorků, odlišnosti od typického imunohistochemického vyšetření při diagnostice MCL) tak, aby byla potvrzena, či vyvrácena jejich platnost a následně v multivariátní analýze byl porovnán jejich prognostický vliv.

1.5.1 Vliv druhu terapie na prognózu

Nejprve byla porovnána skupina pacientů léčených intenzivními léčebnými protokoly proti pacientům léčených neintenzivní (konvenční) terapií. Pacienti léčení intenzivními protokoly mají významně lepší prognózu oproti druhé skupině pacientů (mediány OS jsou 78 měsíců a 30 měsíců, $P = 0,0004$, mediány PFS 43 a 19 měsíců, $P < 0,0001$). Při porovnání parametrů proliferační aktivity a MIPI u obou skupin je však zajímavé (viz tabulka 5, strana 31), že zatímco proliferační aktivita obou skupin nebyla významněji rozdílná, tak hodnoty MIPI jsou výrazně vyšší u skupiny léčené neintenzivní terapií. Proto se nabízí otázka, do jaké míry je za horší prognózu zodpovědná sama terapie a nakolik tento, i v naší práci potvrzený, prognostický faktor MCL. Pro porovnání účinnosti terapie je nutné srovnávat skupiny, jejichž vstupní údaje včetně MIPI nejsou významněji rozdílné. To však námi získaná data neumožňují.

1.5.2 Prognostický vliv primární lokalizace vzorku

Bylo zjištěno, že případy s lokalizací v lymfatické uzlině mají významně horší prognózu než extranodální případy, a to jak u OS, tak u PFS. Toto zjištění je v souladu s rozsáhlou analýzou epidemiologických dat provedených Ambinderem, který zjistil, že primární lokalizace v oblasti trávicího traktu a hlavy a krku má významně lepší prognózu než primární lokalizace v lymfatické tkáni. Také popisuje, že extranodální lokalizace MCL je významně častější u žluté rasy než u černé a bílé rasy [Ambinder et al. 2013]. Ostatně pokud naše data rozdělíme tak, že do jedné skupiny dáme případy diagnostikované z lymfatické uzliny, do druhé skupiny z oblasti trávicího traktu a z oblasti hlavy a krku a do

třetí skupiny ostatní extranodální případy, je patrné, že skupina obsahující případy lokalizované v trávicím traktu a v oblasti hlavy a krku má výrazně lepší prognózu nejen než nodální případy, ale také než ostatní extranodální případy (52 případů trávicí trakt, hlava a krk, 28 ostatních extranodálních a 155 nodálních případů, medián OS je 76 vs. 50 vs. 39 měsíců, $P = 0,0233$, medián PFS 41 vs. 26 vs. 20 měsíců, $P = 0,0225$). Pomocí Kruskal–Wallisova testu byly zjištěny významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami v hodnotách MIPI ($P = 0,0002$) a klinickém stádiu ($P < 0,0001$). Příčina prognostického rozdílu mezi primárními lokalizacemi není jasná, i když se nabízí úvaha, že část z extranodálně diagnostikovaných MCL odpovídá indolentním MCL. U nich bylo totiž zjištěno, že lymfadenopatie je méně častá než u konvenčních MCL (17 % vs. 93 %, $P < 0,001$ [Fernández et al. 2010]).

1.5.3 Prognostický vliv imunofenotypu

Typicky je MCL pozitivní s CD5 a cyklinem D1 a negativní s CD23. Odlišný imunofenotyp může být nejen zdrojem diagnostických obtíží, ale může mít i prognostický vliv [Kelemen et al. 2008, Yatabe et al. 2000].

Pozitivita s CD23 byla zjištěna ve 33 případech, u nichž bylo zjištěno statisticky nevýznamně delší OS (72 vs. 46 měsíců) i PFS (45 vs. 21 měsíců). Tato zjištění nejsou v rozporu s jedinou existující studií věnovanou prognostickému vlivu CD23 u MCL, kde bylo sledováno 14 případů pozitivních s CD23 oproti 33 případům negativním [Kelemen et al. 2008]. U případů pozitivních s CD23 bylo zjištěno významně lepší bezpříznakové čtyřleté přežití (u 45 % případů oproti 19 %, $P = 0,02$) a pouze nevýznamně lepší čtyřleté celkové přežití (75 % proti 51 %, $P = 0,07$) [Kelemen et al. 2008].

Bylo diagnostikováno 9 případů (3,9 %) negativních s CD5. Toto číslo je výrazně nižší než uvádí Liu, podle jehož zjištění bylo jejich zastoupení 10,6 % z MCL [Liu et al. 2002]. Avšak z dalších publikací je patrné, že jejich výskyt je méně častý. Jsou popsány pouze jednotlivé případy, jejichž klinický průběh byl méně agresivní oproti klasickým MCL [Alvarez-Argote et al. 2014, Hashimoto et al. 2012]. Avšak relevantní studie věnovaná prognostickému vlivu většího počtu těchto případů oproti MCL pozitivním s CD5 zatím chybí. Jediná větší publikovaná sestava 25 případů negativních s CD5 se věnuje jen diagnostice a morfologii těchto případů [Liu et al. 2002]. Dle našeho zjištění významný rozdíl v přežití mezi oběma skupinami není.

U 2 námi zjištěných případů negativních s cyklinem D1 vliv na OS i PFS proti případům pozitivním prokázán nebyl. Problémem při porovnávání byla mnohonásobně větší skupina případů pozitivních s cyklinem D1 (232 případů). U případů negativních s cyklinem D1 jsou u jiných studií výsledky rozporuplné. Zatímco u studie, porovnávající 23 případů negativních s cyklinem D1 proti 128 případům pozitivním, bylo zjištěno lepší pětileté přežití u cyklin D1 negativních případů (86 % vs. 30 %, $P = 0,0002$) [Yatabe et al. 2000], tak ve studii porovnávající 6 případů negativních s cyklinem D1 proti 92 případům pozitivním významný rozdíl v celkovém přežití zjištěn nebyl [Fu et al. 2005].

1.5.4 Prognostický vliv cytomorfoloických variant

V případě cytomorfoloických variant se prognosticky jeví jako nejvýznamnější rozlišení agresivních variant (pleomorfní a blastoidní) od ostatních. V našem souboru bylo zařazeno 10 případů do skupiny agresivních MCL jako čisté varianty a ve 3 dalších případech byly zastiženy okrsky pleomorfní varianty v kombinaci s klasickou variantou,

celkem tedy 5,5 % případů. To je nižší hodnota než u dalších publikovaných studií (8,5–16 %) [Hoster et al. 2016, Ráty et al. 2002, Tiemann et al. 2005]. Hlavním důvodem těchto rozdílů je značná míra subjektivity v jejich hodnocení, protože zatímco u blastoidní varianty je dle WHO 2008 dáno objektivní kritérium (nejméně 20–30 mitóz/10 hpf) [Swerdlow et al. 2008], tak u pleomorfní varianty jde o subjektivní názor hodnotitele (buňky různých tvarů, přítomnost četných velkých buněk s oválnými či nepravidelnými jadernými konturami, bledou cytoplazmou, případně s prominujícím jadérkem) [Swerdlow et al. 2008]. Medián OS byl v našem souboru významně kratší než u ostatních MCL jak při porovnání pouze čistých agresivních variant, tak v případě započtení i smíšených variant do skupiny agresivních (medián OS 13 a 54 měsíců, $P < 0,0001$, resp. 16 a 54 měsíců, $P = 0,0272$). Ráty podobně jako naše práce prokazuje kratší medián OS (11 měsíců) u agresivních variant proti ostatním cytomorfologickým variantám (klasické a malobuněčné, medián OS 40 měsíců, $P < 0,001$) [Ráty et al. 2002]. Podobně Hoster zjišťuje u agresivních variant medián OS 2,36 roku, u ostatních 8,5 roku, $P = 0,001$ [Hoster et al. 2016]. Naopak Tiemann rozdíl neprokazuje [Tiemann et al. 2005].

Je třeba poznamenat, že horší prognóza u agresivních variant souvisí s vyšší hodnotou proliferace stanovené pomocí Ki-67 [Klapper et al. 2009]. Garcia zjišťuje, že u blastoidní varianty odpovídá medián proliferace 22 % proti 10 % u klasické varianty ($P = 0,0038$) [Garcia et al. 2009]. Pervez porovnává hodnoty proliferace u blastoidní a klasické varianty MCL (průměrná hodnota je 64,4 % a 29,5 %, $P < 0,0001$) a popisuje, že proliferace nad 50 % odpovídala pouze případům blastoidní varianty a žádnému případu varianty klasické, zatímco hodnoty pod 40 % odpovídaly pouze případům klasické varianty a žádnému případu varianty blastoidní [Pervez et al. 2015]. Tato zjištění však v našem souboru nepotvrzujeme, protože i u agresivních variant je v pěti z 13 případů proliferace nižší než 40 % a naopak v celkem 19 případech z celkem 220 případů ostatních variant byla hodnota proliferace vyšší než 50 %.

V našem souboru byla u agresivních variant (včetně případů v kombinaci, tedy 13 případů) zjištěna průměrná hodnota proliferace 52,3 % a medián 64,3 %, zatímco u ostatních variant (198 případů) průměrná hodnota 25,3 % a medián 21,0 %, $P < 0,0001$ dle Kruskal–Wallisova testu. Obdobné výsledky získáme i porovnáním čistých agresivních variant proti zbylým případům (10 vs. 201 případů, průměrná proliferace je 61,6 %, medián 67,7 % u agresivních variant, u ostatních morfologických variant je průměrná hodnota 25,2 %, medián 21,0 %, $P < 0,0001$). Naopak u MIPI významný rozdíl mezi hodnotami u obou skupin zjištěn nebyl. U čistých agresivních variant byla průměrná hodnota 6,6, medián 6,6, u ostatních případů průměrná hodnota 6,3, medián 6,2, $P = 0,1307$, u případů agresivních variant včetně případů v kombinaci s ostatními variantami je průměrná hodnota 6,5, medián 6,4, u ostatních případů je průměrná hodnota 6,3, medián 6,2, $P = 0,2278$. Z těchto dat vidíme, že negativní prognostický vliv agresivních morfologických variant souvisí s významně vyšší proliferací, tedy hodnotou, kterou lze poměrně objektivně stanovit. Hodnota MIPI naopak není podkladem rozdílnosti prognózy u jednotlivých skupin.

Dalším zjištěným výsledkem je významně lepší PFS u případů malobuněčné varianty oproti ostatním variantám. Příčina tohoto zjištění není jasná. Tu však nelze na rozdíl od předchozího výsledku vysvětlit rozdílem v dalších prognostických faktorech, protože není rozdíl patrný ani u proliferace (u případů malobuněčných včetně případů v kombinaci s ostatními variantami je průměr 20,9 %, medián 20,2 %, u ostatních případů průměrná hodnota 27,7 %, medián 22,6 %, $P = 0,1039$) ani u MIPI (průměr 6,3, medián 6,3, resp. průměr 6,3, medián 6,2, $P = 0,8671$).

1.5.5 Prognostický vliv architektonických variant

Prognostický vliv architektonických variant u MCL nebyl v našem souboru prokázán, a to ani při porovnání varianty plášťové zóny proti ostatním variantám. Pouze při srovnání difúzní varianty vůči ostatním byl prokázán pozitivní vliv na PFS. Tyto výsledky jsou v rozporu s předchozími zjištěními, že prognóza čisté varianty plášťové zóny (nad 90 % rozsahu uzliny) je dobrá – tříleté přežití bylo uváděno 100 % oproti 55 % u difúzní varianty a 50 % u nodulární varianty [Majlis et al. 1997]. V našem případě byl naopak medián OS nevýznamně horší u případů s architektonickou variantou plášťové zóny, a to jak s čistou (18,5 a 50 měsíců, $P = 0,0971$), tak i kombinovanou s jinými variantami (33,5 a 54 měsíců, $P = 0,6670$).

V našem souboru nebyl zjištěn významný rozdíl vlivu difúzní varianty a ostatních variant na OS, avšak na PFS ano (medián PFS 22 a 20 měsíců, $P = 0,0453$). Tiemann porovnával převažující varianty nodulární a plášťové zóny proti vzorkům s převažující variantou difúzní, medián OS byl 43 a 29 měsíců, $P = 0,0074$ [Tiemann et al. 2005]. Negativní prognostický vliv difúzní varianty potvrzují také Ráty (mediány OS 70 a 35 měsíců [Ráty et al. 2002]) i Hoster (medián OS nedosažen vs. 7,8 roku, $P = 0,0466$ [Hoster et al. 2016]). Na rozdíl od výše uvedených prací má v našem souboru lepší prognózu varianta difúzní vůči ostatním variantám. Tento náš výsledek je překvapivý a jasné vysvětlení pro něj nemáme. Vysvětlení však existuje pro dříve zjištěné poznatky, že varianta plášťové zóny má lepší prognózu a difúzní varianta horší. To je zdůvodňováno rostoucí mírou infiltrace tkáně elementy MCL. Nejdříve se ve tkáni objevuje „in situ“ lymfom z plášťových buněk, později již v rámci plně vyvinutého MCL architektonická varianta plášťové zóny, následně nodulární a nakonec difúzní varianta [Adam et al. 2012, Carvajal-Cuenca et al. 2012, Norton et al. 1995, Swerdlow et al. 1983]. Tuto teorii podporují také zjištění změn architektonických variant při recidivě MCL, kdy z původních 7 případů architektonické varianty plášťové zóny bylo 5 případů diagnostikovaných jako jiné varianty (4 × difúzní, 1 × kombinace nodulární a difúzní). Naopak změna variant nodulární a difúzní (včetně kombinace obou typů) do varianty plášťové zóny byla pozorována pouze v 8 % případů [Vogt et al. 2013]. Tyto rozdíly však mohou být dány také situací v jedné konkrétní vyšetřované lymfatické uzlině a nemusí korelovat s mírou postižení většiny uzlin.

1.5.6 Prognostický vliv proliferační aktivity

Naše výsledky potvrzují, že proliferační aktivita je významným prognostickým markerem u MCL. K obdobným výsledkům dochází jak studie, které zahrnují pouze případy léčené shodnou terapií [Determann et al. 2008, Garcia et al. 2009], tak populační studie [Tiemann et al. 2005]. Problémem pro přesnější porovnání výsledků jednotlivých studií je nejen rozdílná analytická metodika stanovení proliferační aktivity (počítání různého počtu buněk v různém počtu zorných polí), ale i zjištění, že v některých studiích jsou případy rozděleny podle prognostického vlivu na dvě skupiny a v některých případech na tři skupiny a tato hranice (cut-off) proliferační aktivity se u jednotlivých skupin v různých studiích liší. Jmenovitě u studie pacientů léčených pouze CHOP byl medián OS 112 měsíců u proliferační aktivity do 10 %, 59 měsíců u 10–30 %, 30 měsíců u proliferační aktivity nad 30 %, 3 leté přežití je uváděno 81 %, 75 % a 46 % ($P = 0,001$). U terapie R-CHOP nebyl medián OS v této studii dosažen u proliferační aktivity do 10 % a 10–30 %, u skupiny nad 30 % byl 52 měsíců, 3 leté přežití odpovídá 93 %, 74 % a 66 %, $P = 0,013$ [Determann et al. 2008]. Podobně u agresivnější terapie R-hyper-CVAD (kombinace rituximabu s hyperfrakcionovaným cyklofosfamidem, vinkristinem, doxorubicinem a dexametazonem

střídáním s kombinací rituximabu a vysokodávkového metotrexátu a cytarabinu) bylo pětileté přežití 53,1 % u pacientů s proliferační aktivitou do 20 % a jen 28,6 % u případů s proliferační aktivitou nad 20 %, $P = 0,003$ [Garcia et al. 2009]. Obdobné výsledky jsou také u populačních studií, tedy bez ohledu na použitý typ léčby. Např. ve studii Evropské skupiny pro lymfom z plášťových buněk byl medián OS 42 měsíců u skupiny do 10 %, 30 měsíců u skupiny 10–40 % a 15 měsíců u skupiny s proliferační aktivitou nad 40 %, $P < 0,0001$ [Tiemann et al. 2005].

Studie věnovaná recidivám MCL při porovnání prognostického vlivu proliferační aktivity u primárních diagnostických vzorků zjišťuje významný rozdíl mezi případy s proliferační aktivitou nad 30 % a případy s proliferační aktivitou 10–30 % a do 10 % (medián přežití 1400 dní vs. 2922 a 3415 dní, $P = 0,0089$), avšak již nikoli mezi skupinami do 10 % a 10–30 % [Vogt et al. 2013]. V další práci byl medián OS 9 měsíců při hodnotách proliferační aktivity nad 50 % a 62 měsíců u případů s proliferační aktivitou nižší než 50 %, $P = 0,0006$ [Martinez et al. 2004]. Další práce se statisticky významným vztahem proliferační aktivity a přežití má cut-off proliferační aktivity 26 %, což odpovídalo třetímu tercilu vs. zbytek případů. V tomto případě byly mediány přežití 13 vs. 45 měsíců, $P < 0,001$ [Räty et al. 2002]. Hoster uvádí jako nejvýznamnější hranici prognostického vlivu proliferační aktivity kategorie do a nad 30 %, a to jak u agresivních, tak u neagresivních cytomorfologických variant [Hoster et al. 2016]. Prognostický vliv byl prokázán i u studie s nejnižším cut-off, a to pouhých 10 % [Schrader et al. 2004]. V tomto případě byly mediány přežití 48 a 23 měsíců. Cut-off je tedy v pracích stanovován různě.

Naším cílem bylo rozdělit pacienty do dvou srovnatelně velkých skupin, mezi nimiž by byl co největší rozdíl v délce přežití. Proto byl, s ohledem na medián proliferační aktivity (22,3 %) a její průměrnou hodnotu (27 %), zjišťován vliv proliferační aktivity u cut-off 20 % (92 a 119 pacientů), 25 % (116 a 95 případů) a 30 % (137 a 74 případů). Statisticky významný rozdíl v celkovém přežití (OS) mezi oběma skupinami byl dosažen ve všech třech případech. V případě hodnoty 30 % byl rozdíl nejvýraznější (u 20 % medián OS 64 vs. 28 měsíců, $P = 0,0059$, u 25 % 69 a 21 měsíců, $P = 0,0002$, u 30 % 63 a 20 měsíců, $P < 0,0001$). Výsledky u PFS navržené rozdělení podporují (u 20 % medián PFS 29 vs. 17 měsíců, $P = 0,0034$, u 25 % 29 a 16 měsíců, $P < 0,0001$, u 30 % 27 a 15 měsíců, $P < 0,0001$).

Hodnotu proliferační aktivity je vhodné uvádět již při diagnóze MCL, protože v případech agresivnějších nádorů s vysokou proliferační aktivitou je vhodnější užít agresivnější chemoterapii, pokud to stav pacienta dovoluje. Způsob stanovení proliferační aktivity, který byl použit v naší studii, je sice vzhledem k započtení velkého množství buněk přesný, avšak jeho rutinní použití v bioptickém provozu je velmi problematické, neboť počítání buněk vyznačených mřížkou okuláru ve 3 zorných polích trvalo u jednoho případu cca 30–45 minut. Místo tohoto časově náročného postupu je ve studiích využívána metoda označovaná jako tzv. zlatý standard, tj. spočítání 500 buněk ve 2 zorných polích při 400 násobném zvětšení (high power field, hpf). Avšak i tento postup je pro běžný bioptický provoz časově náročný, proto byl proveden srovnávací test jednotlivých používaných metod [Klapper et al. 2009], a to odhadu, počítání po sto buňkách v každém z 5 zorných polí a digitální analýzy. U jednotlivých metod byla stanovena hodnota korelačního koeficientu s tzv. zlatým standardem (hodnota 1=shoda, 0=nesoulad). Pro digitální analýzu je jeho hodnota pouze 0,37. Pravděpodobnou příčinou je splývání na sebe natlačených buněk v digitálním obraze, které nejsou počítány jako jednotlivé buňky, ale jen jako jedna, protože korelační koeficient na počet buněk je proti tzv. zlatému standardu pouze 0,24. Pro odhad prostým okem, což je v praxi nejpoužívanější metoda, byla hodnota korelačního koeficientu stanovena na 0,53. Při počítání 100 buněk v každém z pěti zorných polí byl korelační koeficient v jednom poli 0,68, ve dvou polích 0,74, pak už k jeho růstu se vzrůstajícím

počtem počítaných zorných polí nedocházelo. Z uvedeného vyplývá, že nejbližší „zlatému standardu“, a přitom nejrychleji stanovitelná, je tedy hodnota proliferační aktivity zjištěná spočítáním 100 buněk ve dvou reprezentativních zorných polích hpf. Podmínkou hodnotitelnosti je přítomnost alespoň pěti hpf infiltrovaných lymfomem ve vzorku. Dále je doporučováno hodnotu proliferační aktivity určovat pouze v lymfatické uzlině či extranodální lokalizaci lymfomu z pláštěvých buněk, a nikoli v kostní dřeni [Klapper et al. 2009].

1.5.7 Prognostický vliv mezinárodního prognostického indexu pro lymfom z pláštěvých buněk

Potvrzujeme, že mezinárodní prognostický index pro lymfom z pláštěvých buněk MIPI i jeho varianty s-MIPI a MIPI_b [Hoster et al. 2008] jsou významným prognostickým faktorem MCL. Naše práce je přínosná v tom, že ověřuje jejich platnost pro klinickou praxi v neselektované populaci (bez ohledu na věk, klinické stádium, způsob terapie). Oproti původním studiím, z nichž bylo při tvorbě MIPI vycházeno [Dreyling et al. 2005, Lenz et al. 2005, Nickenig et al. 2006], byli naši pacienti starší (medián 64 vs. 60 let) a v horším výkonnostním stavu hodnoceném dle ECOG – stav dle ECOG 2 a vyšší byl zjištěn u 27 % pacientů oproti 9 %. Do naší studie též byli zahrnuti pacienti s klinickým stádiem I a II dle Ann Arbor klasifikace (celkem 19 pacientů, 8 %), kteří do originální práce zahrnuti nebyli [Hoster et al. 2008] a nebyli obsaženi ani v pracích potvrzujících platnost tohoto indexu [Hoster et al. 2014, van de Schans et al. 2010], pro něž byla vstupní kritéria stádium III a IV dle Ann Arbor klasifikace.

Pokud provedeme prognostické testování pouze pro tuto malou skupinu pacientů – stádium I a II, pak dle MIPI je 6 pacientů ve skupině vysokého rizika, 8 pacientů ve skupině středního rizika a 5 pacientů ve skupině nízkého rizika. Medián OS u skupiny nízkého rizika činí 101 měsíců, u středního rizika 28 měsíců a u skupiny vysokého rizika 47 měsíců, $P = 0,3183$, mediány PFS jsou 43, 21,5 a 20 měsíců, $P = 0,1865$. Tedy v této skupině nepotvrzujeme vliv MIPI na OS a PFS. Ovšem nelze vyloučit, že je to pouze kvůli malému počtu případů v jednotlivých skupinách, protože např. u MIPI_b je medián OS u skupiny nízkého + středního rizika 64 měsíců (7 případů), u vysokého rizika 32 měsíců (9 případů), $P = 0,1836$, mediány PFS jsou 46 a 21 měsíců, $P = 0,013$.

Je nutno poznamenat, že většina publikovaných studií pacientů s MCL svědčí pro platnost MIPI [Budde et al. 2011, Geisler et al. 2010, Hoster et al. 2008, Hoster et al. 2014, Martin et al. 2009, van de Schans et al. 2010, Todorovic et al. 2012], pouze ve dvou případech nebyla potvrzena [Shah et al. 2008, Schaffel et al. 2010]. Studie vyvracející platnost MIPI se věnují také ostatním variantám MIPI, jmenovitě Shah nepotvrzuje platnost s-MIPI [Shah et al. 2008] a Schaffel nejen s-MIPI, ale ani MIPI_b [Schaffel et al. 2010]. Naopak prognostický vliv s-MIPI i MIPI_b byl potvrzen ve studii pacientů léčených nordickým protokolem [Geisler et al. 2010], a také ve studii Evropské skupiny pro lymfom z pláštěvých buněk [Hoster et al. 2014]. V této studii je zajímavé, že jsou, stejně jako v našem případě, rozdíly v přežití u pacientů s nízkým a středním stupněm rizika dle MIPI_b jen minimální a výrazný rozdíl je u obou těchto skupin pouze oproti skupině vysokého rizika [Hoster et al. 2014].

Hoster považuje rozdělení pacientů pouze do dvou skupin podle rizika dle MIPI_b za nedostačující, a proto nyní nově navrhuje ještě tzv. kombinované MIPI (c-MIPI), které je rozčleněno do čtyř skupin podle rizika. Jeho hodnota je počítána jako kombinace počtu bodů za rizikové skupiny podle MIPI a podle hodnoty proliferační aktivity, viz tabulka 11 [Hoster

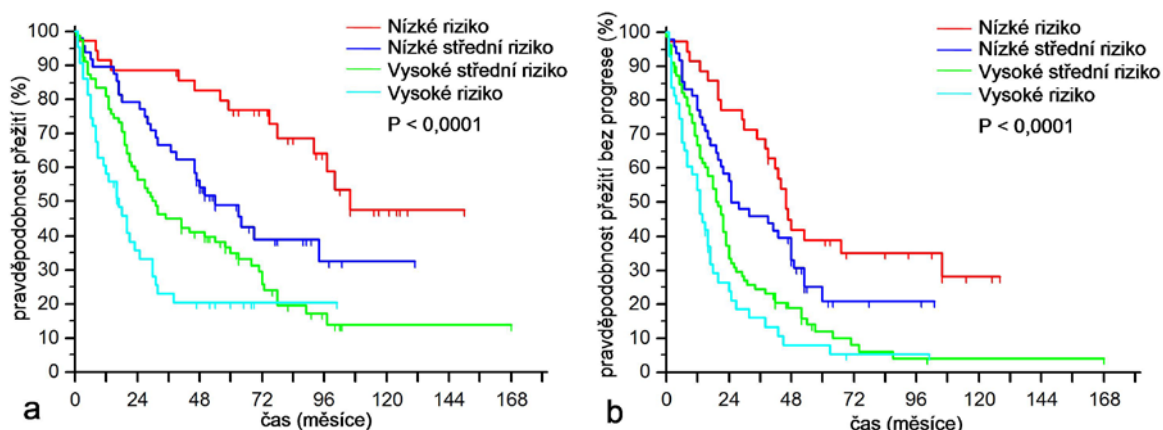
et al. 2016]. Výsledky z našeho souboru, kam bylo možno zahrnout 205 pacientů, jsou uvedeny v tabulce 12 a Kaplan–Meierovy křivky přežití jsou na obrázku 19. Naše výsledky potvrzují platnost nyní nově navrženého c-MIPI (dle log-rank testu $P < 0,0001$ u OS i PFS). Tento nový index c-MIPI by mohl nahradit MIPI_b, a to díky většímu počtu skupin, které povedou k lepšímu rozdělení pacientů podle prognózy, ale také díky snazšímu výpočtu.

Tabulka 11 – výpočet rizikových skupin dle c-MIPI [Hoster et al. 2016]

Riziková skupina dle c-MIPI	Riziková skupina podle MIPI	Proliferační aktivita
Nízké riziko (0)	nízká (0)	< 30 % (0)
Nízké střední riziko (1)	nízká (0) střední (1)	≥ 30 % (1) < 30 % (0)
Vysoké střední riziko (2)	střední (1) vysoká (2)	≥ 30 % (1) < 30 % (0)
Vysoké riziko (3)	vysoká (2)	≥ 30 % (1)

Tabulka 12 – rizikové skupiny podle c-MIPI a jejich prognostický vliv na OS a PFS, hodnoty mediánů OS a PFS jsou uvedeny v měsících

Riziková skupina dle c-MIPI	Počet případů	Medián OS	Počet případů	Medián PFS
Nízké riziko	35	106	35	46
Nízké střední riziko	48	54	48	25
Vysoké střední riziko	79	31	79	20
Vysoké riziko	43	17	43	13
	205	$P < 0,0001$	205	$P < 0,0001$



Obrázek 19 – Kaplan–Meierovy křivky OS (a) a PFS (b) vlivu rizikových skupin dle c-MIPI

1.5.8 Multivariátní analýza

Při porovnání prognostického vlivu jednotlivých faktorů pomocí multivariátní analýzy byl prokázán vliv MIPI, proliferační aktivity a typu terapie (intenzivní/neintenzivní) na OS i PFS, a také vliv lokalizace primárního vzorku na PFS. V případě univariátní analýzy byl

mimo to zjištěn vliv cytomorfologické varianty (agresivní včetně kombinace s ostatními variantami/ostatní). Porovnávání našich výsledků s dříve publikovanými multivariátními analýzami je problematické v tom, že každá z nich srovnává jiné faktory. Schaffel v multivariátní analýze u OS prokazuje vliv pouze proliferační aktivity (cut-off 30 %), u PFS také vliv intenzivní terapie, avšak nikoli MIPI [Schaffel et al. 2010]. Romaguera oproti tomu při multivariátní analýze prokazuje vliv MIPI na OS i PFS a navíc i hladiny beta-2-mikroglobulinu v séru, nikoli však cytomorfologické varianty [Romaguera et al. 2010]. Multivariátní analýza publikovaná Geislerem zjišťuje vliv proliferační aktivity pouze u PFS a v případě OS vliv tehdy vyšetřovaného IPI (International Prognostic Index [International non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project 1993]) a cytomorfologické varianty (agresivní vs. ostatní). Vliv architektonické varianty, věku či pohlaví prokázán nebyl [Geisler et al. 2008]. Tiemann prokazuje v multivariátní analýze OS vliv jen věku a mitotického indexu, nikoli proliferační aktivity, infiltrace kostní dřeně, architektonické varianty, klinického stádia, hladiny laktátdehydrogenázy v séru, přítomnosti B-symptomů a přítomnosti extranodálního postižení, u nichž byl prokázán vliv na OS při univariátní analýze, ani u cytomorfologické varianty či pohlaví, u nichž nebyl zjištěn vliv na OS ani při univariátní analýze [Tiemann et al. 2005]. Schrader v multivariátní analýze prokazuje na OS vliv hodnoty laktátdehydrogenázy v séru, exprese topoizomerázy II alfa a hodnot indexu IPI, nikoli proliferační aktivity, infiltrace kostní dřeně, věku [Schrader et al. 2004]. Ráty v multivariátní analýze prokazuje prognostický vliv proliferační aktivity, věku a klinického stádia dle Ann Arbor klasifikace, multivariátní analýza však neprokazuje vliv hladiny laktátdehydrogenázy v séru, cytomorfologické varianty či stavu dle ECOG [Ráty et al. 2002]. Z výše uvedeného je tedy patrné, že výsledky jsou značně rozdílné a to, co potvrzuje jedna práce, některá z dalších vyvrací. Naše výsledky, tedy průkaz vlivu proliferační aktivity a MIPI na OS i PFS, jsou v souladu s několika z uvedených prací [Geisler et al. 2008, Ráty et al. 2002, Romaguera et al. 2010, Schaffel et al. 2010]. Jak už bylo uvedeno, hlavním problémem je, že v každé studii se porovnávají různé parametry a jen část je jich shodných. Výsledky univariátních analýz vliv MIPI a proliferační aktivity na přežití potvrzují konzistentněji.

1.6 Závěr

V rámci retrospektivní studie, která byla provedena v neselektované populaci 235 pacientů s lymfomem z pláštěvých buněk v rámci Kooperativní lymfomové skupiny České republiky:

- byl prokázán:
 - prognostický vliv proliferační aktivity, MIPI, typu léčby (intenzivní/neintenzivní) na OS i PFS v univariátní i multivariátní analýze;
 - prognostický vliv indexů MIPI_b a s-MIPI, agresivní vs. ostatní cytomorfologické varianty a nodální vs. extranodální lokalizace primárního vzorku i nově navrženého c-MIPI v univariátní analýze.
- nebyl prokázán:
 - prognostický vliv architektonické varianty a výsledků imunohistochemického barvení CD23, CD5 či cyklinu D1.

Proliferační aktivita a MIPI se i podle multivariátní analýzy jeví jako nejvýznamnější prognostické faktory u MCL, dle nichž pak může být lépe zvolen léčebný protokol pro daného pacienta. Zatímco data pro výpočet hodnoty MIPI má ošetřující lékař k dispozici z klinických údajů pacienta a z laboratorního vyšetření periferní krve, stanovení míry proliferační aktivity je úkolem patologa a mělo by být nedílnou součástí bioptického vyšetření, z něhož byla diagnóza MCL učiněna. Jako optimální hraniční hodnota proliferační aktivity, odlišující vysoce a níže rizikové pacienty, se v našem souboru jeví 30 %. Jako výhoda se také, na rozdíl od molekulárně genetických metod, jeví výrazně nižší cena zjištění těchto prognostických markerů a jejich široká dostupnost.

2 Mikrovaskulární denzita v lymfomu z plášt'ových buněk

2.1 Úvod do angiogeneze v lymfomech

Angiogeneze se stává předmětem zájmu výzkumu nejen u solidních nádorů, ale i u hematologických malignit. Hlavním důvodem je postupný rozvoj antiangiogenní terapie a snaha o vyhledávání pacientů, u nichž léčba bude mít co největší kýžený efekt. Velkou výhodou antiangiogenní terapie je, že inhibici angiogeneze je možné vyvolat stejným mechanismem u morfologicky zcela odlišných nádorů a že využití těchto látek v praxi je výrazně širší.

2.1.1 Mechanismus angiogeneze v nádorech

To, že nedílnou součástí nádorového růstu je i aktivní angiogeneze v nádoru, bylo popsáno Folkmanem u solidních nádorů již začátkem sedmdesátých let. Podle jeho poznatků se prostou difúzí nádorová tkáň může živit jen do velikosti 1–2 mm in vivo a 2–4 mm in vitro. Pro další růst je již zcela nutné vlastní cévní zásobení nádoru [Folkman 1974]. Tehdy dochází k tzv. angiogennímu přepnutí (angiogenní switch), kdy převáží angiogenní faktory nad antiangiogenními a dochází k novotvorbě cév.

K novotvorbě cév dochází jak v solidních, tak v hematologických maligních nádorech dvěma způsoby. Jedním z nich je vaskulogeneze, tj. migrace progenitorových endoteliálních buněk z kostní dřeně, které se následně diferencují do zralých endotelií. Tento způsob je nezávislý na preexistujících cévách a ve tkáních se uplatňuje již v embryonálním vývoji.

Druhým, v nádorech převažujícím, způsobem novotvorby cév je angiogeneze, tedy novotvorba cév v širším slova smyslu, při níž dochází k pučení již existujících cév s následnou migrací zralých endoteliálních buněk. Jejím spouštěcím mechanismem je tzv. angiogenní switch (angiogenní přepnutí), které vzniká na základě převahy angiogenních faktorů nad antiangiogenními. Angiogenní faktory lze rozdělit na genetické (na podkladě aktivovaných onkogenů např. RAS či tyrozinkinázy SRC) a epigenetické, kterými jsou hypoxie, cytokiny, oxid dusný či růstové faktory – PDGF (platelet derived growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor) [Klener 2010, Ruan et al. 2009].

Nejčastějším spouštěčem angiogeneze je hypoxie, při níž se uplatňuje tumor supresorový gen VHL (von Hippel-Lindau), který při normoxii snižuje produkci VEGF (vascular endothelial growth factor) pomocí degradace transkripčního faktoru HIF-1 alfa (hypoxia inducible factor alpha), zatímco při hypoxii napomáhá jeho stabilizaci a následnému transportu do jádra, v němž se váže s specifickou sekvencí HRE (hypoxia response element), a tak stimuluje transkripci a navazující expresi VEGF. VEGF je hlavním angiogenním faktorem. Odlišujeme u něj podtypy A–E a dále placentární růstový faktor (placental induced growth factor, PIGF). VEGF-A, VEGF-B a VEGF-E stimuluje proliferaci a migraci endotelií a zvyšují cévní permeabilitu, zatímco VEGF-C a VEGF-D vedou k stimulaci lymfangiogeneze [Klener 2010]. VEGF však není faktorem specifickým pouze pro nádorové lymfatické uzliny, nýbrž je exprimován i v normálních mízních uzlinách

[Turley et al. 1998, Wolfesberger et al. 2007]. Účinek VEGF-A na endotel je zprostředkován prostřednictvím receptorů VEGFR-1 (vascular endothelial growth factor receptor) a VEGFR-2 [Quinn et al. 1993], které prostřednictvím své tyrosinkinázové aktivity spouštějí kaskádu intracelulárních informačních molekul („druhých poslů“). Zatímco stimulace VEGFR-2 je považována za jednoznačně mitogenní faktor endotelií, VEGFR-1 má nejspíše duální funkci a může se uplatňovat nejen při podpoře, ale i při útlumu angiogeneze [Ferrara et al. 2003, Rahimi 2006, Roskoski Jr. 2008, Shibuya 2006]. Oba typy receptorů mohou být také v cílových tkáních tumoru zvýšeně externalizovány (up-regulace), což vede k vyšší senzitivitě na VEGF, nebo internalizovány (down-regulace), což naopak snižuje odpověď na VEGF [Ferrara et al. 2003].

2.1.2 Mikrovaskulární denzita

Mikrovaskulární denzita (MVD) je nejužívanějším způsobem popisu míry angiogeneze v tkáni. Tento parametr popisuje intenzitu angiogeneze ve tkáních, nejčastěji nádorových. Pod pojmem mikrocévy (angl. microvessels) rozumíme nejdrobnější cévy, jmenovitě arterioly, metarterioly, prekapiláry, vlastní kapiláry, postkapiláry a venuly. Hodnota mikrovaskulární denzity odpovídá hustotě těchto cévních profilů, která je přepočtena na jednotku plochy, příp. na jedno zorné pole. Metodika stanovení mikrovaskulární denzity však ve studiích není dodnes jednotná, jednotlivé práce se liší jak výběrem protilátky značící cévní struktury, tak způsobem vlastního zjišťování počtu mikrocév.

2.1.2.1 Protilátky užívané při stanovení mikrovaskulární denzity

Pro vyznačení cévních struktur jsou využívány protilátky buď panendoteliální, nebo protilátky vážící se na aktivované/proliferující endotelie.

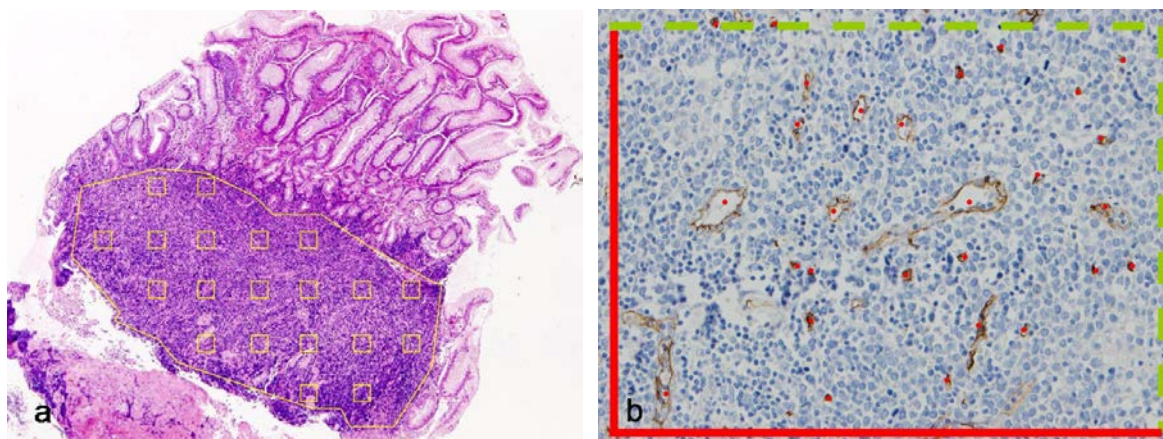
Z panendoteliálních protilátek je nejužívanější CD31. Jejím pozitivním rysem je, že nebarví lymfatické cévy. Jako problematické se u nádorů s větším zánětlivým pozadím může jevit to, že reaguje i se zánětlivými buňkami (makrofágy, plazmocyty, neutrofilové či lymfocyty), což může způsobovat problémy jak při manuálním počítání, tak zejména při počítačové analýze obrazu [Vermeulen et al. 1996]. Další protilátkou je CD34, u níž jsou obecně omezení v případě některých stromálních nádorů. U MVD zjištěné pomocí protilátky CD34 je u absolutních hodnot nutné vzít v úvahu při porovnání hodnot získaných s CD31, že CD34 barví i část lymfatických cév podobně jako faktor VIII, což je další z panendoteliálních markerů. Omezením při použití faktoru VIII je, že podle některých studií není exprimován na části endoteliální populace v některých orgánech [Nico et al. 2008, Vermeulen et al. 1996]. Práce, které srovnávají dvě a více panendoteliálních protilátek na sousedních řezech identickými bločky nádorové tkáně, jsou vzácné [Norrrby et al. 2003] a nelze je zcela zobecňovat, protože mají vypovídací hodnotou omezenou pouze na konkrétní orgán.

Druhou skupinou jsou protilátky vážící se na aktivované/proliferující endotelie. Jako příklad jmenujme nestin, který značí proliferující endotelie [Tichý et al. 2010], E-9, jež se váže jen na malé intratumorózní cévy [Nico et al. 2008], či CD105 (endoglin), což je receptor transformovaných růstových faktorů beta 1 a beta 3, který je exprimován na proliferujících cévách a pouze slabě, či vůbec na endotelu ostatních cév [Sugita et al. 2007]. Způsobem zjištění míry proliferace endotelií může být také dvojité imunohistochemické barvení, tvořené proliferačním markerem Ki-67 a endoteliálním markerem [Vermeulen et al. 2002].

2.1.2.2 *Způsoby stanovení mikrovaskulární denzity*

Vlastní stanovení hodnoty MVD lze provést mnoha různými způsoby [Nico et al. 2008, Vermeulen et al. 2002, Vermeulen et al. 1996]. Metoda tzv. „hot spots“, nazývaná také metoda podle Weidnera [Weidner et al. 1991], je patrně nejužívanější. Nejdříve je nutné při malém zvětšení nalézt okrsky „hot spots“, tedy okrsky s nejvyšší mikrovaskulární denzitou, a v nich je pak v určené ploše při větším zvětšení spočítán počet drobných cévních prostor (např. jedno zorné pole při zvětšení 200× odpovídá ploše 0,74 mm² [Weidner et al. 1991]). Kritériem pro započtení mikrocévy je pouze imunohistochemická pozitivita vybraného endotelového markeru v endotelové buňce nebo jejich clusteru, není to přítomnost erytrocytů či vlastního lumen, které může kolabovat či být komprimováno ať už při odběru, nebo při zpracování bločku. Na druhou stranu cévy většího kalibru s přítomností hladké svaloviny ve stěně se již jako mikrocévy nezapočítávají [Tonar et al. 2008]. Princip „hot spots“ bývá používán jak při manuálním počítání jednotlivých mikrocév, tak při použití počítačové analýzy obrazu, kdy jsou jednotlivé „hot spots“ manuálně nalezeny a teprve vyfotografovaná zorná pole analyzuje počítač. Je nutné podotknout, že „hot spots“ se nacházejí především na periférii nádoru. MVD je totiž nejvyšší při kontaktu nádoru se zdravou tkání, směrem do centra se snižuje [Nico et al. 2008]. Některé studie však upozorňují na nedostatečnou opakovatelnost subjektivního výběru těchto oblastí maximální vaskularizace [Fox et al. 2004, Preusser et al. 2006, Tonar et al. 2008]. Mikrovaskulární denzita získaná analýzou „hot spots“ je interpretována jako číselný popis zastoupení nejvíce prokrvených míst tumoru s nejvyšší novotvorbou cév [Tonar et al. 2008]. Charakter rozmístění mikrocév v tumorech (tzv. vascular pattern) může být však velmi heterogenní a takto získaná mikrovaskulární denzita nemusí vypovídat o nádoru jako celku, ale pouze o jeho biologicky neaktivnějších oblastech s tím, že nedokáže rozlišit poměrné zastoupení těchto center angiogeneze ve vyšetřovaném vzorku. Případy s několika izolovanými „hot spots“ s vyšší MVD pak vedou ke stejnému číselnému výsledku jako tumor, jehož celá periferie má vyšší MVD.

Jiným způsobem využití počítačové analýzy při zjišťování hodnot MVD je spočítání cévních profilů v tzv. systematicky náhodně vybraných arbitrárně stanovených zorných polích [Brawer et al. 1994, Tonar et al. 2008], tedy v zorných polích v přesně stanovené vzájemné vzdálenosti. Proto je jako první krok provedeno systematické vzorkování zorných polí v rámci řezu, jehož cílem je zajistit standardizovaný rozestup mezi snímanými zornými poli, viz obrázek 20 (a). Ten lze garantovat jak pomocí mikroskopu s motorizovaným stolcem, tak i pouze manuálním posuvem mikroskopu o určitý počet zorných polí, což je v praxi úkon proveditelný s dostatečnou přesností. Pomocí tohoto způsobu vzorkování se oblasti mnohdy s různou hustotou mikrocév podílejí na výsledné hodnotě úměrně svému zastoupení ve vzorku. Pro vlastní počítání cévních profilů v zorném poli lze použít klasického počítacího rámečku, kde jsou počítačovým programem s interaktivní kontrolou odečítacího nalézány profily odpovídající mikrocévám [Tonar et al. 2008], viz obrázek 20 (b). Hodnoty MVD získané počítačovou analýzou vybraných polí korelují s hodnotami získanými manuálním počítáním jak při užití metody „hot spots“ [Rana et al. 2010], tak u metody systematicky náhodně vybraných polí [Brawer et al. 1994]. Mezi výhody počítačové analýzy obrazu patří nejen časová úspora a omezení subjektivních vlivů jednotlivých odečítajících, ale jsou zde i možnosti získat další informace o vaskularitě v daném vzorku, jmenovitě o ploše či průměru cévních lumen [Kašparová et al. 2007]. Problémem může být, že zapojení obrazové analýzy klade vysoké nároky na eliminaci artefaktů a uniformitu barvení.

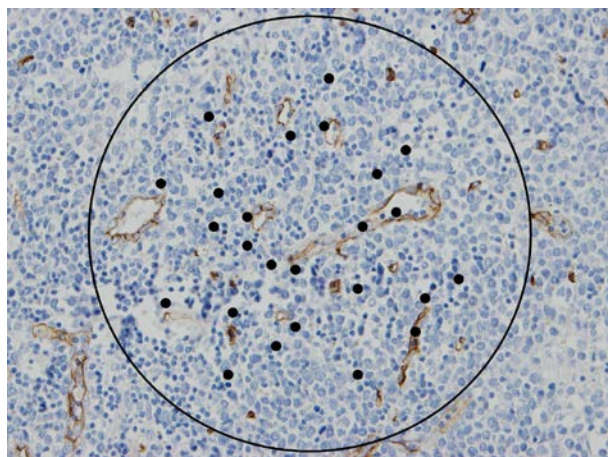


Obrázek 20 – stanovení mikrovaskulární denzity pomocí metody systematického náhodného výběru zorných polí v definované oblasti; (a) vzorkování v lymfomu z plášťových buněk infiltrujícím sliznici tlustého střeva, barvení H-E, zvětšení 50×; (b) označení počítaných profilů mikrocév v jednom zorném poli MCL v lymfatické uzlině s využitím počítačícího rámečku pro tzv. nevychýlené počítání [Gundersen 1977], (zakázané linie červeně, protínající cévní profily nejsou započítány; povolené linie zeleně přerušovaně, dotýkající se cévní profily jsou započítány), protilátka CD34, zvětšení 200×

Počítačovou analýzu obrazu je možné použít také při skenování celého preparátu a počítání mikrocév na celé ploše vzorku s následným přepočtením na jednotku plochy [Chantrain et al. 2003]. Nejdříve je vytvořen virtuální řez pomocí skeneru pro digitalizaci skla, který je poté pomocí programů pro analýzu obrazu vyhodnocen v celém rozsahu. Pro tuto strategii jsou také používány názvy „whole mount pathology“ či „whole slide imaging“. Tato metoda umožňuje systematické vyšetření celé plochy řezu tak, aby i zde měla data získaná z jednotlivých oblastí váhu úměrnou svému zastoupení [Liu et al. 2011]. Pomocí analýzy po sobě následujících řezů je možné vytvořit trojrozměrný obraz cévních struktur, z kterého je možno zjistit procentuální objemové zastoupení cév na objemu vyšetřované tkáně (mikrovaskulární objem) [Liu et al. 2013]. Trojrozměrné rekonstrukce cévních struktur nabízejí sice i zajímavé vizualizace, svou pracností však přesahují obvyklé požadavky rutinního stanovení míry zastoupení mikrocév.

Tzv. „Chalkley count“ je další možností zjišťování hodnot MVD [Chalkley 1943]. Zde jsou také nalezeny okrsky nejvyššího zastoupení mikrocév, poté se na toto zorné pole použije speciální okulár s mřížkou s 25 náhodně rozloženými body na velkém zvětšení 200–250×. Okulár je pak rotován tak, aby co nejvíce bodů bylo ve stěně cév či uvnitř jejich lumen a tyto body jsou pak počítány (viz obrázek 21). Tato hodnota se pak porovnává mezi jednotlivými zkoumanými vzorky. Tento způsob spíše popisuje míru plochy cév v daném zorném poli než jejich hustotu [Jorgensen et al. 2007].

Výjimečně se již nyní používá semikvantitativní stanovení MVD, tedy určení nízké, střední a vysoké MVD dle subjektivního hodnocení posuzovatele. Hlavním problémem tohoto způsobu zjišťování MVD je velmi subjektivní hodnocení s vysokou variabilitou mezi posuzovateli. Za výhodu lze považovat nízkou časovou náročnost. U solidních nádorů byla zjištěna korelace mezi kvantitativní a semikvantitativní metodou [Fox et al. 1995].



Obrázek 21 – „Chalkley count“ – projekce mřížky v zorném poli lymfomu z pláštěvých buněk, protilátka CD34, zvětšení 200×.

2.1.3 Praktické využití mikrovaskulární denzity v nádorech

Možnosti praktického využití zjištěných hodnot mikrovaskulární denzity se nabízejí dvě:

1. k indikaci antiangiogenní terapie a ke sledování její účinnosti;
2. MVD jako prognostický faktor.

2.1.3.1 Mikrovaskulární denzita v hodnocení efektivity antiangiogenní léčby

U MVD se v případě aplikace antiangiogenní terapie nabízí možnost využít ji jako faktor ukazující efektivitu této léčby. Při tomto využití roste význam hodnocení založeného na kvantifikaci celého řezu tak, aby statistická váha různých oblastí nádoru byla úměrná jejich zastoupení na řezu [Liu et al. 2011]. Je třeba připomenout, že MVD je číselným zlomkem, kdy při antiangiogenní terapii může být ovlivněn jak jeho číselník (množství cév), tak jmenovatel (plocha řezu, v níž se tyto cévy vyskytují). Proto úbytek cév provázený zmenšením tumoru vyústí v nezměněnou MVD, přestože terapeutického ovlivnění mohlo být částečně dosaženo. Při interpretaci hodnot MVD je třeba mít na zřeteli, že MVD nepopisuje vaskulární inhibici nezávisle na ostatním prostředí, ale je to spíše komplex změn ovlivněný iniciální vaskulární supresí a následně interakcí mezi vaskulárními a nádorovými elementy. Při podání antiangiogenní léčby totiž nejprve dochází k inhibici, případně eliminaci kapilár, následované eliminací nádorových buněk a celý tento proces ovlivňuje hodnoty MVD. Nejdříve dochází k rychlejšímu poklesu hodnot MVD a později se pokles hodnot MVD ve vzorcích odebraných během léčby zpomalí [Hlatky et al. 2002]. V některých případech může dojít po ukončení léčby ke zvýšení hodnot MVD na předterapeutické hodnoty, přestože efekt antiangiogenní léčby u pacienta byl zdokumentován. Dochází k tomu v případech, kdy terapie významně nenaruší metabolické potřeby či produkci angiogenních faktorů nádorových buněk. U solidních nádorů se ukazuje, že efekt antiangiogenní terapie se významněji neliší u případů s nízkou ani vysokou hodnotou MVD nádoru [Hlatky et al. 2002]. Bylo pouze popsáno, že při poklesu MVD ve vzorku z doby terapie je terapie účinná [Nico et al. 2008], ale pokud k poklesu nedochází, či naopak dochází k zvýšení hodnoty MVD, vůbec to nevyklučuje efektivitu terapie [Hlatky et al. 2002]. Tento jev byl mimo jiné popsán při použití thalidomidu u mnohočetného myelomu,

u něhož byl patrný významný pokles MVD pouze u části případů s terapeutickým efektem [Singhal et al. 1999]. U lymfomů tyto poterapeutické změny ještě nebyly podrobněji zkoumány.

2.1.3.2 Prognostický vliv mikrovaskulární denzity v lymfomech

Studie věnované prognostickému vlivu hodnot MVD zjištěných z předléčebných histologických vzorků nádorů jej často potvrzují, a to jak u solidních nádorů např. u karcinomu prsu [Heimann et al. 1996, Kumar et al. 1999, Uzzan et al. 2004], prostaty [Bono et al. 2002, Concato et al. 2009] či u kolorektálního karcinomu [Li et al. 2003], tak u hematologických malignit např. u mnohočetného myelomu [Kumar et al. 2004] nebo u některých lymfomů [Gratzinger et al. 2008, Korkolopoulou et al. 2005].

Ribatti zjišťuje nejnižší hodnoty MVD u zdravé tkáně, vyšší hodnoty u lymfomů s nízkým stupněm malignity a nejvyšší hodnoty u lymfomů s vysokým stupněm malignity [Ribatti et al. 1996]. Oproti tomu Ridell popisuje, že mimo chronické lymfatické leukémie/lymfomu z malých B-buněk (B-CLL/SLL) jsou hodnoty MVD ostatních lymfomů nižší než u lymfadenitidy [Ridell et al. 2001]. Tato data jsou podobná zjištěním u solidních nádorů, protože u mnohých z nich je hodnota MVD nižší než u původní nenádorové tkáně. Tento jev byl popsán u multiformního glioblastomu, karcinomu prsu, tlustého střeva, v renálním karcinomu, pouze u prostaty byla v karcinomu zjištěna MVD vyšší [Eberhard et al. 2000]. Za příčinu tohoto stavu je považován fakt, že spotřeba kyslíku je většinou v nádorové tkáni nižší než v normální tkáni, za výjimku je považován právě karcinom prostaty a germinální nádory varlete [Hlatky et al. 2002].

Při porovnání hodnot MVD mezi jednotlivými typy lymfomů lze učinit závěr, že agresivnější lymfomy mívají vyšší absolutní hodnotu MVD. Konkrétně Tzankov pomocí protilátky CD34 zjišťuje nejvyšší hodnotu MVD u difúzního velkobuněčného B-lymfomu (DLBCL). Dalšími v pořadí jsou folikulární lymfom a lymfom z plášťových buněk (MCL), B-CLL/B-SLL [Tzankov et al. 2007]. Jorgensen s využitím protilátky CD34 zjišťuje, že nejvyšší hodnotu MVD má periferní T-lymfom (PTCL), střední hodnotu DLBCL a nejnižší hodnotu MVD má folikulární lymfom, a to v intrafolikulární oblasti. Je zajímavé, že když byly hodnoty MVD zjišťovány v interfolikulárních oblastech, byly hodnoty výrazně vyšší než jsou hodnoty MVD u PTCL. Výsledky byly v této studii shodné, ať byla použita „Chalkley count“ metoda či metoda „hot spots“ [Jorgensen et al. 2007]. Naproti tomu Ridell pomocí imunoprotilátky CD34 popisuje vyšší MVD u chronické lymfatické leukémie, následované lymfadenitidou, zatímco agresivnější lymfomy (MCL, DLBCL) ji mají nižší [Ridell et al. 2001].

Problémem při porovnávání jednotlivých studií, věnovaných prognostickému vlivu MVD u jednotlivých typů lymfomů, je jednak užití různých protilátek, ale také metod stanovení hodnot MVD.

U DLBCL byla jedna studie provedena pomocí protilátky CD34 [Gratzinger et al. 2008], zatímco druhá pomocí CD31 [Cardesa-Salzman et al. 2011]. Obě byly vyhodnocovány použitím počítačové analýzy obrazu. V první studii [Gratzinger et al. 2008] bylo zjištěno, že zvýšené hodnoty MVD jsou spojeny s horším přežitím ($P = 0,047$), avšak nebylo možné stanovit jasný předěl v hodnotě MVD mezi skupinami s lepší a horší prognózou. Při rozdělení dle mediánu nebyl rozdíl mezi skupinami prokázán ani u celkového přežití (medián OS 77 a 48 měsíců, $P = 0,065$), ani u doby přežití bez progresu (medián PFS 47 a 28 měsíců, $P = 0,17$). Ve druhé studii [Cardesa-Salzman et al. 2011] se případy dělily dle mediánu MVD a byl prokázán vliv těchto skupin na 4 leté celkové přežití (78 vs. 54 %, $P = 0,001$) a 4 leté PFS (65 vs. 48 %, $P = 0,048$). Přestože v obou publikacích byl prokázán

negativní vliv vyšších hodnot MVD na přežití pacientů, výsledky obou studií jsou vzhledem k nastavení jejich parametrů vzájemně neporovnatelné.

U klasického Hodgkinova lymfomu, kde většina případů odpovídala variantě nodulární sklerózy, byla hodnota MVD zjišťována pomocí protilátky CD34 s využitím počítačové analýzy obrazu ve 3 vybraných „hot spots“ [Korkolopoulou et al. 2005]. Případy byly rozděleny dle mediánu, u případů s nízkou MVD je 5 leté přežití 94 %, u vysoké MVD 84 %, $P = 0,0397$.

V případě folikulárního lymfomu byly publikovány dvě studie s odlišnými závěry. První z nich byla prováděna pomocí protilátky CD34 a pomocí manuálního počítání mikrocév v 3 digitálních fotografiích „hot spots“ [Koster et al. 2005]. Zde byly případy rozděleny na třetí tercil a zbývající část případů. V případě 3. tercilu dle hodnot MVD je lepší celkové přežití (94 vs. 50 měsíců, $P = 0,03$) i PFS (47 vs. 13 měsíců, $P = 0,02$). Naopak u studie s použitím protilátky CD31 je u případů s vyšší MVD horší celkové přežití i PFS [Taskinen et al. 2010].

U B-chronické lymfatické leukémie v kostní dřeni nebyl ve 2 studiích prováděných pomocí metody „hot spots“ pomocí faktoru VIII či protilátky CD34 zjištěn prognostický vliv MVD, pouze hodnoty MVD zjištěné pomocí CD34 jsou významně vyšší než hodnoty získané pomocí faktoru VIII [Antic et al. 2010, Smolej et al. 2008].

V případě lymfomu z plášťových buněk dosud nebyla publikována komplexní studie věnovaná prognostickému vlivu MVD, pouze práce věnované porovnání hodnot MVD s jinými lymfomy, kde bylo zkoumáno pouze několik lymfomů z plášťových buněk, konkrétně 9 [Ridell et al. 2001], resp. 19 případů [Tzankov et al. 2007].

2.2 Cíle studie mikrovaskulární denzity v lymfomu z pláštěvých buněk

Cílem naší studie je:

1. ověřit prognostický vliv mikrovaskulární denzity (MVD) u většího souboru případů lymfomu z pláštěvých buněk;
2. ověřit vztah mikrovaskulární denzity k proliferační aktivitě, variantám indexu MIPI, jednotlivým cytomorfologickým a architektonickým variantám, k infiltraci kostní dřeně v době diagnózy;
3. porovnat hodnoty MVD u různých lokalizací primárních vzorků;
4. provést multivariátní analýzu souboru pro porovnání prognostického vlivu MVD a ostatních faktorů.

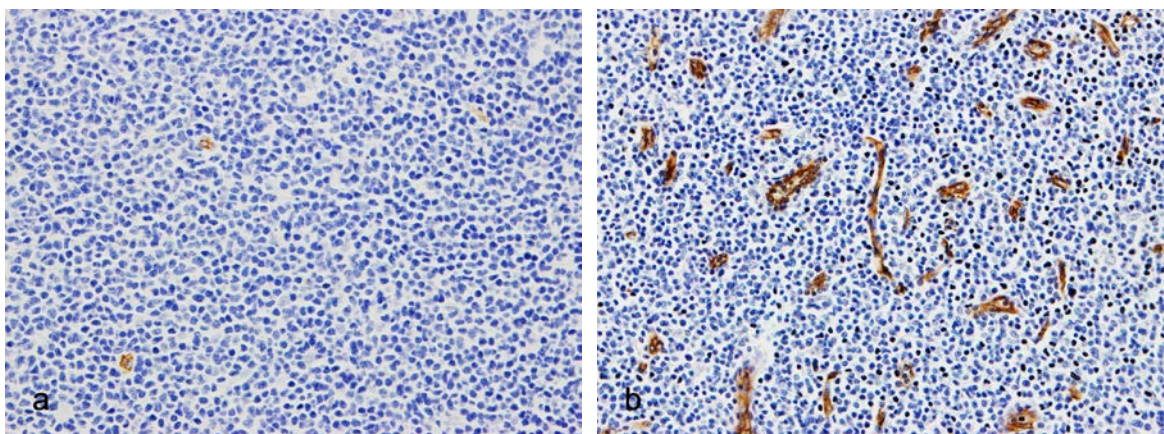
2.3 Materiál a metody

2.3.1 Výběr pacientů

Pro studii bylo z předchozího souboru čítajícího 235 pacientů vybráno 177 pacientů s lymfomem z pláštěvých buněk. Ze studie byly vyřazeny případy, u nichž díky vykrájení diagnostického bločku již nebylo možné provést další imunohistochemické vyšetření, příliš malé vzorky, u nichž nebylo možné provést vyhodnocení dostatečného počtu zorných polí pro stanovení MVD, a dále případy, u nichž diagnostický vzorek MCL pocházel z kostní dřeně. U pacientů byly z předchozí studie k dispozici klinické údaje včetně některých laboratorních výsledků, data o cytomorfoloické a architektonické variantě, hodnoty proliferační aktivity a MIPI, včetně s-MIPI a MIPI_b.

2.3.2 Mikrovaskulární denzita

Pro stanovení MVD byla použita protilátka CD34 (CD 34 Class 2, ředění 1 : 100, výrobce DakoCytomation, Glostrup, Dánsko), viz obrázek 22.



Obrázek 22 – nízká (a) a vysoká (b) mikrovaskulární denzita zjištěná pomocí protilátky CD34

Pro stanovení hodnot MVD byl užit počítačový program Ellipse software (výrobce ViDiTo, Košice, Slovensko). Nejdříve bylo nutné potvrdit výběr tvořený vlastní tkání vzorku a v případě, kdy MCL infiltroval pouze část vzorku, ohraničit pouze tuto oblast (např. pouze submukózu slizničního polypu). Následně bylo ve výběru pomocí metody systematického rovnoměrného náhodného vzorkování obrazových polí [Gundersen et al. 1987, Wolfesberger et al. 2008] z každého řezu vybráno 20 zorných polí. Z nich byly při čtyřicetinasobném zvětšení objektivu pořízeny digitální fotografie, každá o ploše 0,096958 mm². Vzorkování nebylo nijak ovlivněno případnou zvýšenou přítomností cévních profilů v dané oblasti a fotografie byly z vybrané oblasti vzorku pořízeny rovnoměrně (viz obrázek 20 (a), strana 53). Poté na jednotlivé fotografie byl použit 2D rámeček, kde byly počítačem označovány a následně odečítajícím potvrzovány jednotlivé mikrocévy. Kritériem započítání byl jakýkoli profil CD34 pozitivních endoteliálních buněk oddělený od přilehlých mikrocév, nádorových buněk či pojivové tkáně. Přítomnost cévního lumina či erytrocytů nebyla podmínkou započtení mikrocévy, naopak cévy s jasně

mnohovrstevnou stěnou či s hladkou svalovinou ve stěně započítány nebyly [Tonar et al. 2008, Wolfesberger et al. 2008]. Pro oblast okrajů byly započítány i profily dotýkající se zelených akceptačních linií, naopak profily dotýkající se červených rejekčních linií započteny nebyly (viz obrázek 20 (b), strana 53). U každého případu bylo vyhodnoceno 20 mikrofotografií zorných polí. Každá z nich měla plochu 0,096958 mm², tedy celková plocha, z níž byly mikrocévy spočítány, byla 1,94 mm². Následně byla získaná hodnota přepočtena na jeden milimetr čtvereční.

2.3.3 Statistické zpracování

Pro statistické vyhodnocení výsledků byl použit počítačový program MedCalc, verze 11.2.1.0 (výrobce MedCalc software, Mariakerke, Belgie). Jako statisticky významný výsledek je považováno $P \leq 0,05$. Celkové přežití (overall survival – OS) bylo počítáno od data diagnózy do doby smrti, bez ohledu na její příčinu, či do doby poslední známé kontroly u žijících pacientů. Doba přežití bez progresse (progression free survival – PFS) pak byla počítána od data diagnózy do data zjištění progresse, relapsu, smrti z jakékoli příčiny, nebo poslední známé kontroly. Klinická data byla aktualizována k dubnu 2012. Vliv jednotlivých hodnot (MVD, MIPI, ...) na přežití byl určen pomocí Coxovy regresní analýzy relativního rizika (Cox proportional-hazards regression). Vizualizace křivek přežití byla provedena pomocí Kaplan–Meierových křivek přežití, vztah jednotlivých skupin (např. skupiny dle hodnot MVD) na přežití pomocí log-rank testu. Vztah jednotlivých hodnot k MVD byl určen pomocí lineární regresní analýzy a v případě faktoru s několika skupinami pomocí Kruskal–Wallisova neparametrického testu. Multivariátní analýza byla provedena pomocí multivariátní Coxovy regresní analýzy relativního rizika procedurou „stepwise“. Pro zjišťování vhodnosti rozdělení jednotlivých skupin u proliferace aktivity ve vztahu k mikrovaskulární denzitě byla použita ROC analýza.

2.4 Výsledky studie mikrovaskulární denzity v lymfomu z plášťových buněk

2.4.1 Klinická data a terapie pacientů

Do studie bylo zařazeno 177 pacientů s MCL (viz tabulka 13).

Tabulka 13 – klinické údaje 177 pacientů s MCL vybraných do studie MVD

		Počet případů	%
Pohlaví	žena	58	33
	muž	119	67
Věk v době diagnózy	< 50	17	9,6
	50–59	43	24,3
	60–69	60	33,9
	≥ 70	57	32,2
Klinické stádium dle Ann Arbor klasifikace	I	4	2,3
	II	11	6,2
	III	18	10,2
	IV	143	80,8
	neznámé	1	0,6
Infiltrace kostní dřevě	zjištěna	133	76,9
	nezjištěna	40	23,1
B-symptomy	přítomny	79	44,6
	chybí	98	55,4
Lokalizace vzorku	lymfatická uzlina	133	75,1
	trávicí trakt	9	5,1
	patrová mandle	17	9,6
	slezina	5	2,8
	očnice	2	1,1
	dutina ústní	9	5,1
	mediastinum+hruďní stěna	2	1,1
Hladina bílých krvinek v krvi	pod 10000/μl	127	71,8
	nad 10000/μl	50	28,2
Hladina laktátdehydrogenázy v krvi	nižší než horní limit laboratoře	78	44,1
	vyšší než horní limit laboratoře	97	54,8
Stav dle ECOG	0–1	131	74,4
	2–4	45	25,6

Z 177 případů bylo 67 % mužů (119 případů) a 33 % žen (58 případů). Jejich věk byl v rozmezí 28–86 let, průměrný věk i medián věku byl shodný, a to 64 let. V době aktualizace klinických údajů v dubnu 2012 žilo ještě 59 pacientů (33,3 %). Medián doby sledování

u žijících pacientů byl 76 měsíců včetně 2 pacientů ztracených ze sledování po 3, resp. 12 měsících (rozmezí 3–182 měsíců). Mimo těchto dvou případů byla nejkratší doba sledování pacienta 39 měsíců. Medián celkového přežití (OS) byl 45 měsíců. Pět let od doby diagnózy se dožilo 41,7 % pacientů. Medián doby přežití bez progresu (PFS) byl 22 měsíců.

V tabulce 14 jsou zahrnuty údaje o léčbě pacientů ze studie MVD. Chemoterapií bylo léčeno 175 z nich. Pacienty lze podle typu chemoterapie rozdělit do dvou skupin – neintenzivní (konvenční) terapie a intenzivní terapie (rozpis jednotlivých protokolů – viz kapitola 1.4.1). Do první skupiny neintenzivní terapie lze zařadit 111 pacientů, do skupiny intenzivní léčby 64 pacientů. Rituximab byl použit k léčbě 121 pacientů (68 %), udržovací terapie rituximabem byla užitá u 13 pacientů.

Tabulka 14 – terapie první volby u 177 pacientů s MCL

(CVP – kombinace cyklofosfamidu, vinkristinu a prednisonu, CHOP – kombinace cyklofosfamidu, doxorubicinu, vinkristinu a prednisonu, VAD – kombinace vinkristinu, adriamycinu a dexametazonu, ASCT – autologní transplantace kmenových krvetvorných buněk, *např. R-hyperCVAD/HD-MTX/AraC (dávkově intenzifikovaný R-CHOP střídaný s vysokodávkovým cytarabinem a methotrexátem), či R-maxiCHOP/AraC (dávkově intenzifikovaný R-CHOP střídaný s vysokodávkovým cytarabinem bez ASCT), †např. Nordický protokol (dávkově intenzifikovaný R-CHOP střídaný s vysokodávkovým cytarabinem s ASCT), či standardní R-CHOP s ASCT v první linii terapie)

Terapie	Počet případů	%
Pouze chirurgické odstranění	1	0,6
Pouze radioterapie	1	0,6
CVP	10	11,3
CHOP	29	16,6
R-CHOP	40	22,9
Chemoterapie založená na fludarabinu	19	10,7
Ostatní neintenzivní chemoterapeutické protokoly (CHOP/AraC, VAD, chlorambucil)	13	7,3
Intenzivní indukce bez ASCT *	34	19,2
Chemoimunoterapie následovaná vysokodávkovou konsolidační léčbou a ASCT †	27	15,3
Chemo(immuno)terapie následovaná alogenní transplantací kmenových krvetvorných buněk	3	1,7

2.4.2 Mikrovaskulární denzita a přežití

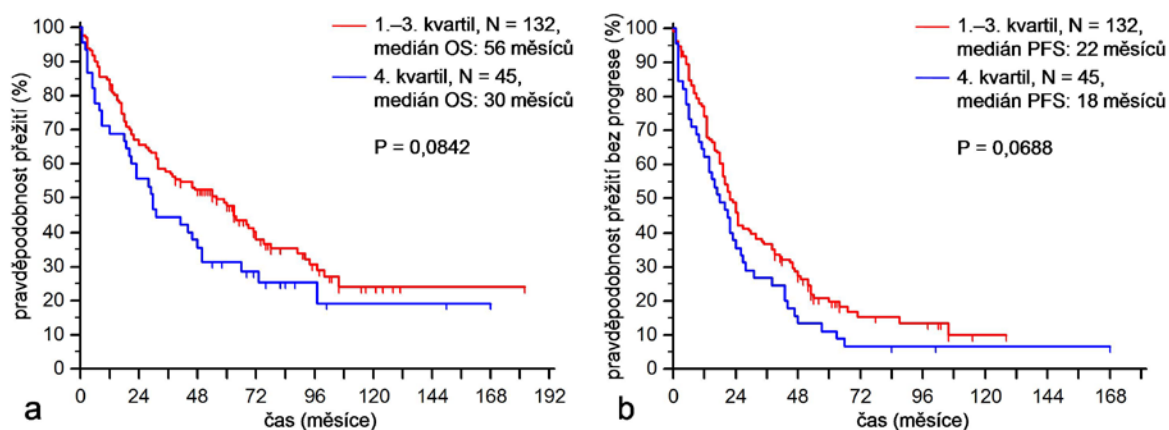
Průměrná hodnota mikrovaskulární denzity (MVD) byla 172,71 mikrocév/mm², medián 158,23 mikrocév/mm², hodnoty 54,63–503,58 mikrocév/mm². Pro posouzení vlivu hodnot MVD na dobu celkového přežití (OS) a dobu přežití bez progresu (PFS) byla použita univariátní Coxova regresní analýza relativního rizika (Cox proportional hazard regression). Vliv hodnot MVD na OS ani PFS prokázán nebyl (P = 0,1378, resp. P = 0,0628). Aby byl zjištěn případný vliv jen některé skupiny hodnot MVD (nízkých či vysokých) na přežití, byly případy rozděleny do čtyř skupin na kvartily. Konkrétně v prvním kvartilu jsou případy s MVD nižší než 117,4 mikrocév/mm², ve druhém kvartilu jsou zahrnuty případy s MVD od 117,4 mikrocév/mm² včetně do 158,2 mikrocév/mm², do třetího kvartilu spadají případy s MVD mezi 158,2 mikrocév/mm² včetně a 206,6 mikrocév/mm² a do čtvrtého kvartilu s MVD větší či rovnou 206,6 mikrocév/mm². Hodnoty mediánů OS a PFS u jednotlivých

skupin jsou uvedeny v tabulce 15.

Tabulka 15 – hodnoty mediánů OS a PFS podle kvartilů hodnot MVD (porovnání jednotlivých skupin pomocí log-rank testu)

Kvartil dle hodnot MVD	první	druhý	třetí	čtvrtý	
Počet případů	44	44	44	45	
Medián OS (měsíce)	63	46	59	30	P = 0,2681
Medián PFS (měsíce)	21	23	24	18	P = 0,2813

Z výsledků je patrné, že mezi prvním, druhým a třetím kvantilem nejsou výraznější rozdíly mediánů OS a PFS, výraznější rozdíl je patrný až u čtvrtého kvantilu. Proto byly první tři skupiny sloučeny do jedné (132 případů) a porovnány se čtvrtým kvantilem (45 případů). Medián OS byl u skupiny 1.–3. kvantilu 56 měsíců, u čtvrtého kvantilu 30 měsíců, mediány PFS byly 22 a 18 měsíců. Pomocí log-rank testu byla zjišťována hladina významnosti P, která u OS činí 0,0842 a u PFS 0,0688. S ohledem na kritérium $P \leq 0,05$ i přes viditelný rozdíl mezi skupinami (viz obrázek 23) prognostický vliv těchto skupin na OS i PFS prokázán nebyl.



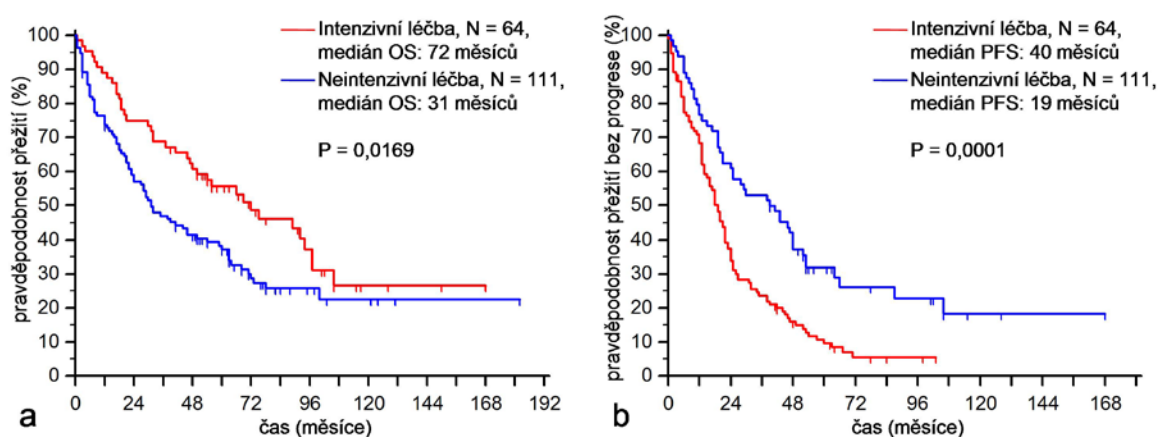
Obrázek 23 – Kaplan–Meierovy křivky OS (a) a PFS (b) pro 1.–3. vs. 4. kvartil hodnot MVD

Případy byly následně rozděleny podle druhu terapie – neintenzivní a intenzivní (kapitola 1.4.1). Celkem se jedná o 175 pacientů, 2 pacienti z našeho souboru chemoterapií léčení nebyli (viz tabulka 14), Kaplan–Meierovy křivky přežití jsou na obrázku 24. V tabulce 16 jsou hodnoty prognostických faktorů MCL a mediány přežití rozdělené podle druhu terapie.

Při zjišťování vlivu hodnot MVD na OS a PFS dle výše uvedených skupin terapie byla použita univariátní Coxova regresní analýza relativního rizika. U 111 případů léčených neintenzivními léčebnými protokoly byla na hodnotách MVD prokázána závislost u OS ($P = 0,0419$), ale u PFS nikoli ($P = 0,0551$). Naproti tomu u 64 případů léčených intenzivními léčebnými protokoly nebyla prokázána závislost OS ani PFS na hodnotách MVD ($P = 0,6208$, resp. $0,2052$).

Tabulka 16 – porovnání mikrovaskulární denzity, proliferační aktivity, MIPI, celkového přežití a PFS u pacientů léčených intenzivní a neintenzivní terapií (Kruskal–Wallisův test použit u MVD, proliferační aktivity a MIPI, log-rank test u OS a PFS; N – počet případů; hodnoty MVD udávají počet mikrocév/mm²)

	Intenzivní terapie			Neintenzivní terapie			
	N	Průměr	Medián	N	Průměr	Medián	
Proliferační aktivita	64	25,27	20,06	111	27,70	24,24	P = 0,5686
Mikrovaskulární denzita	64	175,96	146,93	111	171,58	168,28	P = 0,3140
MIPI	64	5,86	5,80	108	6,43	6,34	P < 0,0001
OS (měsíce)	64		72	111		31	P = 0,0169
PFS (měsíce)	64		40	111		19	P = 0,0001



Obrázek 24 – Kaplan–Meierovy křivky OS (a) a PFS (b) při porovnání skupin dle terapie

2.4.3 Mikrovaskulární denzita a lokalizace primárního vzorku

Hodnoty MVD v MCL v jednotlivých lokalizacích jsou v tabulce 17. Vliv lokalizace vzorku na hodnoty MVD pomocí Kruskal–Wallisova testu zjištěn nebyl, $P = 0,2949$. Podobně při porovnání nodální (133 případů) vs. extranodální lokalizace (44 případů) nebyl prokázán rozdíl hodnot MVD mezi skupinami (průměry MVD 176,0 a 162,8 mikrocév/mm², mediány 168,3 mikrocév/mm² a 137,2 mikrocév/mm², $P = 0,2120$). Také nebyl zjištěn rozdíl v porovnání jednotlivých lokalizací vůči zbytku souboru.

Tabulka 17 – hodnoty MVD (počet mikrocév/mm²) podle lokalizace jednotlivých vzorků,

Lokalizace	Počet případů	%	Průměr MVD	Medián MVD
Lymfatická uzlina	133	75,1	175,99	168,28
Trávicí trakt	9	5,1	156,51	141,09
Patrová mandle	17	9,6	144,78	129,98
Slezina	5	2,8	195,15	109,88
Očnice	2	1,1	165,45	165,45
Dutina ústní	9	5,1	161,55	163,26
Mediastinum+hrudní stěna	2	1,1	265,92	265,92

	177	100,0	172,71	158,23
--	-----	-------	--------	--------

2.4.4 Mikrovaskulární denzita a cytomorfologická varianta

Počet případů dle cytomorfologických variant dle WHO 2008 [Swerdlow et al. 2008] a hodnoty MVD u těchto skupin jsou uvedeny v tabulce 18. Pomocí Kruskal–Wallisova testu nebyl prokázán vliv jednotlivých cytomorfologických variant MCL na MVD ($P = 0,7846$).

Tabulka 18 – hodnoty MVD (počet mikrocév/mm²) podle cytomorfologických variant

Cytomorfologická varianta	Počet případů	%	Průměr MVD	Medián MVD
Klasická	132	74,6	171,66	163,57
Malobuněčná	14	7,9	194,58	146,93
Podobná marginální zóně	4	2,3	173,46	170,16
Pleomorfní	8	4,5	180,44	171,10
Blastoidní	2	1,1	171,73	171,73
Klasická+pleomorfní	3	1,7	191,30	194,02
Klasická+podobná marginální zóně	10	5,6	142,74	137,20
Klasická+malobuněčná	3	1,7	164,09	173,30
Malobuněčná+podobná marginální zóně	1	0,6	211,60	211,60
	177	100,0	172,71	158,23

Následně byl vyhodnocován na MVD vliv tzv. agresivních variant, tedy čisté pleomorfní a blastoidní varianty včetně 3 případů v kombinaci pleomorfní a klasické varianty (celkem 13 případů – viz tabulka 18) proti ostatním typům (celkem 164 případů). Ten pomocí Kruskal–Wallisova testu prokázán nebyl (průměry MVD 181,6 mikrocév/mm² a 172,0 mikrocév/mm², mediány 186,5 mikrocév/mm² a 157,9 mikrocév/mm², $P = 0,2728$).

2.4.5 Mikrovaskulární denzita a architektonická varianta

Architektonická varianta byla hodnocena dle WHO 2008 [Swerdlow et al. 2008], zjištěné typy růstu a hodnoty MVD jsou uvedeny v tabulce 19. Jednotlivé typy růstu nemají vliv na hodnoty MVD ($P = 0,6601$). Ani při porovnání varianty difúzní, a to včetně případů v kombinaci s ostatními variantami (101 případů), proti ostatním variantám (73 případů) není zjištěn významný rozdíl hodnot MVD (průměr 167,4 mikrocév/mm² vs. 179,0 mikrocév/mm², mediány MVD 148,2 mikrocév/mm² a 165,1 mikrocév/mm², $P = 0,1816$).

Tabulka 19 – hodnoty MVD (počet mikrocév/mm²) u jednotlivých architektonických variant

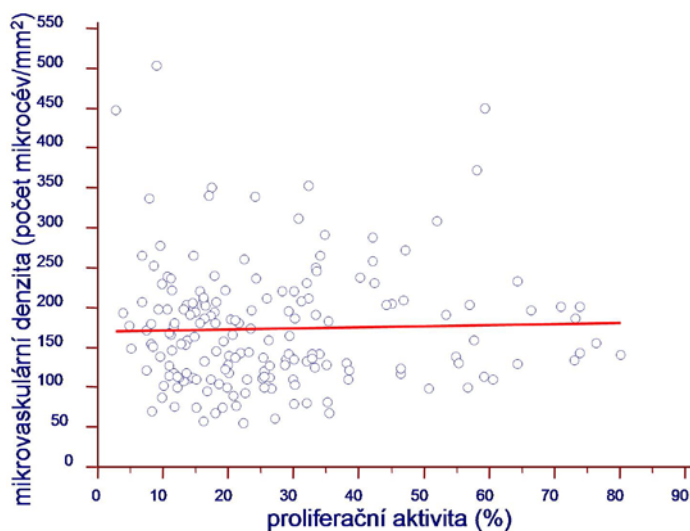
Architektonická varianta	Počet případů	%	Průměr MVD	Medián MVD
Difúzní	61	34,5	167,58	150,70
Nodulární	56	31,6	175,72	161,69
Plášťové zóny	1	0,6	180,21	180,21
Difúzní+nodulární	29	16,4	166,30	158,23
Difúzní+plášťové zóny	11	6,2	168,85	119,93

Plášťové zóny+nodulární	16	9,0	190,26	167,34
	177	100,0	172,71	158,23

2.4.6 Mikrovaskulární denzita a proliferační aktivita

Hodnota proliferační aktivity byla zjištěna u všech 177 případů, její průměr činí 26,7 %, medián 21,7 %. Pomocí regresní analýzy byly srovnávány hodnoty proliferační aktivity a MVD, jejich závislost pomocí lineární regrese prokázána nebyla ($P = 0,689$), regresní přímka viz obrázek 25.

Následně byly vytvořeny dvě skupiny případů s hodnotami proliferační aktivity pod a nad 40 %, čítající 145, resp. 32 pacientů. Cut-off 40 % byl vybrán podle ROC analýzy, kde hodnota AUC (area under the curve – plocha pod křivkou) je 0,607. Avšak ani v těchto dvou skupinách nebyl prokázán vliv proliferační aktivity na hodnoty MVD (průměry MVD 167,9 mikrocév/mm² a 194,6 mikrocév/mm², mediány MVD 154,5 mikrocév/mm² a 193,4 mikrocév/mm², Kruskal–Wallisův test – $P = 0,0577$).



Obrázek 25 – bodový graf hodnot proliferační aktivity a MVD s proloženou regresní přímkou

2.4.7 Mikrovaskulární denzita a mezinárodní prognostický index pro lymfom z plášťových buněk

Hodnota MIPI byla zjištěna u 174 případů ze souboru pacientů se známou MVD, průměrná hodnota MIPI je 6,2, medián 6,1. Také u tohoto souboru byl po provedení Coxovy univariátní analýzy prokázán vliv hodnot MIPI na OS ($P < 0,0001$) a PFS ($P < 0,0001$). Shodné výsledky byly získány také při provedení univariátní analýzy pro s-MIPI a MIPI_b.

Dále byla zjišťována závislost hodnot MVD na hodnotách MIPI pomocí regresní analýzy (lineární regrese). V případě MIPI je $P = 0,021$, v případě s-MIPI je $P = 0,013$, u MIPI_b $P = 0,044$ (viz tabulka 20). Prokazujeme tedy závislost hodnot MVD na hodnotách MIPI, s-MIPI i MIPI_b.

Tabulka 20 – korelační tabulka mezi MVD, MIPI, s-MIPI, MIPI_b a proliferační aktivitou s Pearsonovým korelačním koeficientem

		Proliferační aktivita	MIPI	MIPI _b	s-MIPI
Mikrovaskulární denzita	Korelační koeficient	0,03	0,174	0,153	0,187
	Hladina významnosti P	0,689	0,021	0,044	0,013
	Počet případů	177	174	174	174
Proliferační aktivita	Korelační koeficient		0,235	0,616	0,229
	Hladina významnosti P		0,002	< 0,001	0,002
	Počet případů		174	174	174
MIPI	Korelační koeficient			0,91	0,932
	Hladina významnosti P			< 0,001	< 0,001
	Počet případů			174	174
MIPI _b	Korelační koeficient				0,853
	Hladina významnosti P				< 0,001
	Počet případů				174

Dále byly porovnávány skupiny dle MIPI, tedy skupina nízkého, středního a vysokého rizika. Vzhledem k malým rozdílům hodnot MVD mezi skupinou nízkého a středního rizika byly tyto dvě skupiny sloučeny do jedné. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 21.

Tabulka 21 – porovnání hodnot MVD a přežití (OS a PFS) dle skupin rizika podle MIPI, MIPI_b a s-MIPI (pro stanovení vlivu rizikových skupin na OS a PFS použit log-rank test, pro stanovení vlivu skupin dle rizika na MVD Kruskal-Wallisův test)

Riziková skupina dle MIPI	Vysoké riziko	Nízké a střední riziko	
Počet případů (%)	80 (45,2 %)	94 (53,1 %)	
Medián MVD (mikrocévy/mm ²)	191,2	141,5	P = 0,0009
Medián OS (měsíce)	23	68	P < 0,0001
Medián PFS (měsíce)	16	35	P < 0,0001
Riziková skupina dle MIPI_b	Vysoké riziko	Nízké a střední riziko	
Počet případů (%)	100 (57,5 %)	74 (42,5 %)	
Medián MVD (mikrocévy/mm ²)	180,5	149,4	P = 0,0403
Medián OS (měsíce)	23	94	P < 0,0001
Medián PFS (měsíce)	16	41	P < 0,0001
Riziková skupina dle s-MIPI	Vysoké riziko	Nízké a střední riziko	
Počet případů (%)	71 (40,8 %)	103 (59,2 %)	
Medián MVD (mikrocévy/mm ²)	186,5	150,7	P = 0,0154
Medián OS (měsíce)	23	64	P < 0,0001
Medián PFS (měsíce)	16	27	P = 0,0001

2.4.8 Mikrovaskulární denzita a infiltrace kostní dřeně v době diagnózy

U 173 pacientů z 177 máme k dispozici informace ohledně výsledku trepanobiopsie kostní dřeně v době diagnózy. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 22.

Tabulka 22 – vliv infiltrace kostní dřeně v době diagnózy na MVD, MIPI, s-MIPI, MIPI_b, proliferační aktivitu, OS, PFS (analýzy přežití dělány pomocí log-rank testu, ostatní pomocí Kruskal–Wallisova testu)

	Nezjištěna	Zjištěna	
Počet případů (%)	40 (23,1 %)	133 (76,9 %)	
Medián OS (měsíce)	66	41	P = 0,0833
Medián PFS (měsíce)	41	20	P = 0,0443
Medián MVD (mikrocévy/mm ²)	122,8	180,8	P = 0,0001
Medián proliferační aktivity (%)	21,7	21,1	P = 0,7134
Medián MIPI	5,9	6,2	P = 0,0012
Medián MIPI _b	6,5	6,7	P = 0,0299
Medián s-MIPI	4	5	P = 0,0003

2.4.9 Výsledky multivariátní analýzy prognostického vlivu jednotlivých faktorů

Pro porovnání prognostického vlivu jednotlivých faktorů zkoumaných v předchozích kapitolách (MVD, proliferační aktivity, hodnot MIPI, přítomnosti infiltrace kostní dřeně MCL v době diagnózy, agresivních vs. ostatních morfologických variant) byla použita multivariátní Coxova analýza rizik (viz tabulka 23). Bylo vybráno pouze 160 pacientů, u nichž jsou k dispozici kompletní údaje včetně laboratorních výsledků.

Tabulka 23 – výsledky univariátní a multivariátní Coxovy analýzy rizik prognostického vlivu MVD, MIPI, proliferační aktivity, infiltrace kostní dřeně v době diagnózy a cytomorfologické varianty na OS a PFS u 160 pacientů

	Porovnávaná data	Hodnota P u OS		Hodnota P u PFS	
		univariátní	multivariátní	univariátní	multivariátní
Mikrovaskulární denzita	absolutní hodnota	0,2906	0,6670	0,0858	0,6645
MIPI	absolutní hodnota	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0005
Proliferační aktivita	absolutní hodnota	< 0,0001	0,0105	< 0,0001	0,0174
Infiltrace kostní dřeně	zjištěna vs. nezjištěna	0,0587	0,2124	0,0436	0,1487
Cytomorfologická varianta	agresivní vs. ostatní	0,0117	0,2642	0,0044	0,1643

Vzhledem k významnému vlivu MIPI na OS i PFS byla provedena následně multivariátní analýza jednotlivých komponent, z nichž se hodnota vypočítává (viz tabulka 24).

Tabulka 24 – výsledky univariátní a multivariátní Coxovy analýzy rizik vlivu komponent MIPI (stav dle ECOG, věk při diagnóze, hladina leukocytů v krvi ($\times 10^6/l$), poměr laktátdehydrogenázy (LDH) v séru k normě laboratoře) na OS a PFS u 160 pacientů

	Porovnávaná data	Hodnoty P u OS		Hodnoty P u PFS	
		univariátní	multivariátní	univariátní	multivariátní
Stav dle ECOG	absolutní hodnota	< 0,0001	0,0027	< 0,0001	0,0039
Věk	absolutní hodnota	0,0002	< 0,0001	0,0058	0,0033
LDH/norma laboratoře	absolutní hodnota	0,0018	0,0108	0,0014	0,0329
Leukocyty v krvi	absolutní hodnota	0,0150	0,0703	0,0680	0,2252

Do další multivariátní Cox analýzy jsou kromě výše zkoumaných faktorů zahrnuty i laboratorní výsledky nezapočítávané do MIPI (% lymfocytů z leukocytů v periferní krvi, hodnota krevních destiček ($\times 10^9/l$) a hladina hemoglobinu v periferní krvi (g/l)), dále klinické stádium dle Ann Arbor klasifikace, přítomnost systémových B-symptomů a způsob terapie (intenzivní/neintenzivní). Vzhledem k tomu, že u 2 pacientů z tohoto souboru nebyla použita chemoterapie (pouze radioterapie, resp. jen chirurgické řešení), je tato analýza provedena pouze u 158 pacientů. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 25.

Tabulka 25 – výsledky univariátní a multivariátní Coxovy analýzy rizik zahrnující MVD, MIPI, proliferální aktivitu, infiltraci kostní dřeně v době diagnózy, cytomorfológickou variantu, laboratorní výsledky z periferní krve (hladinu hemoglobinu a trombocytů v krvi, procentuální zastoupení lymfocytů z leukocytů), klinické stádium dle Ann Arbor klasifikace, systémové B-symptomy, způsob terapie v závislosti na OS a PFS u 158 pacientů

	Porovnávaná data	Hodnota P u OS		Hodnota P u PFS	
		univariátní	multivariátní	univariátní	multivariátní
Mikrovaskulární denzita	absolutní hodnota	0,2549	0,7505	0,0755	0,6760
MIPI	absolutní hodnota	< 0,0001	0,0066	< 0,0001	0,5206
Proliferační aktivita	absolutní hodnota	< 0,0001	0,0023	< 0,0001	0,0068
Infiltrace kostní dřeně	zjištěna vs. nezjištěna	0,0329	0,2549	0,0268	0,4772
Cytomorfológická varianta	agresivní vs. ostatní	0,0105	0,3260	0,0039	0,1194
Systémové B-symptomy	přítomny vs. nepřítomny	0,0027	0,1150	0,0020	0,0402
Klinické stádium	absolutní hodnota	0,1905	0,7887	0,1267	0,8176
Hladina hemoglobinu v krvi	absolutní hodnota	0,0004	0,6449	< 0,0001	0,2853
Krevní destičky	absolutní hodnota	0,2037	0,4897	0,1199	0,8925
% lymfocytů z leukocytů	absolutní hodnota	0,0065	0,5266	0,0812	0,9850
Typ terapie	intenzivní vs. neintenzivní	0,0283	0,2614	0,0014	0,0040

2.5 Diskuze

Mikrovaskulární denzita (MVD) popisuje míru novotvorby cév. Prognostický vliv hodnot MVD byl popsán jak u solidních nádorů, např. u karcinomu prsu [Uzzan et al. 2004] či prostaty [Bono et al. 2002], tak u hematologických malignit, např. u mnohočetného myelomu [Kumar et al. 2004], Hodgkinova lymfomu [Korkolopoulou et al. 2005], DLBCL [Cardesa-Salzman et al. 2011, Gratzinger et al. 2008]. Přestože některé antiangiogenní léky již byly u MCL uvedeny do praxe (bortezomib, temsirolimus) a další jsou testovány v klinických studiích (lenalidomid, bevacizumab, ibrutinib a jiné) [Ansell et al. 2008, Galimberti et al. 2010, Habermann et al. 2009, Kane et al. 2007, Robak et al. 2015, Ruan et al. 2009, Ruan et al. 2010, Stopeck et al. 2009, Wang et al. 2010, Wang et al. 2012, Zaja et al. 2012], o angiogenezi u MCL je k dispozici jen málo informací. Ostatně jen jedna z prací věnovaných klinickému efektu antiangiogenních léků se věnovala i vlastnímu antiangiogennímu efektu terapie na MCL. Antiangiogenní účinek byl prokázán u temsirolimu s významným poklesem MVD ve vzorku odebraném po léčbě oproti vzorku před terapií [Wang et al. 2010]. Jednalo se však o popis pouze jednoho případu, nikoli o vyhodnocení většího souboru případů. Práce věnovaná popisu MVD u většího množství případů MCL doposud chyběla.

Jediné údaje k porovnání hodnot MVD u MCL byly v pracích věnovaných porovnání hodnot u různých typů lymfomů. Jmenovitě Tzankov zjišťuje nejvyšší hodnoty MVD u DLBCL, následovaného folikulárním lymfomem, a pak MCL a B-CLL/SLL [Tzankov et al. 2007]. Naproti tomu výsledky zjištěné Ridellem ukazují, že nejvyšší hodnota MVD je u B-CLL/SLL, což kontrastuje s významně nižšími hodnotami zjištěnými u agresivnějších lymfomů jako MCL (9 případů) a DLBCL [Ridell et al. 2001]. Pokud porovnáme v jednotlivých pracích absolutní hodnoty MVD u MCL, zjistíme významné rozdíly. V případě Tzankova byla u 19 případů MCL průměrná hodnota MVD 19 mikrocév na $0,57 \text{ mm}^2$, tedy $33,3 \text{ mikrocév/mm}^2$ [Tzankov et al. 2007]. V případě Ridella je u 9 případů MCL průměrná hodnota MVD $71,1 \text{ mikrocév na mm}^2$ [Ridell et al. 2001]. V obou případech je hodnota MVD významně nižší, než byla zjištěna v našem případě (průměrná hodnota $172,71 \text{ mikrocév/mm}^2$). Jako možné vysvětlení těchto velkých rozdílů se nabízí odlišné technické provedení zjišťování MVD. V první studii byla hodnota MVD určována ve dvou vzorcích získaných z původního bločku metodou tkáňových microarray jako počet vaskulárních lumen pozitivních s CD34 [Tzankov et al. 2007]. Ve druhé studii byla MVD zjišťována v 20 mikrofotografiích nejen jako počet vaskulárních struktur s lumen, které jsou pozitivní s CD34, ale také buněčných struktur cytoplazmaticky výrazně pozitivních s CD34 [Ridell et al. 2001]. V naší práci byl započten každý profil endoteliálních buněk pozitivních s CD34 oddělený od přilehlých mikrocév. Hodnota MVD byla určována ve 20 mikrofotografiích. Oproti první uvedené práci [Tzankov et al. 2007] tedy byly v našem případě započteny navíc i elementy bez přítomnosti lumen. V naší práci byla obdobná kritéria jako v druhé uvedené práci [Ridell et al. 2001], shodně byly obě studie hodnoceny počítačovým programem. Přesný důvod rozdílu hodnot MVD mezi oběma studii není zcela jasný. Je možné, že v naší práci bylo započteno více buněk se slabší pozitivitou s CD34, protože Ridell v textu uvádí, že „vágně pozitivní“ jednotlivé buňky započítány nebyly. V našem případě byly počítány všechny i jednotlivé elementy pozitivní s CD34 bez ohledu na intenzitu této positivity. V naší práci je také spočtena největší, a tedy nejrepresentativnější, plocha vzorku ($1,97 \text{ mm}^2$ vs. $0,57 \text{ mm}^2$ [Tzankov et al. 2007] vs. $1,6 \text{ mm}^2$ [Ridell et al. 2001]).

Medián celkového přežití (OS) byl v našem souboru 46 měsíců, obdobné hodnoty byly zjištěny i v dalších populačních studiích pacientů s MCL, kde se medián OS pohyboval mezi

26 a 56 měsíců [Argatoff et al. 1997, Kimura et al. 2010, Rätty et al. 2002, van de Schans et al. 2010]. Vliv hodnot MVD na OS ani PFS pomocí Coxovy analýzy proporcionálních rizik prokázán nebyl ($P = 0,1378$, resp. $0,0628$). Ani v případech, kdy byla hledána mezní hodnota MVD dělící skupiny s lepší a horší prognózou, prognostický vliv pomocí log-rank testu prokázán nebyl. Nejvýraznější byl rozdíl hodnot mezi 4. kvartilem hodnot MVD (případy s MVD vyšší či rovnou $206,6$ mikrocév/mm²) proti zbývajícím 1.–3. kvartilu (MVD do $206,6$ mikrocév/mm²). Medián OS byl u 1.–3. kvartilu hodnot MVD 56 měsíců, u čtvrtého kvartilu 30 měsíců, mediány PFS byly 22 a 18 měsíců. Log-rank testem však statisticky významný rozdíl mezi skupinami prokázán nebyl ($P = 0,0842$, resp. $0,0688$). Prognostický vliv hodnot MVD byl pomocí Coxovy analýzy prokázán pouze u podskupiny pacientů léčených konvenční terapií, a to pouze u OS ($P = 0,0419$), nikoli u PFS ($P = 0,0551$). U případů léčených intenzivní terapií prognostický vliv MVD prokázán nebyl. Důvod tohoto rozdílu není jasný. Na rozdíl od naší studie byly vyšší hodnoty MVD jako negativní prognostický faktor prokázány u některých B-lymfomů, jmenovitě u DLBCL [Cardesa-Salzman et al. 2011, Gratzinger et al. 2008] a u jedné práce věnované MVD u folikulárního lymfomu [Taskinen et al. 2010]. Je zajímavé, že u druhé publikované práce věnované folikulárnímu lymfomu byla naopak s rostoucí MVD zjištěna lepší prognóza pacientů [Koster et al. 2005]. Porovnatelná data u MCL nejsou k dispozici.

Nepřítomnost infiltrace kostní dřeně v době diagnózy je pozitivní prognostický faktor na PFS (medián PFS 41 a 20 měsíců, $P = 0,0443$). U OS i přes rozdíl mediánů obou skupin (66 vs. 41 měsíců) vliv není prokazatelný ($P = 0,0833$). Taktéž dříve publikované výsledky jsou rozporuplné. Pittaluga zjišťuje lepší přežití u pacientů bez přítomnosti infiltrace kostní dřeně [Pittaluga et al. 1996], oproti tomu Argatoff neprokazuje prognostický vliv přítomnosti infiltrace kostní dřeně na svých 80 pacientech s MCL [Argatoff et al. 1997]. Pokud porovnáme hodnoty MVD u našich extramedulárních případů MCL, u nichž byla, či nebyla prokázána infiltrace kostní dřeně v době diagnózy, je patrné, že případy bez infiltrace kostní dřeně mají významně nižší hodnoty MVD (medián MVD $122,8$ mikrocév/mm² a $180,8$ mikrocév/mm², $P = 0,0001$). Tato zjištění svědčí o tom, že případy s vyšší MVD se chovají agresivněji, avšak příčina tohoto chování není jasná. Vztah MVD a infiltrace kostní dřeně zatím nebyl u lymfomů zkoumán. Výjimkou je pouze popis šesti případů MCL, u nichž byla zjištěna vyšší hodnota MVD v kostní dřeni po terapii lenalidomidem ve srovnání se stavem před léčbou ($P = 0,033$). Jako příčinu tohoto stavu autoři uvádějí nepřímou angiogenezi při aktivaci makrofágů pomocí lenalidomidu [Zaja et al. 2012]. Taktéž případy s infiltrací kostní dřeně mají významně vyšší hodnoty MIPI, což platí i pro varianty MIPI_b a s-MIPI. Překvapivé je, že není přítomna také korelace s proliferační aktivitou. Naopak medián je u 40 případů bez infiltrace kostní dřeně nevýznamně vyšší ($21,7\%$ a $21,1\%$), stejně jako průměr ($28,1\%$ vs. $26,3\%$).

Z výsledků je patrné, že u hodnot MVD je při porovnání podle skupin vysokého vs. skupinou nízkého a středního rizika stanoveného dle MIPI, MIPI_b a s-MIPI významný rozdíl. S ohledem na fakt, že index MIPI, včetně jeho variant, je významným prognostickým faktorem přežití pacientů, tento výsledek nepřímo ukazuje na negativní prognostický vliv vysokých hodnot MVD u MCL. Vyšší hodnoty MVD také korelují s jednotlivými komponentami, z nichž se MIPI vypočítává. Konkrétně se jedná o vyšší leukocytózu, hladinu LDH a horší hodnocení stavu dle ECOG. Proti tomu u věku nad a pod 60 let rozdíl není významný. Avšak již u věkové hranice 55 let je rozdíl významný ($P = 0,003$), medián MVD u pacientů do 54 let včetně (32 případů) činí 173 mikrocév/mm², zatímco u pacientů od 55 let výše (145 případů) je $147,6$ mikrocév/mm², průměry jsou $208,3$ mikrocév/mm² a $164,9$ mikrocév/mm².

Naopak u proliferační aktivity závislost s hodnotami MVD prokázána nebyla

($P = 0,689$), a to ani při rozdělení na skupinu do a nad 40 % ($P = 0,0577$), což se dle ROC analýzy jeví jako nevhodnější rozdělení. Oproti tomu Tzankov u série 266 B-lymfomů zjišťuje korelaci mezi proliferační aktivitou a MVD, avšak data přímo k jednotlivým lymfomům včetně zkoumaných 19 případů MCL neuvádí [Tzankov et al. 2007]. Z jednotlivých hematologických malignit byl vztah MVD k proliferační aktivitě zkoumán pouze u mnohočetného myelomu, kde byl prokázán [Alexandrakis et al. 2004].

Nebyl prokázán vztah mezi hodnotami MVD a cytomorfológickými variantami (agresivní x ostatní), ani MVD a architektonickými variantami, ani nebyly zjištěny významné rozdíly v hodnotách MVD s ohledem na lokalizaci vzorku. V tomto ohledu nejsou k dispozici žádná data ke srovnání.

Z výsledků multivariátní analýzy je patrné, že na OS má vliv proliferační aktivita a MIPI, na PFS navíc ještě cytomorfológická varianta (agresivní/ostatní), typ terapie (intenzivní vs. konvenční) a přítomnost systémových B-symptomů. V případě univariátní analýzy mají statisticky významný vliv na OS i PFS mimo proliferační aktivity a MIPI také cytomorfológická varianta, infiltrace kostní dřeně v době diagnózy, systémové B-symptomy, hladina hemoglobinu v krvi a typ terapie, pouze u OS navíc ještě hodnota procentuálního zastoupení lymfocytů v leukocytech.

Z výsledků multivariátní analýzy je zřejmé, že nejvýznamnějšími prognostickými faktory u lymfomu z plášt'ových buněk je proliferační aktivita a MIPI, u nichž byl prokázán vliv na OS i PFS. Výsledky jiných multivariátních analýz jsou rozporuplné, protože multivariátní analýzou byl vliv MIPI na OS potvrzen [Romaguera et al. 2010] i vyvrácen [Schaffel et al. 2010] a podobné je to i u proliferační aktivity, kde byl vliv prokázán [Geisler et al. 2008, Rätý et al. 2002, Schaffel et al. 2010] i nepotvrzen [Schrader et al. 2004, Tiemann et al. 2005]. To, že agresivní varianty MCL mají horší prognózu, je očekávatelné nejen vzhledem k jejich názvu, ale také proto, že tyto případy mají většinou i vyšší proliferační aktivitu (medián 64 %, rozptyl 18–76 %). Podobně i zde se výsledky multivariátních analýz vlivu na celkové přežití rozcházejí a zatímco Geisler [Geisler et al. 2008] vliv agresivních variant potvrzuje, ostatní práce jej vyvracejí [Rätý et al. 2002, Romaguera et al. 2010, Tiemann et al. 2005].

Další možné prognostické faktory zjištěné pomocí univariátní analýzy odpovídají pokročilejšímu onemocnění pacienta, jmenovitě se jedná o přítomnost systémových B-symptomů (horečka nad 38°C, úbytek hmotnosti více jak 10 % v posledních 6 měsících, zvýšené pocení obzvláště v noci), procentuální zastoupení lymfocytů z leukocytech, infilraci kostní dřeně v době diagnózy a hladinu hemoglobinu v krvi. Zatímco v našem souboru byl negativní prognostický vliv přítomnosti B-symptomů prokázán u univariátní analýzy u OS i PFS a u multivariátní analýzy u PFS, Tiemann [Tiemann et al. 2005] jej popisuje pouze u OS u univariátní analýzy, zatímco Schrader [Schrader et al. 2004] jej nepotvrzuje. Infiltrace kostní dřeně souvisí s hladinou hemoglobinu v krvi, protože při rozsáhlejší infilraci kostní dřeně dochází k redukci krvetvorby červené řady. Výrazně nižší hodnoty P u hladiny hemoglobinu v krvi jsou nejspíše proto, že nízká hladina hemoglobinu se projeví až při rozsáhlejší infilraci kostní dřeně, tedy při pokročilejším onemocnění, zatímco při trepanobiopsii se u části případů zjistí nodulární či intersticiální infiltrace kostní dřeně, kde krvetvorba ještě není významněji postižena. Také hodnoty hladiny hemoglobinu v krvi jsou u pacientů bez postižení kostní dřeně významně vyšší. Konkrétně medián hodnot hemoglobinu v krvi u 123 případů s infilrací kostní dřeně je 123 g/l, rozptyl 5–170 g/l, u 37 případů bez infiltrace kostní dřeně je medián 141 g/l, rozptyl 102–162 g/l, $P = 0,0001$ dle Kruskal–Wallisova testu. Podobně při zjištění lymfocytózy v periferní krvi se jedná již o leukemizaci MCL, tedy o pokročilejší onemocnění. Avšak klinické stádium dle Ann Arbor klasifikace nemá dle našich výsledků, na rozdíl od dřívější práce [Rätý et al. 2002], na OS

ani PFS významnější vliv, přestože popisuje rozsah postižení organismu lymfomem.

Podle očekávání, agresivnější terapie dosahuje lepších výsledků. Při porovnání obou těchto skupin případů je patrné, že zatímco proliferační aktivita a mikrovaskulární denzita se významněji neliší, hodnoty MIPI jsou významněji nižší u pacientů, kteří byli léčeni intenzivní chemoterapií (mediány hodnot MIPI jsou 5,8 a 6,3, $P < 0,0001$). U celkového přežití (OS) a PFS je patrné, že prognóza pacientů léčených intenzivní chemoterapií je významně lepší ($P = 0,0169$, resp. $0,0001$). Tyto výsledky potvrzují vyšší účinnost intenzivní léčby. Ovšem nelze spolehlivě odpovědět na otázku, nakolik je významně lepší přežití u těchto pacientů v našem souboru ovlivněno pouze vyšší efektivitou vlastní terapie a jaký případný podíl na tom měl v našem souboru výrazně lepší prognostický faktor MIPI.

2.6 Závěr

Mikrovaskulární denzita byla zjišťována u 177 preterapeutických histologických vzorků s lymfomem z pláštěvých buněk, které byly z jiné lokalizace než z kostní dřeni. Jednalo se vůbec o první rozsáhlejší studii věnovanou mikrovaskulární denzitě v MCL. V našem souboru:

- Nebyl prokázán prognostický vliv MVD na OS ani PFS. Pouze u pacientů léčených konvenční (neintenzivní) terapií byl prokázán vliv hodnot MVD na celkové přežití.
- Je významně vyšší hodnota MVD u případů, u nichž byla zjištěna infiltrace lymfomem z pláštěvých buněk v kostní dřeni.
- Byla prokázána závislost hodnot MVD na MIPI, včetně variant MIPI_b a s-MIPI.
- Nebyl prokázán vztah MVD k proliferační aktivitě, cytomorfologické či architektonické variantě.
- Nebyl prokázán vliv primární lokalizace vzorku na hodnoty MVD.
- V multivariátní analýze byl prokázán vliv proliferační aktivity a MIPI na OS i PFS, u PFS také vliv cytomorfologické varianty (agresivní/ostatní), typu terapie a přítomnosti systémových B-symptomů.

Z uvedených závěrů je patrné, že mikrovaskulární denzita se v našem souboru neukázala jako vhodný prognostický marker pro lymfom z pláštěvých buněk. Podle multivariátní analýzy jsou nejvýznamnějšími prognostickými faktory tohoto lymfomu proliferační aktivita a mezinárodní prognostický index pro lymfom z pláštěvých buněk MIPI.

Použitá literatura

- ABBOUDI, Zaid, Ketan PATEL a Kikkeri N. NARESH. Cyclin D1 expression in typical chronic lymphocytic leukaemia. *European Journal of Haematology*. 2009, **83**(3), 203–207. ISSN 0902-4441.
- ADAM, Patrick, Ana-Iris SCHIEFER, Sophie PRILL et al. Incidence of preclinical manifestations of mantle cell lymphoma and mantle cell lymphoma in situ in reactive lymphoid tissues. *Modern Pathology*. 2012, **25**(12), 1629–1636. ISSN 0893-3952.
- ALEXANDRAKIS, M.G., F.H. PASSAM, C. DAMBAKI, C.A. PAPPA a E.N. STATHOPOULOS. The relation between bone marrow angiogenesis and the proliferation index Ki-67 in multiple myeloma. *Journal of Clinical Pathology*. 2004, **57**, 856–860. ISSN 0021-9746.
- AL-KAWAAZ, Mustafa, Susan MATHEW, Yifang LIU et al. Cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma with IGH-CCND1 translocation and BCL6 rearrangement: a report of two cases. *American Journal of Clinical Pathology*. 2015, **143**, 288–299. ISSN 0002-9173.
- ALVAREZ-ARGOTE, Juliana, Frank A. BAUER a Constantin A. DASANU. CD5 negative mantle cell lymphoma: a different clinical entity? *Connecticut Medicine*. 2014, **78**(4), 211–214. ISSN 0010-6178.
- AMBINDER, Alexander J., Pareen J. SHENOY, Loretta J. NASTOUPIL a Christopher R. FLOWERS. Using primary site as a predictor of survival in mantle cell lymphoma. *Cancer*. 2013, **119**, 1570–1577. ISSN 0008-543x.
- ANSELL, Stephen M., David J. INWARDS, Kendrith M. ROWLAND Jr. et al. Low-dose, single-agent temsirolimus for relapsed mantle cell lymphoma: a phase 2 trial in the North Central Cancer Treatment Group. *Cancer*. 2008, **113**, 508–514. ISSN 0008-543x.
- ANTIC, Darko, Maja Perunicic JOVANOVIC, Marija Dencic FEKETE a Vladan COKIC. Assessment of bone marrow microvessel density in chronic lymphocytic leukemia. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2010, **18**(4), 353–356. ISSN 1533-4058.
- AQEL, N., F. BARKER, K. PATEL a K. N. NARESH. In-situ mantle cell lymphoma - a report of two cases. *Histopathology*. 2008, **52**(2), 256–260. ISSN 0309-0167.
- AQUINO, Gabriella, Renato FRANCO, Fioravante RONCONI et al. Peripheral T-cell Lymphoma with Cyclin D1 overexpression: a case report. *Diagnostic Pathology*. 2012, **7**, 79. ISSN 1746-1596.
- ARGATOFF, Larry H., Joseph M. CONNORS, Richard J. KLASA, Douglas E. HORSMAN a Randy D. Gascoyne. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood*. 1997, **89**(6), 2067–2078. ISSN 0006-4971.
- BAHETI, Akshay D., Sree Harsha TIRUMANI, Rani SEWATKAR, Saboo S. SACHIN, Atul B. SHINAGARE a Nikhil H. RAMAIYA. MDCT of extranodal mantle cell lymphoma: a single institute experience. *Abdominal Imaging*. 2015, **40**(6), 1693–1699. ISSN 0942-8925.
- BELAUD-ROTUREAU, Marc-Antoine, Marie PARRENS, Pierre DUBUS, Jean-Christophe GARROSTE, Antoine de MASCAREL a Jean-Philippe MERLIO. A comparative analysis of FISH, RT-PCR, PCR, and immunohistochemistry for the diagnosis of mantle cell lymphomas. *Modern Pathology*. 2002, **15**(5), 517–525. ISSN 0893-3952.

- BONATZ, Gabriele, Jutta LÜTTGES, Jürgen HEDDERICH, Walter JONAT, Pierre RUDOLPH a Reza PARWARESCH. Prognostic significance of a novel proliferation marker, anti-repp 86, for endometrial carcinoma: A multivariate study. *Human Pathology*. 1999, **30**(8), 949–956. ISSN 0046-8177.
- BONO, A. V., N. CELATO, V. COVA, M. SALVADORE, S. CHINETTI a R. NOVARIO. Microvessel density in prostate carcinoma. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 2002, **5**, 123–127. ISSN 1365-7852.
- BRAWER, Michael K., Robert E. DEERING, Marianne BROWN, Steven D. PRESTON a Steven A. BIGLER. Predictors of pathologic stage in prostatic carcinoma. The role of neovascularity. *Cancer*. 1994, **73**, 678–687. ISSN 0008-543x.
- BUDDE, Lihua E., Katherine A. GUTHRIE, Brian G. TILL et al. Mantle cell lymphoma international prognostic index but not pretransplantation induction regimen predicts survival for patients with mantle-cell lymphoma receiving high-dose therapy and autologous stem-cell transplantation. *Journal of Clinical Oncology*. 2011, **29**(22), 3023–3029. ISSN 0732-183x.
- CAMACHO, Emma, Luis HERNÁNDEZ, Silvia HERNÁNDEZ et al. ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood*. 2002, **99**, 238–244. ISSN 0006-4971.
- CARDESA-SALZMANN, Teresa M., Luis COLOMO, Gonzalo GUTIERREZ et al. High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy. *Haematologica*. 2011, **96**(7), 996–1001. ISSN 0390-6078.
- CARVAJAL-CUENCA, Alejandra, Luz F. SUA, Nhora M. SILVA et al. In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. *Haematologica*. 2012, **97**(2), 270–278. ISSN 0390-6078.
- CONCATO, John, Dhanpat JAIN, Edward UCHIO, Harvey RISCH, William W. LI a Carolyn K. WELLS. Molecular markers and death from prostate cancer. *Annals of Internal Medicine*. 2009, **150**, 595–603. ISSN 0003-4819.
- CORDES, Christian, Ann-Kristin MÜNDEL, Tibor GÖRÖGH et al. Prognostic relevance of the proliferation marker REPP86 for laryngeal cancer. *Anticancer Research*. 2010, **30**(9), 3541–3547. ISSN 0250-7005.
- CORTELAZZO, Sergio, Maurilio PONZONI, Andres J.M. FERRERI a Dieter HOELZER. Lymphoblastic lymphoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2011, **79**(3), 330–343. ISSN 1040-8428.
- DE PAZ, Nayra Merino, Marina RODRÍGUEZ-MARTÍN, Patricia Contreras FERRER et al. Cutaneous lesions as presentation form of mantle cell lymphoma. *Dermatology Reports*. 2011, **3**, e51. ISSN 2036-7406.
- DETERMANN, Olaf, Eva HOSTER, German OTT et al. Ki-67 predicts outcome in advanced-stage mantle cell lymphoma patients treated with anti-CD20 immunochemotherapy: results from randomized trials of the European MCL Network and the German Low Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 2008, **111**(4), 2385–2387. ISSN 0006-4971.
- DICTOR, Michael, Sara EK, Maria SUNDBERG et al. Strong lymphoid nuclear expression of SOX11 transcription factor defines lymphoblastic neoplasms, mantle cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *Haematologica*. 2009, **94**(11), 1563–1568. ISSN 0390-6078.
- DOUSSIS-ANAGNOSTOPOULOU, Ipatia A., Theodoros P.VASSILAKOPOULOS, Irini

- THYMARA et al. Topoisomerase II α expression as an independent prognostic factor in Hodgkin's lymphoma. *Clinical Cancer Research*. 2008, **14**(6), 1759–1766. ISSN 1078-0432.
- DREYLING, Martin, Georg LENZ, Eva HOSTER et al. Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood*. 2005, **105**(7), 2677–2684. ISSN 0006-4971.
- EBERHARD, Anne, Sebastian KAHLERT, Valentin GOEDE, Bernhard HEMMERLEIN, Karl H. PLATE a Hellmut G. AUGUSTIN. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Research*. 2000, **60**(5), 1388–1393. ISSN 0008-5472.
- EDLEFSEN, Kerstin L., Harvey A. GREISMAN, Hye Son YI, Kristin M. MANTEI a Jonathan R. FROMM. Early lymph node involvement by mantle cell lymphoma limited to the germinal center: report of a case with a novel "follicular in situ" growth pattern. *American Journal of Clinical Pathology*. 2011, **136**(2), 276–281. ISSN 0002-9173.
- EHINGER, Mats, Johan LINDEROTH, Birger CHRISTENSSON, Birgitta Sander a Eva Cavallin-Stahl. A subset of CD5- diffuse large B-cell lymphomas expresses nuclear cyclin D1 with aberrations at the CCND1 locus. *American Journal of Clinical Pathology*. 2008, **129**(4), 630–638. ISSN 0002-9173.
- FERNÁNDEZ, Verónica, Olga SALAMERO, Blanca ESPINET et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Research*. 2010, **70**(4), 1408–1418. ISSN 0008-5472.
- FERRARA, Napoleone, Hans-Peter GERBER a Jennifer LECOUTER. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*. 2003, **9**(6), 669–676. ISSN 1078-8956.
- FERRER, Ana, Itziar SALAVERRIA, Francesc BOSCH et al. Leukemic involvement is a common feature in mantle cell lymphoma. *Cancer*. 2007, **109**(12), 2473–2480. ISSN 0008-543x.
- FERRER, A., F. BOSCH, N. VILLAMOR et al. Central nervous system involvement in mantle cell lymphoma. *Annals of Oncology*. 2008, **19**, 135–141. ISSN 0923-7534.
- FERRY, Judith A. Extranodal lymphoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2008, **132**, 565–578. ISSN 0003-9985.
- FOLKMAN, Judah. Tumor angiogenesis factor. *Cancer Research*. 1974, **34**, 2109–2113. ISSN 0008-5472.
- FOX, Stephen B., Russel D. LEEK, Michael P. WEEKES, Ruth M. WHITEHOUSE, Kevin C. GATTER a Adrian L. HARRIS. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, chalkley count, and computer image analysis. *The Journal of Pathology*. 1995, **177**(3), 275–283. ISSN 0022-3417.
- FOX, Stephen B. a Adrian L. HARRIS. Histological quantitation of tumour angiogenesis. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 2004, **112**(7-8), 413–30. ISSN 0903-4641.
- FU, Kai, Dennis D. WEISENBURGER, Timothy C. GREINER et al. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*. 2005, **106**, 4315–4321. ISSN 0006-4971.
- GALIMBERTI, S. a M. PETRINI. Temsirolimus in the treatment of relapsed and/or refractory mantle cell lymphoma. *Cancer Management and Research*. 2010, **2**, 181–189. ISSN 1179-1322.

- GARCIA, Mar, Jorge E. ROMAGUERA, Kedar V. INAMDAR, George Z. RASSIDAKIS a L. Jeffrey MEDEIROS. Proliferation predicts failure-free survival in mantle cell lymphoma patients treated with rituximab plus hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. *Cancer*. 2009, **115**, 1041–1048. ISSN 0008-543x.
- GEISLER, Christian H., Arne KOLSTAD, Anna LAURELL et al. Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in vivo -purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group. *Blood*. 2008, **112**, 2687–2693. ISSN 0006-4971.
- GEISLER, Christian H., Arne KOLSTAD, Anna LAURELL et al. The mantle cell lymphoma international prognostic index (MIPI) is superior to the international prognostic index (IPI) in predicting survival following intensive first-line immunochemotherapy and autologous stem cell transplantation (ASCT). *Blood*. 2010, **115**(8), 1530–1533. ISSN 0006-4971.
- GEISSMANN, Frédéric, Agnes RUSKONÉ-FOURMESTRAUX, Olivier HERMINE et al. Homing receptor $\alpha 4\beta 7$ integrin expression predicts digestive tract involvement in mantle cell lymphoma. *The American Journal of Pathology*. 1998, (153), 1701–1705. ISSN 0097-3599.
- GOLARDI, Natalia, Mario R. VELASCO a M. Tarek ELGHETANY. Marginal zone variant of mantle cell lymphoma: CD5-negative cyclin D1-positive variant posing a diagnostic dilemma. *Pathology International*. 2009, **59**(5), 317–321. ISSN 1320-5463.
- GRADOWSKI, Joel F., Rachel L. SARGENT, Fiona E. CRAIG et al. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma with cyclin D1 positive proliferation centers do not have CCND1 translocations or gains and lack SOX11 expression. *American Journal of Clinical Pathology*. 2012, **138**(1), 132–139. ISSN 0002-9173.
- GRATZINGER, Dita, Shuchun ZHAO, Robert J. TIBSHIRANI et al. Prognostic significance of VEGF, VEGF receptors, and microvessel density in diffuse large B cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy. *Laboratory Investigation*. 2008, **88**, 38–47. ISSN 0023-6837.
- GREINER, Timothy C., Michael J. MOYNIHAN, Wing C. CHAN et al. p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood*. 1996, **87**, 4302–4310. ISSN 0006-4971.
- GUNDERSEN, H. J. G. Notes on the estimation of numerical density of arbitrary particles. The edge effects. *Journal of Microscopy*. 1977, **111**, 219–223. ISSN 0022-2720.
- GUNDERSEN, H. J. G. a E. B. JENSEN. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*. 1987, **147**, 229–263. ISSN 0022-2720.
- HABERMANN, Thomas M., Izidore S. LOSSOS, Glen JUSTICE et al. Lenalidomide oral monotherapy produces a high response rate in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *British Journal of Haematology*. 2009, **145**(3), 344–349. ISSN 0007-1048.
- HARTMANN, Elena, Veronica FERNANDEZ, Victor MORENO et al. Five-gene model to predict survival in mantle-cell lymphoma using frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Journal of Clinical Oncology*. 2008, **26**(30), 4966–4972. ISSN 0732-183x.
- HASHIMOTO, Yoshinori, Hiromi OMURA, Takayuki TANAKA, Norihiko HINO a Shu

- NAKAMOTO. CD5-negative mantle cell lymphoma resembling extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue: a case report. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*. 2012, **52**(3), 185–191. ISSN 1346-4280.
- HEIMANN, Ruth, Donald FERGUSON, Claire POWERS, Wendy M. RECANT, Ralph R. WEICHSELBAUM a Samuel HELLMAN. Angiogenesis as a predictor of long-term survival for patients with node-negative breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996, **88**, 1764–1769. ISSN 0027-8874.
- HLATKY, Lynn, Philip HAHNFELDT a Judah FOLKMAN. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002, **94**(12), 883–893. ISSN 0027-8874.
- HOSTER, Eva, Martin DREYLING, Wolfram KLAPPER et al. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008, **111**, 558–565. ISSN 0006-4971.
- HOSTER, Eva, Wolfram KLAPPER, Olivier HERMINE et al. Confirmation of the mantle-cell lymphoma international prognostic index in randomized trials of the European mantle-cell lymphoma network. *Journal of Clinical Oncology*. 2014, **32**(13), 1338–1346. ISSN 0732-183x.
- HOSTER, Eva, Andreas ROSENWALD, Françoise BERGER et al. Prognostic value of Ki-67 index, cytology, and growth pattern in mantle-cell lymphoma: results from randomized trials of the European mantle cell lymphoma network. *Journal of Clinical Oncology [online]*. 2016, **2016 Feb 29**, JCO638387. [Epub ahead of print]. ISSN 0732-183x.
- HUNT, K. E., K. K. REICHARD a C. S. WILSON. Mantle cell lymphoma lacking the t(11;14) translocation: a case report and brief review of the literature. *Journal of Clinical Pathology*. 2008, **61**, 869–870. ISSN 0021-9746.
- CHALKLEY, H. W. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *Journal of National Cancer Institute*, 1943, **4**(1), s. 47–53. ISSN 0027-8874.
- CHANTRAIN, Christophe F., Yves A. DECLERCK, Susan GROSHEN a George MCNAMARA. Computerized quantification of tissue vascularization using high-resolution slide scanning of whole tumor sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2003, **51**(2), 151–158. ISSN 0022-1554.
- CHEN, Yi-Hua, Juehua GAO, Guang FAN a LoAnn C. PETERSON. Nuclear expression of SOX11 is highly associated with mantle cell lymphoma but is independent of t(11;14)(q13;q32) in non-mantle cell B-cell neoplasms. *Modern Pathology*. 2010, **23**, 105–112. ISSN 0893-3952.
- CHIARLE, Roberto, Leo M. BUDEL, Jeffrey SKOLNIK et al. Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2000, **95**, 619–626. ISSN 0006-4971.
- INTERNATIONAL NON-HODGKIN'S LYMPHOMA PROGNOSTIC FACTORS PROJECT. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 1993, **329**(14), 987-994. ISSN 0028-4793.
- IOACHIM, Harry L. a L. Jeffrey MEDEIROS. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. In *Ioachim's lymph node pathology, 4th edition*. Editor. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008a, 352–361. ISBN 978-0-7817-7596-0.
- IOACHIM, Harry L. a L. Jeffrey MEDEIROS. Mantle cell lymphoma. In *Ioachim's lymph node pathology, 4th edition*. Editor. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,

- 2008b, 407–422. ISBN 978-0-7817-7596-0.
- IQBAL, Javed, Yulei SHEN, Yanyan LIU et al. Genome-wide miRNA profiling of mantle cell lymphoma reveals a distinct subgroup with poor prognosis. *Blood*. 2012, **119**(21), 4939–4948. ISSN 0006-4971.
- JORGENSEN, J. M., F. B. SORENSEN, K. BENDIX et al. Angiogenesis in non-Hodgkin's lymphoma: clinico-pathological correlations and prognostic significance in specific subtypes. *Leukemia & Lymphoma*. 2007, **48**(3), 584–595. ISSN 1042-8194.
- JUSKEVICIUS, Darius, Christian RUIZ, Stephan DIRNHOFER a Alexandar TZANKOV. Clinical, morphologic, phenotypic, and genetic evidence of cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphomas with CYCLIN D1 gene rearrangements. *American Journal of Surgical Pathology*. 2014, **38**(5), 719–727. ISSN 0147-5185.
- KANE, Robert C., Ramzi DAGHER, Ann FARRELL et al. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clinical Cancer Research*. 2007, **13**, 5291–5294. ISSN 1078-0432.
- KAŠPAROVÁ, P. a L. SMOLEJ. Angiogeneze v kostní dřeni u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií. *Česko-slovenská patologie*. 2007, **43**(2), 50–58. ISSN 1210-7875.
- KELEMEN, Katalin, LoAnn C. PETERSON, Irene HELENOWSKI et al. CD23+ mantle cell lymphoma: a clinical pathologic entity associated with superior outcome compared with CD23- disease. *American Journal of Clinical Pathology*. 2008, **130**(2), 166–177. ISSN 0002-9173.
- KELKITLI, Engin, Hilmi ATAY, Levent YILDIZ, Ahmet BEKTAŞ a Mehmet TURGUT. Mantle cell lymphoma mimicking rectal carcinoma. *Case Reports in Hematology* [electronic resource]. 2014, **2014**, 621017. ISSN 2090-6560.
- KIMURA, Yoshizo, Kensaku SATO, Fumiko ARAKAWA et al. Mantle cell lymphoma shows three morphological evolutions of classical, intermediate, and aggressive forms, which occur in parallel with increased labeling index of cyclin D1 and Ki-67. *Cancer Science*. 2010, **101**, 806–814. ISSN 1347-9032.
- KLAPPER, Wolfram, Eva HOSTER, Olaf DETERMANN et al. Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma—consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *Journal of Hematopathology*. 2009, **2**, 103–111. ISSN 1868-9256.
- KLENER, Pavel. Angiogeneze jako součást nádorového „ekosystému“ a možnosti jejího ovlivnění. *Klinická onkologie*. 2010, **23**(1), 14–20. ISSN 0862-495X.
- KLUIN-NELEMANS, H.C., E. HOSTER, O. HERMINE et al. Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2012, **367**(6), 520–531. ISSN 0028-4793.
- KORKOLOPOULOU, P. a T. P. VASSILAKOPOULOS. Topoisomerase II alfa as a prognostic factor in mantle cell lymphoma. *Leukemia*. 2004, **18**, 1347–1349. ISSN 0887-6924.
- KORKOLOPOULOU, P., I. THYMARA, N. KAVANTZAS et al. Angiogenesis in Hodgkin's lymphoma: a morphometric approach in 286 patients with prognostic implications. *Leukemia*. 2005, **19**, 894–900. ISSN 0887-6924.
- KOSTER, Ad, Joannes H. J. M. VAN KRIEKEN, Marius A. MACKENZIE et al. Increased vascularization predicts favorable outcome in follicular lymphoma. *Clinical Cancer Research*. 2005, **11**, 154–161. ISSN 1078-0432.
- KRAMS, Matthias, Hans-Juergen HEIDEBRECHT, Barbara HERO et al. Repp86 expression and outcome in patients with neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2003, **21**, 1810–1818. ISSN 0732-183x.

- KUMAR, S., M. A. GERTZ, A. DISPENZIERI et al. Prognostic value of bone marrow angiogenesis in patients with multiple myeloma undergoing high-dose therapy. *Bone Marrow Transplantation*. 2004, **34**, 235–239. ISSN 0268-3369.
- KUMAR, Shant, Ashur GHELLAL, Cheng LI et al. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Research*. 1999, **59**, 856–861. ISSN 0008-5472.
- LASOTA, J., K. FRANSSILA, C. H. KOO a M. MIETTINEN. Molecular diagnosis of mantle cell lymphoma in paraffin-embedded tissue. *Modern Pathology*. 1996, **9**(4), 361–6. ISSN 0893-3952.
- LENZ, Georg, Martin DREYLING, Eva HOSTER et al. Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Journal of Clinical Oncology*. 2005, **23**(9), 1984–1992. ISSN 0732-183x.
- LI, C., R. GARDY, B. K. SEON et al. Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis. *British Journal of Cancer*. 2003, **88**, 1424 – 1431. ISSN 0007-0920.
- LI, Yanyan, Xuelei MA, Xi WU, Xiaoxiao LIU a Lei LIU. Prognostic significance of survivin in breast cancer: meta-analysis. *The Breast Journal*. 2014, **20**(5), 514–524. ISSN 1075-122x.
- LIU, Hui, Wei WANG, Guilin TANG et al. Lymphomatous variant of hairy cell leukaemia: a distinctive presentation mimicking low-grade B-cell lymphoma. *Histopathology*. 2015, **67**, 740–745. ISSN 0309-0167.
- LIU, Wenbo, Jiying XU, Mingming WANG, Qiangxiu WANG, Yuli BI a Mingyong HAN. Tumor-derived vascular endothelial growth factor (VEGF)-a facilitates tumor metastasis through the VEGF-VEGFR1 signaling pathway. *International Journal of Oncology*. 2011, **39**(5), 1213–1220. ISSN 1019-6439.
- LIU, Yuan An, SHIEN Tung Pan, YUNG Chi Hou et al. 3-D visualization and quantitation of microvessels in transparent human colorectal carcinoma. *PLoS one*. 2013, **8**(11), e81857. ISSN 1932-6203.
- LIU, Zach, Henry Y. DONG, Wojciech GORCZYCA et al. CD5– Mantle Cell Lymphoma. *American Journal of Clinical Pathology*. 2002, **118**, 216–224. ISSN 0002-9173.
- LUCIONI, Marco, Francesca NOVARA, Roberta RIBONI et al. CD5(-) diffuse large B-cell lymphoma with peculiar cyclin D1+ phenotype. Pathologic and molecular characterization of a single case. *Human Pathology*. 2011, **42**(8), 1204–1208. ISSN 0046-8177.
- MAJLIS, Alejandro, William C. PUGH, Maria A. RODRIGUEZ, William F. BENEDICT a Fernando CABANILLAS. Mantle cell lymphoma: correlation of clinical outcome and biologic features with three histologic variants. *Journal of Clinical Oncology*. 1997, **15**, 1664–1671. ISSN 0732-183x.
- MANSOOR, Adnan, Majid AKBARI, Iwona AUER a Raymond LAI. Cyclin D1 and t(11;14)-positive B-cell neoplasms resembling marginal zone B-cell lymphoma: a morphological variant of mantle cell lymphoma. *Human Pathology*. 2007, **38**(5), 797–802. ISSN 0046-8177.
- MAO, Xin, Guy ORCHARD, Eric C. VONDERHEID et al. Heterogeneous abnormalities of CCND1 and RB1 in primary cutaneous T-cell lymphomas suggesting impaired cell cycle control in disease pathogenesis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006,

- 126(6)**, 1388–1395. ISSN 0022-202X.
- MARKOVIC, O., D. MARISAVLJEVIC, V. CEMERIKIC-MARTINOVIC et al. Survivin expression in patients with newly diagnosed nodal diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *Medical Oncology*. 2012, **29(5)**, 3515–3521. ISSN 1357-0560.
- MARTIN, Peter, Morton COLEMAN a John P. LEONARD. Progress in mantle-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2009, **27(4)**, 481–483. ISSN 0732-183x.
- MARTINEZ, Antonio, Beatriz BELLOSILLO, Francesc BOSCH et al. Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. *The American Journal of Pathology*. 2004, **164**, 501–510. ISSN 0097-3599.
- MATUTES, E., N. PARRY-JONES, V. BRITO-BABAPULLE et al. The leukemic presentation of mantle-cell lymphoma: disease features and prognostic factors in 58 patients. *Leukemia & Lymphoma*. 2004, **45(10)**, 2007–2015. ISSN 1042-8194.
- METCALF, Ryan A., Shuchun ZHAO, Matthew W. ANDERSON et al. Characterization of D-cyclin proteins in hematolymphoid neoplasms: lack of specificity of cyclin-D2 and D3 expression in lymphoma subtypes. *Modern Pathology*. 2010, **23**, 420–433. ISSN 0893-3952.
- MOLINA, Thierry J., Alain DELMER, Florence CYMBALISTA et al. Mantle cell lymphoma, in leukaemic phase with prominent splenomegaly. A report of eight cases with similar clinical presentation and aggressive outcome. *Virchows Archiv*. 2000, **437**, 591–598. ISSN 0945-6317.
- MOZOS, Ana, Cristina ROYO, Elena HARTMANN et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica*. 2009, **94(11)**, 1555–1562. ISSN 0390-6078.
- MØLLER, M. B., N. T. PEDERSEN a B. E. CHRISTENSEN. Mantle cell lymphoma: prognostic capacity of the Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *British Journal of Haematology*. 2006, **133**, 43–49. ISSN 0007-1048.
- NAKASHIMA, Megan O., Lisa DURKIN, Juraj BODO et al. Utility and diagnostic pitfalls of SOX11 monoclonal antibodies in mantle cell lymphoma and other lymphoproliferative disorders. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology: AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*. 2014, **22(10)**, 720–727. ISSN 1533-4058.
- NAVARRO, Alba, Guillem CLOT, Cristina ROYO et al. Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer Research*. 2012, **72(20)**, 5307–5316. ISSN 0008-5472.
- NAVARRO, Alba, Guillem CLOT, Miriam PRIETO et al. MicroRNA expression profiles identify subtypes of mantle cell lymphoma with different clinicobiological characteristics. *Clinical Cancer Research*. 2013, **19(12)**, 3121–3129. ISSN 1078-0432.
- NICKENIG, Christina, Martin DREYLING, Eva HOSTER et al. Combined cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and prednisone (CHOP) improves response rates but not survival and has lower hematologic toxicity compared with combined mitoxantrone, chlorambucil, and prednisone (MCP) in follicular and mantle cell lymphomas. *Cancer*. 2006, **107**, 1014–1022. ISSN 0008-543x.
- NICO, Beatrice, Vincenzo BENAGIANO, Domenica MANGIERI, Nicola MARUOTTI, Angelo VACCA a Domenico RIBATTI. Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histology and Histopathology*. 2008, **23**, 601–607. ISSN 0213-3911.
- NIGAM, Jaya, Abhijit CHANDRA, Hasan Raza KAZMI, Devendra PARMAR, Devendra

- SINGH a Vishal GUPTA. Prognostic significance of survivin in resected gallbladder cancer. *Journal of Surgical Research*. 2015, **194**(1), 57–62. ISSN 0022-4804.
- NORRBY, Klas a Börje RIDELL. Tumour-type-specific capillary endothelial cell stainability in malignant B-cell lymphomas using antibodies against CD31, CD34 and Factor VIII. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 2003, **111**, 483–489. ISSN 0903-4641.
- NORTON, A. J., J. MATTHEWS, V. PAPPÀ et al. Mantle cell lymphoma: Natural history defined in a serially biopsied population over a 20-year period. *Annals of Oncology*. 1995, **6**(3), 249–256. ISSN 0923-7534.
- NYGREN, Lina, Stefanie BAUMGARTNER WENNERHOLM, Monika KLIMKOWSKA, Birger CHRISTENSSON, Eva KIMBY a Birgitta SANDER. Prognostic role of SOX11 in a population-based cohort of mantle cell lymphoma. *Blood*. 2012, **119**(18), 4215–4223. ISSN 0006-4971.
- O'MALLEY, Dennis P., Gail H. VANCE a Attilio ORAZI. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma with trisomy 12 and focal cyclin D1 expression: a potential diagnostic pitfall. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2005, **129**, 92–95. ISSN 0003-9985.
- OLSEN, B., G. SRKALOVIC, M. HALL a E. MCPHAIL. Cyclin D1 positive follicular lymphoma. *Journal of Clinical Pathology*. 2009, **62**, 855–857. ISSN 0021-9746.
- ONDREJKA, Sarah L., Raymond LAI, Stephen D. SMITH a Eric D. HSI. Indolent mantle cell leukemia: a clinicopathological variant characterized by isolated lymphocytosis, interstitial bone marrow involvement, kappa light chain restriction, and good prognosis. *Haematologica*. 2011, **96**(8), 1121–1127. ISSN 0390-6078.
- PERVEZ, Shahid, Saroona HAROON a Dreema AWAN. Ki-67 labeling indices in 'classic' versus 'blastoid' mantle cell lymphomas--proposed cutoff values for routine diagnostic workup. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*. 2015, **16**(15), 6591–6594. ISSN 1513-7368.
- PETRANOVIC, Duska, Gorazd PILCIC, Milena PEITL et al. Primary gastric mantle cell lymphoma. *Hematology Reports* [electronic resource]. 2012, **4**, e1. ISSN 2038-8330.
- PITTALUGA, Stefania, Gregor VERHOEF, Arnold CRIEL et al. Prognostic significance of bone marrow trephine and peripheral blood smears in 55 patients with mantle cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*. 1996, **21**(1-2), 115–125. ISSN 1042-8194.
- PREUSSER, M., H. HEINZL, E. GELPI et al. Histopathologic assessment of hot-spot microvessel density and vascular patterns in glioblastoma: Poor observer agreement limits clinical utility as prognostic factors-A translational research project of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Cancer*. 2006, **107**, 162–170. ISSN 0008-543x.
- PROVENCIO, Mariano, Cesar CORBACHO, Clara SALAS et al. The topoisomerase II α expression correlates with survival in patients with advanced Hodgkin's lymphoma. *Clinical Cancer Research*. 2003, **9**, 1406–1411. ISSN 1078-0432.
- PRUNERI, Giancarlo, Sonia FABRIS, Luca BALDINI et al. Immunohistochemical analysis of cyclin D1 shows deregulated expression in multiple myeloma with the t(11;14). *The American Journal of Pathology*. 2000, **156**(5), 1505–1513. ISSN 0097-3599.
- QUINN, Timothy P., Kevin G. PETERS, Carlie DE VRIES, Napoleone FERRARA a Lewis T. WILLIAMS. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993, **90**, 7533–7537. ISSN 0027-8424.
- QUINTANILLA-MARTINEZ, Leticia, Julia SLOTTA-HUSPENINA, Ina KOCH et al.

- Differential diagnosis of cyclin D2+ mantle cell lymphoma based on fluorescence in situ hybridization and quantitative real-time-PCR. *Haematologica*. 2009, **94**(11), 1595–1598. ISSN 0390-6078.
- RAHIMI, N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Frontiers in Bioscience : a Journal and Virtual Library* [abstrakt]. 2006, **11**, 818–829. ISSN 1093-9946.
- RANA, Chanchal, Seema SHARMA, Vinita AGRAWAL a Uttam SINGH. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma and its correlation with clinicopathological factors. *Annals of Hematology*. 2010, **89**, 789–794. ISSN 0939-5555.
- RÄTY, Riikka, Kaarle FRANSSILA, Heikki JOENSUU, Lasse TEERENHOVI a Erkki ELONEN. Ki-67 expression level, histological subtype, and the international prognostic index as outcome predictors in mantle cell lymphoma. *European Journal of Haematology*. 2002, **69**, 11–20. ISSN 0902-4441.
- RIBATTI, D., A. VACCA, B. NICO, M. FANELLI, L. RONCALI A F. DAMMACCO. Angiogenesis spectrum in the stroma of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. An immunohistochemical and ultrastructural study. *European Journal of Haematology* [abstrakt]. 1996, **56**(1-2), 45–53. ISSN 0902-4441.
- RIDELL, Borje a Klas NORRBY. Intratumoral microvascular density in malignant lymphomas of B-cell origin. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 2001, **109**, 66–72. ISSN 0903-4641.
- RICHARD, P., J. VASSALLO, S. VALMARY, R. MISSOURY, G. DELSOL a P. BROUSSET. ‘In situ-like’ mantle cell lymphoma: a report of two cases. *Journal of Clinical Pathology*. 2006, **59**, 995–996. ISSN 0021-9746.
- ROBAK, Tadeusz, Huiqiang HUANG, Jie JIN et al. Bortezomib-based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2015, **372**, 944–953. ISSN 0028-4793.
- ROMAGUERA, Jorge E., L. Jeffrey MEDEIROS, Frederick B. HAGEMEISTER et al. Frequency of gastrointestinal involvement and its clinical significance in mantle cell lymphoma. *Cancer*. 2003, **97**, 586–591. ISSN 0008-543x.
- ROMAGUERA, Jorge E., Luis E. FAYAD, Lei FENG et al. Ten-year follow-up after intense chemoimmunotherapy with Rituximab-HyperCVAD alternating with Rituximab-high dose methotrexate/cytarabine (R-MA) and without stem cell transplantation in patients with untreated aggressive mantle cell lymphoma. *British Journal of Haematology*. 2010, **150**(2), 200–208. ISSN 0007-1048.
- ROSKOSKI Jr., Robert. VEGF receptor-tyrosine kinases: structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008, **375**, 287–291. ISSN 0006-291x.
- RUAN, J., K. HAJJAR, S. RAFII a J. P. LEONARD. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in non-Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology*. 2009, **20**, 413–424. ISSN 0923-7534.
- RUAN, Jia, Peter MARTIN, Morton COLEMAN et al. Durable responses with the metronomic regimen RT-PEPC in elderly patients with recurrent mantle cell lymphoma. *Cancer*. 2010, **116**(11), 2655–2664. ISSN 0008-543x.
- RUDZKI, Zbigniew, Terence JONES, Jane STARCZYNSKI a Fiona CLARK. A low-grade follicular lymphoma with strong expression of cyclin D1, but without evidence of CCND1 translocation or amplification. *Journal of Clinical Pathology*. 2013, **66**(8), 727–729. ISSN 0021-9746.
- RUCHLEMER, Rosa, Andrew C. WOTHERSPOON, Jeremy N. THOMPSON, John G. SWANSBURY, Estella MATUTES a Daniel CATOVSKY. Splenectomy in mantle

- cell lymphoma with leukaemia: a comparison with chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2002, **118**, 952–958. ISSN 0007-1048.
- SHAH, Jatin J., Luis FAYAD a Jorge ROMAGUERA. Mantle cell international prognostic index (MIPI) not prognostic after R-hyper-CVAD. *Blood*. 2008, **112**(6), 2583. ISSN 0006-4971.
- SHIBUYA, M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* [abstrakt]. 2006, **39**, 469–478. ISSN 1225-8687.
- SCHAFFEL, R., C. V. HEDVAT, J. TERUYA-FELDSTEIN et al. Prognostic impact of proliferative index determined by quantitative image analysis and the international prognostic index in patients with mantle cell lymphoma. *Annals of Oncology*. 2010, **21**(1), 133–139. ISSN 0923-7534.
- SCHOLZEN, Thomas a Johannes GERDES. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*. 2000, **182**(3), 311–322. ISSN 0021-9541.
- SCHRADER, C., P. MEUSERS, G. BRITTINGER et al. Topoisomerase II α expression in mantle cell lymphoma: a marker of cell proliferation and a prognostic factor for clinical outcome. *Leukemia*. 2004, **18**, 1200–1206. ISSN 0887-6924.
- SCHRADER, Carsten, Dirk JANSSEN, Peter MEUSERS et al. Repp86: a new prognostic marker in mantle cell lymphoma. *European Journal of Haematology*. 2005, **75**, 498–504. ISSN 0902-4441.
- SIDDIQI, Imran N., Russell K. BRYNES a Endi WANG. B-cell lymphoma with hyaline vascular Castleman disease-like features: a clinicopathologic study. *American Journal of Clinical Pathology*. 2011, **135**(6), 901–914. ISSN 0002-9173.
- SIDDIQUI, Momin T., Lisa A. PITELKA a Paolo GATTUSO. Extranodal lymphomas: review of clinicopathologic and cytologic features. *Diagnostic Cytopathology*. 2009, **37**, 220–229. ISSN 8755-039.
- SINGHAL, Seema, Jayesh MEHTA, Raman DESIKAN et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 1999, **341**(21), 1565–1571. ISSN 0028-4793.
- SMOLEJ, L. a P. KAŠPAROVÁ. Choice of endothelial marker is crucial for assessment of bone marrow microvessel density in chronic lymphocytic leukemia. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 2008, **116**(12), 1058–1062. ISSN 0903-4641.
- STILGENBAUER, S., C. SCHAFFNER, D. WINKLER et al. The ATM gene in the pathogenesis of mantle-cell lymphoma. *Annals of Oncology*. 2000, **11**(Suppl 1), S127–S130. ISSN 0923-7534.
- STOPECK, Alison T., Joseph M. UNGER, Lisa M. RIMSZA et al. A phase II trial of single agent bevacizumab in patients with relapsed, aggressive non-Hodgkin lymphoma: Southwest oncology group study. *Leukemia & Lymphoma*. 2009, **50**(5), 728–735. ISSN 1042-8194.
- SUGITA, Yasuo, Yukari TAKASE, Daisuke MORI, Osamu TOKUNAGA, Akihiko NAKASHIMA a Minoru SHIGEMORI. Endoglin (CD 105) is expressed on endothelial cells in the primary central nervous system lymphomas and correlates with survival. *Journal of Neuro-Oncology*. 2007, **82**, 249–256. ISSN 0167-594X.
- SUN, Tsieh, Mary Lowery NORDBERG, James D. COTELINGAM, Diana M. VEILLON a John RYDER. Fluorescence in situ hybridization: method of choice for a definitive diagnosis of mantle cell lymphoma. *American Journal of Hematology*. 2003, **74**, 78–84. ISSN 0361-8609.
- SWERDLOW, S. H., J. A. HABESHAW, L. J. MURRAY, H. S. DHALIWAL, T. A.

- LISTER a A. G. STANSFELD. Centrocytic lymphoma: a distinct clinicopathologic and immunologic entity. *The American Journal of Pathology*. 1983, **113**, 181–197. ISSN 0097-3599.
- SWERDLOW, Steven H., Elias CAMPO, M. Seto a H.K. MÜLLER-HERMELINK. Mantle cell lymphoma. In *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue*. Editor Steven H. Swerdlow, et al. Lyon (Francie): IARC Press, 2008, 229–232. ISBN 978-92-832-2431-0.
- ŠÁLEK, David, Andrea JANÍKOVÁ, Pavla VESELÁ a Jiří MAYER. Nové perspektivy v patogenezi a diagnostice lymfomu z pláštěvých buněk (mantle cell lymfomu). *Onkologie*. 2013, **7**, 121–126. ISSN 1802-4475.
- TAMURA, Satoru, Koji OHKAWAUCHI, Yuichi YOKOYAMA et al. Non-multiple lymphomatous polyposis form of mantle cell lymphoma in the gastrointestinal tract. *Journal of Gastroenterology*. 2004, **39**(10), 995–1000. ISSN 0944-1174.
- TASKINEN, Minna, Esa JANTUNEN, Veli-Matti KOSMA, Petri BONO, Marja-Liisa KARJALAINEN-LINDSBERG a Sirpa LEPPÄ. Prognostic impact of CD31-positive microvessel density in follicular lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *European Journal of Cancer* [abstrakt]. 2010, **46**(13), 2506–2512. ISSN 0959-8049.
- THAKRAL, Beenu, Jane ZHOU a L. Jeffrey MEDEIROS. Extranodal hematopoietic neoplasms and mimics in the head and neck: an update. *Human Pathology*. 2015, **46**, 1079–1100. ISSN 0046-8177.
- TIEMANN, Markus, Carsten SCHRADER, Wolfram KLAPPER et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *British Journal of Haematology*. 2005, **131**, 29–38. ISSN 0007-1048.
- TICHÝ, M., V. TICHÁ, V. ŠČUDLA, M. ŠVÁCHOVÁ a J. ZAPLETALOVÁ. Analýza angiogeneze v kostní dřeni u plazmocytárního myelomu. *Česko-slovenská patologie*. 2010, **46**(1), 15–19. ISSN 1210-7875.
- TODOROVIC, Milena, Bela BALINT, Bosko ANDJELIC et al. Outcome prediction of advanced mantle cell lymphoma by international prognostic index versus different mantle cell lymphoma indexes: one institution study. *Medical Oncology*. 2012, **29**(3), 2212–2219. ISSN 1357-0560.
- TONAR, Zbyněk, Gunter F. EGGER, Kirsti WITTER a Birgitt WOLFESBERGER. Quantification of microvessels in canine lymph nodes. *Microscopy Research and Technique*. 2008, **71**, 760–772. ISSN 1059-910X.
- TURLEY, Helen, Prudence A. E. SCOTT, Victoria M. WATTS, Roy BICKNELL, Adrian L. HARRIS a Kevin C. Gatter. Expression of VEGF in routinely fixed material using a new monoclonal antibody VG1. *The Journal of Pathology*. 1998, **186**, 313–318. ISSN 0022-3417.
- TZANKOV, Alexandar, Simone HEISS, Stephanie EBNER et al. Angiogenesis in nodal B cell lymphomas: a high throughput study. *Journal of Clinical Pathology*. 2007, **60**, 476–482. ISSN 0021-9746.
- UZZAN, Bernard, Patrick NICOLAS, Michel CUCHERAT a Gérard Yves PERRET. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Research*. 2004, **64**, 2941–2955. ISSN 0008-5472.
- VAN DE SCHANS, Saskia A. M., Maryska L. JANSSEN-HEIJNEN, Marten R. NIJZIEL, Ewout W. STEYERBERG a Dick Johan VAN SPRONSEN. Validation, revision and extension of the Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index in

- a population-based setting. *Haematologica*. 2010, **95**(9), 1503–1509. ISSN 0390-6078.
- VASILAKAKI, T., A. TSAVARI, E. ARKOUMANI et al. Primary mantle cell lymphoma of the tonsil: An uncommon case. *Hellenic Journal of Surgery*. 2015, **87**(6), 485–487. ISSN 0018-0092.
- VERMEULEN, P. B., G. GASPARINI, S. B. FOX et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *European Journal of Cancer*. 2002, **38**, 1564–1579. ISSN 0959-8049.
- VERMEULEN, P. B., G. GASPARINI, S. B. FOX et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *European Journal of Cancer*. 1996, **32A**(14), 2474–2484. ISSN 0959-8049.
- VOGT, Niklas a Wolfram KLAPPER. Variability in morphology and cell proliferation in sequential biopsies of mantle cell lymphoma at diagnosis and relapse: clinical correlation and insights into disease progression. *Histopathology*. 2013, **62**(2), 334–342. ISSN 0309-0167.
- WANG, Gangshi, Haili HUANG, Jie GAO et al. Tissue microarray analysis of topoisomerase II α protein in gastric adenocarcinomas: histogenetic and prognostic implications. *Cancer Genomics & Proteomics*. 2011, **8**(3), 128–134. ISSN 1109-6535.
- WANG, Li, Wen Yu SHI, Zhi Yuan WU et al. Cytostatic and anti-angiogenic effects of temsirolimus in refractory mantle cell lymphoma. *Journal of Hematology & Oncology*. 2010, **3**, 30. ISSN 1756-8722.
- WANG, Michael, Simon A. RULE, Peter MARTIN et al. Interim results of an international, multicenter, phase 2 study of Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor, ibrutinib (PCI-32765), in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (MCL): durable efficacy and tolerability with longer follow-up. *ASH Annual Meeting Abstract*. 2012, **120**(21), 904.
- WEIDNER, Noel, Joseph P. SEMPLE, William R. WELCH a Judah FOLKMAN. Tumor angiogenesis and metastasis — correlation in invasive breast carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 1991, **324**, 1–8. ISSN 0028-4793.
- WEISENBURGER, D. D., B. N. NATHWANI, L. W. DIAMOND, C. D. WINBERG a H. RAPPAPORT. Malignant lymphoma, intermediate lymphocytic type: a clinicopathologic study of 42 cases. *Cancer*. 1981, **48**(6), 1415–1425. ISSN 0008-543x.
- WLODARSKA, Iwona, Daan DIERICKX, Vera VANHENTENRIJK et al. Translocations targeting CCND2, CCND3, and MYCN do occur in t(11;14)-negative mantle cell lymphomas. *Blood*. 2008, **111**, 5683–5690. ISSN 0006-4971.
- WOLFESBERGER, B., A. Guija DE ARESACO HAGA, M. WILLMANN et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in canine lymphomas. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. 2007, **137**(1), 30–40. ISSN 0021-9975.
- WOLFESBERGER, Birgitt, Zbynek TONAR, Kirsti WITTER et al. Microvessel density in normal lymph nodes and lymphomas of dogs and their correlation with vascular endothelial growth factor expression. *Research in Veterinary Science*. 2008, **85**, 56–61. ISSN 0034-5288.
- WONG, Kit-Fai, John K. C. CHAN, Jason C. C. SO a Pui-Hung YU. Mantle cell lymphoma in leukemic phase. *Cancer*. 1999, **86**, 850–857. ISSN 0008-543x.

- YATABE, Yasushi, Ritsuro SUZUKI, Kensei TOBINAI et al. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood*. 2000, **95**, 2253–2261. ISSN 0006-4971.
- ZAJA, Francesco, Stefano DE LUCA, Umberto VITOLO et al. Salvage treatment with lenalidomide and dexamethasone in relapsed/refractory mantle cell lymphoma: clinical results and effects on microenvironment and neo-angiogenic biomarkers. *Haematologica*. 2012, **97**(3), 416–422. ISSN 0390-6078.
- ZENG, Weifen, Kai FU, Leticia QUINTANILLA-FEND, Megan LIM, Sarah ONDREJKA a Eric D. HSI. Cyclin D1-negative blastoid mantle cell lymphoma identified by SOX11 expression. *American Journal of Surgical Pathology*. 2012, **36**(2), 214–219. ISSN 0147-5185.
- ZHAO, Xianfeng F. Pitfalls in diagnostic hematopathology: Part I. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* [electronic resource]. 2009, **2**, 11–20. ISSN 1936-2625.
- ZUCCA, E., E. ROGGERO, G. PINOTTI et al. Patterns of survival in mantle cell lymphoma. *Annals of Oncology*. 1995, **6**, 257–262. ISSN 0923-7534.

Přílohy

Seznam příloh

Příloha 1 – seznam zkratk použitých v tabulkách přílohy 2 a 3

Příloha 2 – seznam 235 případů s veškerými daty užitými při studii věnované prognostickým faktorům lymfomu z plášťových buněk

Příloha 3 – seznam 177 případů s veškerými daty užitými při studii věnované mikrovaskulární denzitě u pacientů s lymfomem z plášťových buněk

Příloha 4 – plné znění publikace týkající se dizertační práce – SALEK, David, Pavla VESELA, Ludmila BOUDOVA, Andrea JANIKOVA, Pavel KLENER, Samuel VOKURKA, Milada JANKOVSKA, Robert PYTLIK, David BELADA, Jan PIRNOS, Mojmir MOULIS, Roman KODET, Michal MICHAL, Eva JANOUSOVA, Jan MUZIK, Jiri MAYER a Marek TRNENY. Retrospective analysis of 235 unselected patients with mantle cell lymphoma (MCL) confirms prognostic relevance of MIPI (MCL International Prognostic Index), and Ki-67 in the era of rituximab: long-term data from the Czech Lymphoma Project database. *Leukemia & Lymphoma*. 2014, **55**(4), 802–810. (IF = 2,891)

Příloha 5 – plné znění publikace týkající se dizertační práce – VESELÁ, Pavla, Zbyněk TONAR, David ŠÁLEK, Samuel VOKURKA, Marek TRNĚNÝ, Roman KODET, Mojmir MOULIS, Petra KAŠPAROVÁ, Zdeňka VERNEROVÁ, Zuzana VELENSKÁ, Jan STRÍTESKÝ, Michal MICHAL a Ludmila BODOVÁ. Microvessel density of mantle cell lymphoma. A retrospective study of its prognostic role and the correlation with the Ki-67 and the Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index in 177 cases. *Virchows Archiv*. 2014, **465**(5), 587–597. (IF = 2,651)

Příloha 6 – plné znění publikace týkající se dizertační práce – VESELÁ, Pavla, Zbyněk TONAR a Ludmila BODOVÁ. Mikrovaskulární denzita v lymfomech – hodnocení a klinický význam. *Česko-slovenská patologie*. 2015, **51**(2), 94–98.

Příloha 7 – plné znění publikace týkající se dizertační práce – ŠÁLEK, David, Andrea JANÍKOVÁ, Pavla VESELÁ a Jiří MAYER. Nové perspektivy v patogenezi a diagnostice lymfomu z plášťových buněk (mantle cell lymfomu). *Onkologie*. 2013, **7**, 121–126.

Příloha 1 – Seznam zkratk použitých v tabulkách přílohy 2 a 3

A	ano
Aden. vegetace	adenoidní vegetace
Archit.v.	architektonická varianta dle WHO 2008
B-sy.	přítomnost B-symptomů
CNS	klinicky zjištěné postižení centrální nervové soustavy
CR	kompletní odpověď
CRu	nepotvrzená kompletní odpověď
CVP	kombinace cyklofosfamidu, vinkristinu a prednisonu
Cykl.	cyklin D1
Č.	identifikační číslo případu
EC.	výkonnostní stav dle ECOG
Ex.	přítomnost exsudátů v tělních dutinách
Flu	chemoterapie založená na fludarabinu včetně monoterapie
GIT	klinicky zjištěné postižení trávicího traktu
Hb.	množství hemoglobinu v periferní krvi (g/l)
Chir.res.	pouze chirurgická resekce, nikoli chemoterapie
CHOP	kombinace cyklofosfamidu, doxorubicinu, vinkristinu a prednisonu
Int.bez ASCT	intenzivní indukce bez ASCT (autologní transplantace krvetvorných buněk), např. R-hyperCVAD/HD-MTX/AraC (dávkově intenzifikovaný R-CHOP střídaný s vysokodávkovým cytarabinem a methotrexátem) či R-maxiCHOP/AraC (dávkově intenzifikovaný R-CHOP střídaný s vysokodávkovým cytarabinem bez ASCT)
Int.s allo.	chemo(immuno)terapie následovaná alogenní transplantací kmenových krvetvorných buněk
Int.s ASCT	chemoimunoterapie následovaná vysokodávkovou konsolidační léčbou a ASCT, např. Nordický protokol (dávkově intenzifikovaný R-CHOP střídaný s vysokodávkovým cytarabinem s ASCT) či standardní R-CHOP s ASCT v první linii terapie).
J	klinicky zjištěné postižení jater
K	postižení kostních struktur
Klas.+SC	kombinace cytomorfologické varianty klasické a malobuněčné
Klas.+MZ	kombinace cytomorfologické varianty klasické a varianty podobné marginální zóně
Klas.+pleo.	kombinace klasické a pleomorfní cytomorfologické varianty
Komp.l.	komplikace léčby - GvHD
KS	klinické stádium dle Ann Arbor klasifikace
LDH/n	poměr hladiny laktátdehydrogenázy v séru pacienta k normě laboratoře
Leu.	množství leukocytů v periferní krvi v 10 ⁹ litru
Lok. vzorku	primární lokalizace vzorku
LU	klinicky zjištěné postižení lymfatických uzlin
Ly.	procentuelní zastoupení lymfocytů z celkového množství leukocytů v periferní krvi
M	muž
M.pr.	měsíce přežití do úmrtí z jakékoli příčiny či do data poslední kontroly u žijících pacientů

M.z.+dif.	kombinace architektonických variant pláštěvé zóny a difúzní
M.z.+nod.	kombinace architektonických variant pláštěvé zóny a nodulární
M.zone	architektonická varianta pláštěvé zóny
Morf.v.	cytomorfologická varianta dle WHO 2008
MVD	mikrovaskulární denzita (počet mikrocév/mm ²)
MZ+SC	kombinace cytomorfologických variant malobuněčné a varianty podobné marginální zóně
MZ-like	cytomorfologická varianta podobná marginální zóně
N	ne
Neg.	negativní
Neh.	nehodnotitelné
Neintenz.	neintenzivní (konvenční) chemoterapie
Nod.+dif.	kombinace nodulární a difúzní architektonické varianty
O	klinicky zjištěné postižení struktur orbity včetně očních víček
Odp.	odpověď na terapii I. linie
Oj. FDB	ojedinělé folikulárně dendritické buňky
Os.	klinicky zjištěné postižení ostatních extranodálních lokalizací (ledviny, měkké tkáně,...)
Ost.neint.	ostatní neintenzivní protokoly (CHOP/AraC, VAD, chlorambucil)
P	klinicky zjištěné postižení plic
P.d.	doba do progresu onemocnění (progression free survival), příp. do úmrtí, v případě, že nedošlo u žijících pacientů k progresi onemocnění doba do poslední kontroly
PD	progredující onemocnění
Pl	klinicky zjištěné postižení pleury
Poh.	pohlaví
Polypy tl.	polypy tlustého střeva
poz.	pozitivní
PR	parciální odpověď
Pr.	progrese ano/ne
Prol.a.	proliferační aktivita
Př.smrti	příčina smrti
Rad.	užití radioterapie při léčbě I. linie
R-CHOP	kombinace rituximabu, cyklofosfamidu, doxorubicinu, vinkristinu a prednisonu
Rit.	užití Rituximabu v chemoterapii I. linie
S	slezina
SD	stabilní onemocnění
Síť FDB	síť folikulárně dendritických buněk
Small cell	malobuněčná cytomorfologická varianta MCL
SŽ	klinicky zjištěné postižení slinných žláz
SŽ submand.	slinná žláza submandibulární
T-dif.	trepanobiopsie – difúzní růst
T-int.+dif.	trepanobiopsie – intersticiální až difúzní růst
T-interst.	trepanobiopsie – intersticiální růst
T-nod.+int.	trepanobiopsie – nodulární a intersticiální růst

Tonsila	patrová mandle
Tro.	množství trombocytů v periferní krvi v 10^9 litru
Ú.	úmrtí ano/ne
UNK	neznámý
Uzlina	lymfatická uzlina
Věk	věk při diagnóze
W	klinicky zjištěné postižení Waldeyerova mizního okruhu
Ž	žena

Příloha 2 – Seznam 235 případů s daty ze studie prognostických faktorů lymfomu z plášťových buněk

Č.	Poh.	Věk	Lok. vzorku	CD20	Cykl.	CD5	CD23	Prol.a.	Morf.v.	Archit.v.	EC.	Leu.	LDH/n	MIPI	b-MIPI	s-MIPI	Pr.	P.d.	KS	B-sy.
1	M	60	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	13,78	klasická	nodulární	1	12,3	UNK				A	19	4	N
2	M	43	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	12,84	klasická	nodulární	1	9,1	0,71	5,04	5,31	2	A	29	4	A
3	M	63	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	9,78	klasická	nodulární	2	6,8	0,65	6,26	6,47	5	A	31	4	N
4	Ž	54	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	13,52	klasická	nodulární	1	40,3	1,05	6,26	6,55	6	A	29	4	A
5	M	47	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	19,49	klas.+pleo.	difúzní	1	11,9	7,85	6,71	7,13	5	N	168	4	A
6	M	69	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	11,66	klasická	difúzní	1	7,3	UNK				A	13	4	N
7	M	46	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	14,64	klasická	difúzní	2	11	1,06	6,16	6,47	6	A	48	4	A
8	M	44	slezina	poz.	poz.	poz.	nehod.	59,37	klasická	nodulární	3	14,1	5,58	7,17	8,44	7	A	4	4	A
9	M	66	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	21,70	klasická	difúzní	2	8	1,50	6,94	7,40	8	A	9	4	A
10	M	42	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	11,38	small cell	difúzní	2	53,2	1,58	6,89	7,14	8	A	20	4	A
11	M	70	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	29,45	klasická	m.z.+nod.	1	151	1,85	7,71	8,34	9	A	18	4	A
12	M	47	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	14,64	klasická	nodulární	1	12,1	0,79	5,36	5,67	3	A	20	2	N
13	M	39	uzlina	poz.	poz.	neg.	síť FDB	8,62	small cell	nodulární	1	5,5	0,85	4,80	4,98	1	A	43	4	N
14	M	52	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	poz.		small cell	T-interst.	1	UNK	UNK				A	158	4	N
15	M	61	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	20,54	small cell	neh.	1	4,1	0,94	5,51	5,95	3	A	16	4	N
16	M	70	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	neg.		klasická	T-nod.+int.	1	22,8	0,73	6,38		7	A	58	4	N
17	M	53	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	2,84	small cell	nodulární	3	6,3	1,90	6,52	6,58	6	A	21	4	A
18	Ž	67	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	5,14	klasická	difúzní	2	2,7	1,08	6,34	6,45	6	A	24	4	A
19	M	49	tenké střevo	poz.	poz.	poz.	poz.	17,90	klas.+pleo.	nod.+dif.	1	9,7	0,61	5,19	5,57	1	A	46	4	A
20	M	67	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	28,78	klasická	nodulární	3	78,1	4,06	8,49	9,11	10	A	4	4	A
21	M	73	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	17,39	klasická	difúzní	1	7,5	1,23	6,34	6,71	6	A	22	4	N
22	M	68	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	73,15	klasická	nod.+dif.	2	6,6	2,23	7,16	8,73	7	A	1	4	A
23	Ž	60	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	oj. FDB		small cell	T-int.+dif.	1	29,5	0,79	6,18		6	A	56	4	A
24	M	72	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	56,97	MZ-like	nodulární	1	27,9	1,84	7,08	8,30	9	A	25	4	N
25	M	64	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	20,34	klasická	T-int.+dif.	1	10,6	1,31	6,20	6,64	6	A	74	4	A
26	Ž	71	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	33,38	small cell	nod.+dif.	2	9,8	1,85	7,32	8,04	9	A	6	4	A
27	M	70	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	14,40	klasická	difúzní	1	5,9	0,98	6,01	6,32	4	A	15	4	A
28	Ž	67	uzlina	poz.	poz.	neg.	oj. FDB	26,59	klasická	nod.+dif.	1	16	2,54	6,87	7,44	8	A	23	4	A
29	M	54	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	oj. FDB		small cell	T-nod.+int.	1	49,1	0,92	6,27		5	N	74	4	A
30	M	71	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	34,75	klas.+MZ	m.z.+nod.	2	6,5	1,11	6,85	7,59	7	A	15	4	A
31	M	73	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	16,77	klasická	m.z.+dif.	1	5	1,05	6,08	6,44	5	A	7	3	N

C.	M.pr.	Ú.	Př.smrti	LU	GIT	J	CNS	P	PI	K	SZ	O	Ex.	Os.	KD	W	S	Ly.	Hb.	Tro.	Léčba I.linie	Typ léčby	Rit.	Rad.	Odp.	Spoč.b.
1	182	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	41	148	253	CHOP	neintenz.	N	N	CR	4790
2	78	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	25	155	282	Int.s ASCT	intenzivní	N	N	CR	4300
3	73	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	28	138	169	CHOP	neintenz.	N	N	PR	4517
4	72	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	N	A	88	114	171	Int.s ASCT	intenzivní	N	N	CR	4452
5	168	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A		135	118	Int.s ASCT	intenzivní	N	N	CR	3452
6	63	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N		133	198	CHOP	neintenz.	N	N	SD	4931
7	48	A	jiná	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N		130	180	Int.s allo.	intenzivní	N	N	CR	5984
8	6	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	N	A	67	91	36	CHOP	neintenz.	N	N	PR	3465
9	12	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	N	N		142	143	CHOP	neintenz.	N	N	PR	4028
10	30	A	jiná	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	89	68	47	Int.s ASCT	intenzivní	N	N	CR	5564
11	24	A	progrese	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	96	5	176	CHOP	neintenz.	N	N	PR	4544
12	59	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N				CHOP	neintenz.	N	A	CR	4344
13	150	N		A	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N	A	N	A	35	170	198	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	5890
14	176	A	komp.l.	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A				Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	3748
15	40	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	17	115	203	Ost.neint.	neintenz.	A	N	PR	5409
16	64	A	jiná	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	73	139	232	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR	2177
17	41	A	progrese	A	A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	43	90	196	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	4723
18	60	A	progrese	A	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N	A	N	N	21	115	134	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR	5216
19	117	N		A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	26	128	185	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	3771
20	5	A	progrese	A	N	A	N	N	N	N	N	N	A	N	A	N	A	88	61	42	Ost.neint.	neintenz.	N	N	PD	2804
21	32	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	22	149	135	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR	2961
22	1	A	jiná	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	16	135	46	CHOP	neintenz.	N	N	NA	3866
23	58	A	jiná	N	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	89	124	82	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	2565
24	38	A	jiná	A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	64	125	233	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	3444
25	78	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	65	83	90	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	4817
26	8	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	60	103	250	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR	4353
27	25	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	A	24	148	172	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR	4154
28	41	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	23	122	59	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR	4842
29	74	N		A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	95	123	329	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	2723
30	18	A	progrese	A	N	A	N	N	N	N	N	N	A	N	A	N	A	29	152	79	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	PR	4331
31	29	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	50	154	193	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	4764

Č.	Poh.	Věk	Lok. vzorku	CD20	Cykl.	CD5	CD23	Prol.a.	Morf.v.	Archit.v.	EC.	Leu.	LDH/n	MIPI	b-MIPI	s-MIPI	Pr.	P.d.	KS	B-sy.
32	M	54	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	34,55	klas.+MZ	difúzní	1	11,7	1,10	5,78	6,52	5	A	42	4	A
33	M	59	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	neg.		small cell	T-interst.	1	30,5	1,13	6,37		6	N	100	4	N
34	M	63	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	16,30	small cell	neh.	1	4,1	1,86	5,99	6,34	5	A	48	4	N
35	M	47	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	13,62	klas.+MZ	m.zone	2	54,4	0,92	6,76	7,05	6	A	11	4	A
36	M	77	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	34,10	klasická	m.z.+nod.	1	6,8	1,05	6,35	7,08	6	A	17	4	A
37	M	58	tonsila	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	35,02	klasická	nodulární	1	7,96	0,56	5,37	6,13	2	A	41	3	N
38	Ž	76	uzlina	poz.	neg.	poz.	poz.	13,99	klasická	nodulární	1	8,6	1,31	6,54	6,84	6	N	3	3	N
39	M	73	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	80,10	klasická	difúzní	1	8,2	0,98	6,24	7,96	5	A	24	2	N
40	M	59	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	13,19	klasická	m.z.+dif.	1	4,2	0,89	5,42	5,71	2	A	21	4	N
41	M	76	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	17,27	klasická	nod.+dif.	2	9,7	1,31	7,29	7,66	8	A	1	4	A
42	M	53	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	22,50	MZ-like	nodulární	2	7,6	1,59	6,49	6,98	7	A	2	4	A
43	M	46	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	13,47	klasická	nodulární	0	5,3	0,69	4,90	5,19	1	A	67	3	N
44	M	75	uzlina	poz.	poz.		síť FDB	52,72	klasická	nodulární	1	6,5	1,12	6,30	7,43	5	A	16	4	A
45	Ž	72	žaludek	poz.	poz.	poz.	neg.	30,68	klasická	neh.	2	8	1,06	6,95	7,60	8	A	8	4	A
46	M	64	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	32,36	klasická	difúzní	1	9,4	1,12	6,06	6,75	5	A	2	4	N
47	M	67	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	12,80	klasická	m.z.+nod.	0	6,1	0,60	5,62	5,89	2	A	46	1	A
48	Ž	68	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	7,54	klasická	m.z.+nod.	1	7,8	1,35	6,24	6,40	5	A	24	4	A
49	Ž	56	aden. vegetace	poz.	poz.	poz.	síť FDB	17,63	klasická	nodulární	1	5,5	1,03	5,51	5,89	3	N	93	4	A
50	M	60	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	32,06	klasická	nod.+dif.	1	5,4	1,25	5,76	6,44	4	A	24	4	A
51	M	50	ileum	poz.	poz.	poz.	síť FDB	17,20	klasická	difúzní	0	6,9					A	53	4	N
52	Ž	59	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	20,32	klasická	nod.+dif.	2	44,6	1,34	7,32	7,76	8	A	38	4	A
53	Ž	63	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	35,51	klasická	difúzní	0	5,8	0,61	5,47	6,23	2	N	78	4	N
54	M	73	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	neg.		klasická	T-int.+dif.	2	123	1,60	8,34		11	A	20	4	A
55	M	62	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	10,99	klasická	difúzní	1	6,9	1,01	5,81	6,04	5	A	32	4	A
56	M	74	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	6,81	klasická	difúzní	1	38,6	0,83	6,81	6,96	7	A	22	4	N
57	M	80	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	16,17	klasická	m.z.+nod.	3	3,3	0,96	6,81	7,15	6	A	5	4	A
58	M	61	tonsila	poz.	poz.		neg.	59,21	klasická	difúzní	1	8,8	0,87	5,78	7,05	4	A	6	3	A
59	M	44	dutina ústní	poz.	poz.	poz.	síť FDB	7,94	small cell	neh.	0	6,5	0,79	5,00	5,17	1	A	47	3	N
60	M	73	tonsila	poz.	poz.	poz.	neg.	38,15	pleomorfní	difúzní	0	8,6	0,58	5,96	6,77	4	A	13	2	N
61	M	75	žaludek	poz.	poz.	poz.	neg.	45,39	klasická	difúzní	1	10,6	1,17	6,53	7,50	7	N	69	4	A
62	M	73	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	nehod.		klasická	T-interst.	3	450	4,03	9,42		11	A	7	4	A
63	M	64	orbita	poz.	poz.	poz.	síť FDB	6,78	klasická	nodulární	1	5,7	0,75	5,62	5,76	3	A	9	4	N

Č.	M.pr.	U.	Př.smrti	LU	GIT	J	CNS	P	PI	K	SZ	O	Ex.	Os.	KD	W	S	Ly.	Hb.	Tro.	Léčba I.linie	Typ léčby	Rit.	Rad.	Odp.	Spoč.b.
32	95	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	59	135	131	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	3421
33	100	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	86	149	149	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	2096
34	94	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	52	111	122	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	3214
35	13	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	91	141	184	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	PR	3569
36	21	A	progrese	A	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N	A	N	A	23	143	243	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	4346
37	47	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N		135	274	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	2883
38	3	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	20	134	201	CHOP	neintenz.	N	N	CRu	3802
39	32	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	39	135	232	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	3251
40	124	N		N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N				CHOP	neintenz.	N	N	PR	4573
41	2	A	progrese	A	N	A	N	N	N	N	N	A	N	N	A	N	A	31	110	117	CHOP	neintenz.	N	N	PD	2797
42	3	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	N	A	32	86	98	CHOP	neintenz.	N	N	PD	3937
43	121	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	23	159	214	CHOP	neintenz.	N	N	CR	3780
44	30	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	23	122	179	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR	3130
45	9	A	progrese	A	A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	40,1	90	216	CVP	neintenz.	N	N	SD	2265
46	19	A	progrese	A	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	A	A	A	51	164	139	Int.bez ASCT	intenzivní	N	N	PD	4620
47	46	A	UNK	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	18	162	217	Flu	neintenz.	N	N	CR	4196
48	103	N		A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	33	101	124	CHOP	neintenz.	N	N	PR	5755
49	93	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	15	124	284	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	4305
50	97	A	UNK	A	N	N	N	N	A	N	N	N	A	N	A	N	N	28	130	128	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	3964
51	76	A	komp.l.	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	29	147	219	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	4541
52	78	A	progrese	A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	74	109	203	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR	4374
53	78	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	33	140	237	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	3962
54	23	A	progrese	A	N	N	N	N	A	N	N	N	A	N	A	N	N	82,9	82	42	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR	5701
55	54	A	jiná	A	A	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	N	N	12	141	269	Flu	neintenz.	A	N	CR	5588
56	29	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	A	83	149	311	Flu	neintenz.	A	A	CR	3936
57	5	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	A	36,9	91	56	CVP	neintenz.	N	N	SD	3351
58	13	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	27,8	136	165	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	PD	3927
59	71	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	30	152	278	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	5854
60	18	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	24,9	148	310	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	4440
61	69	N		A	A	A	N	N	N	N	N	N	A	N	A	N	A	50	139	109	Flu	neintenz.	A	N	PR	4153
62	7	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	60,1	135	156	Flu	neintenz.	A	N	CR	
63	9	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	A	N	A	19,7	155	173	Flu	neintenz.	A	N	SD	6783

Č.	Poh.	Věk	Lok. vzorku	CD20	Cykl.	CD5	CD23	Prol.a.	Morf.v.	Archit.v.	EC.	Leu.	LDH/n	MIPI	b-MIPI	s-MIPI	Pr.	P.d.	KS	B-sy.
64	M	52	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	24,14	klasická	difúzní	2	14,4	2,05	6,87	7,39	8	A	11	4	A
65	Ž	28	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	21,96	small cell	difúzní	0	8,5	0,86	4,59	5,06	2	N	61	4	N
66	Ž	85	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	8,25	klas.+MZ	nodulární	2	8,12	0,72	7,18	7,36	7	A	18	4	A
67	M	63	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	16,41	klasická	nodulární	2	6,4	1,73	6,83	7,18	7	N	56	4	A
68	Ž	57	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	17,35	small cell	difúzní	1	7,6	1,33	5,87	6,24	4	N	54	4	A
69	M	49	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	8,26	klasická	difúzní	1	7,9	1,78	5,74	5,91	4	N	52	4	A
70	M	60	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	64,32	pleomorfní	difúzní	2	29,2	2,81	7,63	9,00	10	A	10	4	A
71	Ž	65	spojivka	poz.	poz.	poz.	síť FDB	11,51	small cell	difúzní	0	6,3	1,08	5,91	6,16	4	N	47	4	N
72	M	24	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB		klasická	nodulární	2	12,1	0,80	5,25		5	A	55	4	A
73	M	44	uzlina	poz.	poz.	poz.	neg.		klasická	nodulární	1	3,9	0,45	4,46		0	A	20	4	N
74	Ž	69	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	13,15	klasická	nodulární	1	2,2	0,56	5,23	5,51	2	A	35	4	A
75	Ž	78	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	10,98	klasická	difúzní	3	3,7	0,91	6,75	6,98	6	A	14	4	A
76	M	70	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	53,52	klasická	nodulární	2	18,7	1,60	7,47	8,61	11	A	3	4	A
77	M	54	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB		klasická	nodulární	1	5,7	0,57	5,10		1	A	43	1	N
78	M	59	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	35,37	klasická	nodulární	0	6,5	0,59	5,36	6,11	1	A	25	3	N
79	M	51	uzlina	poz.	poz.	neg.	neg.		klasická	nodulární	0	13,8	0,57	5,36		3	A	37	4	N
80	Ž	62	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB		klasická	nodulární	0	16,7	0,92	6,11		6	A	19	4	N
81	M	67	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB		klasická	nodulární	1	2,2	0,98	5,49		3	A	13	4	N
82	M	55	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	25,50	small cell	m.z.+dif.	1	6,9	0,84	5,44	5,99	3	A	106	3	N
83	M	79	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	25,00	klasická	difúzní	1	7	0,72	6,21	6,75	5	A	42	2	N
84	M	69	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	11,35	klasická	nodulární	2	23,8	1,16	7,34	7,58	9	A	3	4	A
85	Ž	62	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	18,04	klas.+MZ	nodulární	2	2,2	1,22	6,15	6,53	6	A	53	3	A
86	M	65	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	21,07	klasická	nod.+dif.	2	21,5	0,92	7,01	7,47	8	A	19	4	A
87	Ž	72	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	22,50	klasická	difúzní	2	UNK	1,42				A	4	4	A
88	Ž	60	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	53,45	klasická	difúzní	1	3,5	1,66	5,75	6,90	5	A	87	3	A
89	M	72	uzlina	poz.	poz.	poz.	neg.	9,50	klasická	nod.+dif.	2	6,29	0,67	6,58	6,78	6	N	100	4	N
90	Ž	53	sliznice rekta	poz.	poz.	poz.	síť FDB	29,30	klasická	difúzní	1	17,5	1,12	5,93	6,56	6	A	13	4	A
91	Ž	50	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	52,00	klasická	nod.+dif.	3	16,6	2,22	6,90	8,02	9	N	101	4	A
92	Ž	59	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	38,41	klasická	difúzní	1	4,7	1,43	5,75	6,57	3	A	64	4	A
93	M	62	uzlina	poz.	poz.	neg.	síť FDB	9,56	klas.+MZ	m.z.+nod.	1	15,6	0,93	6,09	6,29	6	A	1	4	A
94	Ž	82	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB		klasická	m.z.+nod.	2	7,2	1,15	7,30		8	A	16	2	N
95	M	50	epifarynx	poz.	poz.	poz.	neg.		klasická	difúzní	0	7,3	0,87	5,32		3	A	72	2	N

Č.	M.pr.	U.	Př.smrti	LU	GIT	J	CNS	P	PI	K	SZ	O	Ex.	Os.	KD	W	S	Ly.	Hb.	Tro.	Léčba I.linie	Typ léčby	Rit.	Rad.	Odp.	Spoč.b.
64	58	N		A	A	N	N	N	N	N	A	N	N	N	A	N	A	69,2	78	92	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	PR	2544
65	61	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	35	148	256	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	4653
66	18	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	N	N	40,2	109	222	CVP	neintenz.	N	N	SD	4486
67	56	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	A	26	124	201	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	4423
68	54	N		A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A		110	357	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CRu	3965
69	52	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	16,7	117	262	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	3706
70	11	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	69,6	99	63	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	PR	2724
71	47	N		A	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	A	N	N	32	157	283	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	5263
72	149	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	68	137	100	Int.s ASCT	intenzivní	N	N	CR	
73	135	A	jiná	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	50	124	108	CHOP	neintenz.	N	N	CR	
74	100	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	20	121	206	CHOP	neintenz.	N	N	CRu	5141
75	72	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	A	N	N	15,3	117	124	Ost.neint.	neintenz.	N	N	PR	4883
76	5	A	progrese	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	36	145	264	CHOP	neintenz.	N	N	SD	4256
77	101	A	progrese	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	23,1	144	260	jen radioterapie		N	A	CR	
78	131	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	22,9	155	250	CHOP	neintenz.	N	N	CR	4246
79	129	N		A	A	N	N	A	N	N	N	N	N	N	A	N	N	41,5	148	235	Int.s allo.	intenzivní	N	N	CR	
80	81	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	53,3	128	383	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	
81	39	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	62,3	117	105	CHOP	neintenz.	N	N	CR	
82	106	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	26,1	142	225	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	5185
83	58	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	17,7	145	221	jen radioterapie		N	A	CR	
84	5	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	65	130	227	CHOP	neintenz.	N	N	PD	2440
85	69	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	15	134	196	Int.bez ASCT	intenzivní	A	A	CR	2406
86	32	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	15,3	146	219	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	3503
87	4	A	jiná	A	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N				CHOP	neintenz.	N	N	PR	
88	89	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	34	125	170	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	2288
89	100	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	16	93	445	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	
90	17	A	progrese	A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	49	115	278	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	PR	5368
91	101	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	43	111	73	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	2856
92	102	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	56	112	134	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	2385
93	1	A	jiná	A	A	N	N	A	N	N	N	N	N	N	A	N	N	20	85	546	Int.bez ASCT	intenzivní	N	N	UNK	1852
94	36	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	37	116	222	Ost.neint.	neintenz.	N	N	PR	
95	98	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	28,4	133	237	Flu	neintenz.	A	N	CR	

Č.	Poh.	Věk	Lok. vzorku	CD20	Cykl.	CD5	CD23	Prol.a.	Morf.v.	Archit.v.	EC.	Leu.	LDH/n	MIPI	b-MIPI	s-MIPI	Pr.	P.d.	KS	B-sy.
96	M	74	tonsila	poz.	poz.	poz.	nehod.	25,33	MZ-like	nod.+dif.	0	5,9	0,96	6,14	6,68	4	N	98	4	N
97	M	54	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	19,90	klasická	difúzní	0	8,65	1,23	5,73	6,16	4	A	17	4	A
98	Ž	62	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	neg.		neh.	T-interst.	3	10,7	3,48	7,41		9	A	4	4	A
99	M	73	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	4,90	klasická	difúzní	1	8,89	0,62	6,01	6,11	4	A	49	4	A
100	Ž	80	slezina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	60,55	klasická	difúzní	2	14,6	1,08	7,48	8,78	9	A	1	4	A
101	M	70	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	12,48	klasická	difúzní	0	12,4	1,02	6,33	6,60	7	A	16	4	N
102	M	68	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	neg.		klasická	T-interst.	1	47,6	1,73	7,12		8	A	36	4	N
103	M	79	orbita	poz.	poz.	poz.	síť FDB	33,29	klasická	nod.+dif.	1	10,9	0,92	6,54	7,25	6	A	13	4	A
104	M	49	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	46,51	klas.+MZ	nodulární	1	5,7	1,31	5,42	6,42	2	A	6	4	N
105	Ž	64	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	38,34	small cell	difúzní	2	8,5	1,56	6,91	7,74	8	A	17	4	N
106	Ž	79	tonsila	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	27,20	klasická	difúzní	1	5,5	0,85	6,21	6,79	4	A	8	4	A
107	Ž	58	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	18,14	klasická	nodulární	0	8	0,56	5,37	5,76	2	N	84	4	N
108	Ž	55	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	45,06	klasická	nod.+dif.	0	9,55	0,90	5,62	6,59	3	A	21	4	N
109	M	67	duodenum	poz.	poz.	poz.	síť FDB	17,53	klasická	nod.+dif.	0	7,8	0,93	5,98	6,36	4	A	22	4	N
110	Ž	32	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	57,75	klasická	nod.+dif.	0	6,11	0,96	4,66	5,90	1	A	25	4	N
111	M	63	uzlina	poz.	poz.	neg.	neg.	27,50	klasická	difúzní	0	11	0,78	5,88	6,47	5	A	48	4	A
112	M	51	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	18,61	klasická	nodulární	1	7,3	3,86	6,23	6,63	5	A	52	4	A
113	M	76	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	29,99	klasická	nodulární	2	15,9	0,94	7,29	7,94	9	A	5	4	A
114	M	64	uzlina	poz.	poz.		síť FDB	66,48	klasická	difúzní	4	43,7	1,27	7,46	8,88	9	A	5	4	A
115	M	78	kořen jazyka	poz.	poz.	poz.	poz.	11,81	klasická	difúzní	0	4,5	0,58	5,87	6,12	3	N	48	2	N
116	M	53	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	neg.		klasická	T-interst.	0	36,4	0,90	6,09		5	A	5	4	N
117	Ž	82	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	24,23	klasická	nodulární	3	15,1	1,03	7,54	8,06	10	A	2	4	A
118	M	55	uzlina	poz.	neg.	poz.	poz.	42,21	pleomorfní	difúzní	2	10,4	4,34	7,29	8,19	8	A	2	4	A
119	Ž	37	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	73,97	blastoidní	difúzní	0	5,38	1,39	5,01	6,59	2	A	6	3	N
120	M	67	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	18,12	klas.+MZ	m.z.+dif.	0	7,92	0,98	6,02	6,40	4	A	60	2	N
121	M	72	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	19,22	klasická	m.z.+nod.	1	7,53	1,40	6,39	6,80	6	A	8	4	N
122	M	37	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	8,14	klas.+MZ	nodulární	0	5,74	0,80	4,71	4,88	1	A	38	4	N
123	M	70	hrudní stěna	poz.	poz.	poz.	neg.	28,34	klasická	difúzní	3	8,64	1,37	7,06	7,67	8	A	26	4	N
124	M	74	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	17,92	klasická	nod.+dif.	0	8,88	1,03	6,34	6,72	6	A	57	4	A
125	M	56	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	17,09	klasická	m.z.+nod.	0	37,3	0,83	6,16	6,53	5	A	28	4	N
126	M	53	uzlina	poz.	poz.	poz.	neg.	25,18	klasická	difúzní	2	7,42	1,70	6,52	7,06	7	A	19	4	N
127	Ž	76	uzlina	poz.	poz.	poz.	neg.	38,60	pleomorfní	difúzní	2	9,39	1,79	7,46	8,29	9	A	16	4	N

Č.	M.pr.	U.	Př.smrti	LU	GIT	J	CNS	P	PI	K	SZ	O	Ex.	Os.	KD	W	S	Ly.	Hb.	Tro.	Léčba I.linie	Typ léčby	Rit.	Rad.	Odp.	Spoč.b.
96	98	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	54,3	155	194	Flu	neintenz.	A	N	CR	4263
97	31	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	21	134	190	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	5588
98	5	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	36,7	112	142	Flu	neintenz.	A	N	PD	
99	98	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	69	103	79	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	5086
100	2	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	22	106	688	Flu	neintenz.	N	N	PD	3815
101	63	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	16	166	191	R-CHOP	neintenz.	A	N	CRu	4470
102	56	A	progrese	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	24,7	115	139	Flu	neintenz.	N	N	CR	
103	17	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	A	N	N	59	118	170	CVP	neintenz.	N	A	PR	2277
104	7	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	21	148	271	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	PD	3687
105	25	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	A	N	N	1,6	156	308	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CRu	4504
106	17	A	progrese	A	A	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	A	N	17	117	298	CVP	neintenz.	N	N	CRu	2625
107	84	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	13,4	152	185	Flu	neintenz.	A	N	CR	2310
108	91	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	27	150	208	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	4361
109	88	N		N	A	N	N	N	N	N	N	A	N	N	A	N	N	27,7	151	242	Flu	neintenz.	A	N	CR	3594
110	37	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	23	138	137	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	2755
111	89	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	40,1	143	323	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	
112	91	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	11	116	234	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	4449
113	8	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	60	103	70	Flu	neintenz.	N	A	PD	2594
114	8	A	progrese	A	A	N	N	A	N	N	N	N	A	N	A	A	N	82,8	121	226	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	3938
115	48	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	23,4	149	168	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	4706
116	5	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	88	126	160	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	UNK	
117	3	A	progrese	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N		N	A	56,8	87,9	244	Flu	neintenz.	N	N	PD	3627
118	3	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	44	122	127	R-CHOP	neintenz.	A	N	PD	2253
119	17	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	19,2	125	189	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	PD	2758
120	77	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	24,3	141	247	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR	4085
121	8	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	26,7	146	288	Flu	neintenz.	A	N	CRu	3969
122	74	N		A	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N	A	A	N	36	99,7	167	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	2469
123	50	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A		N	N	22,6	148	255	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR	3875
124	76	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	23	154	228	Flu	neintenz.	A	N	CR	4915
125	50	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	78,5	126	151	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	4564
126	54	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	19,9	112	186	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CRu	3130
127	16	A	progrese	A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	18	129	714	Ost.neint.	neintenz.	N	N	CRu	2933

Č.	Poh.	Věk	Lok. vzorku	CD20	Cykl.	CD5	CD23	Prol.a.	Morf.v.	Archit.v.	EC.	Leu.	LDH/n	MIPI	b-MIPI	s-MIPI	Pr.	P.d.	KS	B-sv.
128	M	57	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	26,31	klasická	nodulární	1	10,4	1,25	5,92	6,48	5	A	25	4	A
129	M	66	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	30,22	klasická	nod.+dif.	0	9,51	1,17	6,16	6,81	5	A	9	4	A
130	Ž	63	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	64,38	pleomorfní	m.z.+dif.	0	8,1	2,40	6,42	7,80	6	A	7	4	N
131	M	73	hltan	poz.	poz.	poz.	síť FDB	30,06	small cell	nod.+dif.	1	8,09	1,18	6,35	6,99	6	A	63	4	N
132	M	65	polypy tl. střeva	poz.	poz.	poz.	poz.	24,74	klasická	difúzní	1	6,15	0,75	5,69	6,22	3	N	69	4	A
133	M	58	tvrdé patro	poz.	poz.	poz.	síť FDB	23,44	klas.+SC	difúzní	1	9,34	0,73	5,59	6,09	3	A	42	2	N
134	Ž	72	jazyk	poz.	poz.	neg.	neg.	26,38	klasická	nodulární	0	11,6	1,16	6,45	7,02	7	A	54	4	N
135	M	82	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	12,18	klasická	difúzní	0	5,52	0,67	6,18	6,44	3	A	16	1	N
136	M	79	tonsila	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	33,56	klasická	difúzní	0	6,85	0,86	6,31	7,03	5	A	12	4	N
137	M	80	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	neg.		klasická	T-interst.	1	23	2,71	7,52		9	A	1	4	N
138	Ž	64	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	46,46	klasická	nod.+dif.	0	7,75	1,05	5,94	6,94	5	A	19	2	N
139	M	65	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	37,21	small cell	difúzní	0	40	1,09	6,67	7,47	7	A	13	4	A
140	Ž	68	kořen jazyka	poz.	poz.	poz.	síť FDB	16,27	klasická	nodulární	0	7,47	1,01	6,05	6,40	5	N	62	4	N
141	M	67	uzlina	neh.	poz.	poz.	síť FDB	33,96	small cell	nodulární	1	429	1,65	7,96	8,69	8	A	12	4	A
142	Ž	59	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	neg.		klasická	T-interst.	2	63	3,41	8,02		9	A	12	4	A
143	M	62	tenké střev	poz.	poz.	poz.	síť FDB	30,14	klasická	m.z.+dif.	0	7,1	2,64	6,39	7,03	6	A	32	2	N
144	M	74	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	29,32	klasická	difúzní	1	6,07	1,35	6,35	6,98	5	A	2	4	A
145	Ž	59	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	56,75	klasická	m.z.+nod.	0	7,14	1,26	5,84	7,06	4	A	12	3	A
146	M	68	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	36,01	klasická	difúzní	0	7,52	1,11	6,11	6,88	5	A	10	4	N
147	M	67	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	22,82	klasická	difúzní	1	9,01	0,97	6,07	6,55	4	N	50	4	N
148	M	67	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	50,75	klasická	nod.+dif.	2	8,14	1,74	7,07	8,15	8	A	2	4	A
149	Ž	78	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	15,74	klasická	difúzní	1	95	0,88	7,36	7,70	7	A	23	4	A
150	M	58	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	9,00	klasická	difúzní	1	32,3	1,78	6,63	6,82	7	N	46	4	A
151	M	55	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	30,00	klasická	difúzní	2	10,4	0,97	6,40	7,04	6	A	43	4	A
152	M	76	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	neg.		klasická	T-interst.	0	9,48	0,89	6,36		5	N	43	4	N
153	Ž	71	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	neg.		klasická	T-interst.	0	12,2	1,33	6,52		7	A	2	4	A
154	Ž	69	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	31,98	klasická	m.z.+dif.	0	5,33	0,97	5,92	6,60	3	A	21	2	N
155	M	53	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	70,00	klasická	difúzní	2	90	3,16	7,91	9,41	9	A	8	4	A
156	M	53	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	11,19	klasická	nodulární	3	4	1,10	6,01	6,25	5	A	12	4	A
157	M	54	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	7,49	klasická	difúzní	1	8,4	0,93	5,55	5,71	3	N	128	3	N
158	M	46	tlusté střev	poz.	poz.	poz.	neg.	20,55	small cell	difúzní	0	UNK	0,97				N	125	4	
159	M	70	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	neg.	57,96	klasická	T-dif.	2	6,7	1,83	7,13	8,37	9	N	16	4	A

Č.	M.pr.	U.	Př.smrti	LU	GIT	J	CNS	P	PI	K	SZ	O	Ex.	Os.	KD	W	S	Ly.	Hb.	Tro.	Léčba I.linie	Typ léčby	Rit.	Rad.	Odp.	Spoč.b.
128	67	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	43	138	134	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	2950
129	19	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	39	147	117	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	2217
130	9	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	23,6	95	97	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	PD	1780
131	68	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	31,5	148	292	Ost.neint.	neintenz.	A	A	CR	5595
132	69	N		A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	34,4	90	356	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	5670
133	71	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	21	142	231	Ost.neint.	neintenz.	A	A	CR	1971
134	63	N		A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	11	126	317	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	4345
135	18	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	34,6	139	176	chir.res.		N	N	CRu	2841
136	20	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	20	135	131	Flu	neintenz.	A	N	PR	4345
137	1	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	57,8	126	252	Flu	neintenz.	N	N	PD	
138	20	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	30,1	153	171	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	2983
139	16	A	progrese	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	89,5	84	56	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR	3942
140	62	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	34,3	134	373	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR	4820
141	12	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	93,1	86,6	157	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR	4172
142	22	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	89,6	97	16	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	
143	60	N		A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	18,8	104	761	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR	2475
144	3	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	28,5	88	81,3	CVP	neintenz.	N	N	PD	3278
145	21	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	38	152	176	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	3223
146	20	A	progrese	A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	24,6	147	188	Ost.neint.	neintenz.	A	N	PR	3332
147	50	N		A	A	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N	N	14	133	164	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	4706
148	3	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	38	134	61,9	R-CHOP	neintenz.	A	N	PD	3380
149	23	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	94,2	118	179	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR	5815
150	46	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	77	81,9	13,1	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	
151	47	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	57	112	168	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	
152	43	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	46	146	252	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	
153	2	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	57	124	232	R-CHOP	neintenz.	A	N	PD	
154	21	A	UNK	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	28	129	300	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR	4618
155	20	A	progrese	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	66	131	288	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	
156	32	A	progrese	A	N	N	N	A	N	N	N	N	A	N	A	N	N	20	134	149	Int.bez ASCT	intenzivní	N	N	SD	4986
157	128	N		A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		147	223	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	3780
158	125	N		A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	30,1	151	244	Int.s ASCT	intenzivní	N	N	CR	5094
159	16	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	48,5	93	271	Ost.neint.	neintenz.	N	N	PR	2281

Č.	Poh.	Věk	Lok. vzorku	CD20	Cykl.	CD5	CD23	Prol.a.	Morf.v.	Archit.v.	EC.	Leu.	LDH/n	MIPI	b-MIPI	s-MIPI	Pr.	P.d.	KS	B-sy.
160	M	64	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	20,08	klasická	nodulární	1	6,5	0,74	5,67	6,10	3	A	30	4	A
161	M	86	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	15,74	klasická	m.zone	0	6,3	0,96	6,58	6,92	4	A	22	3	N
162	Ž	53	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	14,58	klas.+MZ	m.z.+dif.	0	8,6	0,98	5,56	5,87	3	N	115	3	N
163	M	57	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	11,64	klasická	nodulární	0	8,5	0,64	5,45	5,69	2	A	53	4	N
164	Ž	63	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	20,64	klasická	difúzní	0	9,5	1,09	6,01	6,46	5	A	10	4	N
165	M	66	slezina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	14,59	klasická	difúzní	0	6,1	0,92	5,84	6,15	3	N	103	4	N
166	M	49	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	20,04	klasická	nodulární	0	11,4	0,87	5,46	5,89	3	N	102	4	N
167	M	70	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	10,91	klasická	nodulární	2	10,5	1,26	7,08	7,32	9	A	13	4	A
168	M	60	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	13,55	klasická	nodulární	0	10,1	0,78	5,73	6,02	5	A	53	4	N
169	Ž	75	tlusté střevo	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	25,47	small cell	nodulární	0	9,4	0,48	5,94	6,49	4	A	12	4	N
170	M	55	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	20,73	klas.+MZ	nod.+dif.	0	7,9	0,68	5,37	5,82	3	A	20	4	N
171	M	58	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	19,82	klasická	nod.+dif.	0	27,7	1,47	6,45	6,87	6	A	1	4	N
172	M	62	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	32,32	MZ+SC	nod.+dif.	1	7,7	0,87	5,76	6,45	4	A	10	4	N
173	Ž	63	kostní dřev	poz.	poz.	neg.	nehod.			T-interst.	0	14	0,85	6,03		5	N	52	4	N
174	M	62	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	9,83	small cell	nodulární	2	28,5	1,18	7,17	7,38	9	A	18	4	A
175	M	65	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	19,08	klasická	nodulární	1	8,4	0,67	5,75	6,15	3	A	19	4	N
176	M	50	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	21,03	klasická	nodulární	0	14,3	0,57	5,34	5,79	3	A	13	4	N
177	M	73	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	35,24	klasická	nod.+dif.	1	6,5	0,67	5,93	6,68	4	A	0	4	N
178	M	76	kořen jazyka	poz.	poz.	poz.	poz.	19,56	klasická	difúzní	0	7,2	0,57	5,98	6,40	4	N	64	1	N
179	Ž	47	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	9,03	klasická	m.z.+dif.	2	3	1,73	5,95	6,15	5	A	43	4	A
180	M	75	mediastinum	poz.	poz.	poz.	neg.	30,76	klasická	difúzní	1	5,8	1,20	6,29	6,95	5	A	14	4	N
181	M	59	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	21,19	klasická	difúzní	0	5,6	1,02	5,62	6,07	3	N	61	4	N
182	Ž	63	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	3,83	klasická	nod.+dif.	0	22,7	1,00	6,32	6,40	7	N	41	4	N
183	M	61	slezina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	15,12	klas.+SC	nod.+dif.	0	8,1	1,50	6,07	6,39	6	N	54	4	N
184	Ž	70	žaludek	poz.	poz.	poz.	neg.	15,12	klasická	neh.	0	6,1	1,01	6,03	6,36	5	A	20	4	N
185	M	70	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	síť FDB	32,25	klasická	T-interst.	1	6,7	1,34	6,24	6,93	6	N	15	4	A
186	M	75	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	9,64	MZ+SC	nodulární	1	8,2	0,98	6,31	6,52	5	A	4	4	A
187	Ž	57	tlusté střevo	poz.	poz.	poz.	síť FDB	15,16	klasická	neh.	0	5,3	1,07	5,55	5,88	3	N	125	4	N
188	M	54	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	11,75	klasická	nodulární	1	5,4	1,47	5,64	5,90	3	A	48	4	N
189	Ž	58	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	15,10	klasická	nod.+dif.	0	9,9	0,59	5,49	5,81	2	A	39	4	N
190	Ž	71	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	30,20	klasická	nodulární	1	4,8	0,69	5,75	6,39	4	A	25	4	A
191	Ž	83	tonsila	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	15,66	small cell	difúzní	2	7,3	0,83	7,15	7,48	7	A	12	4	N

Č.	M.pr.	Ú.	Př.smrti	LU	GIT	J	CNS	P	PI	K	SZ	O	Ex.	Os.	KD	W	S	Ly.	Hb.	Tro.	Léčba I.linie	Typ léčby	Rit.	Rad.	Odp.	Spoč.b.
160	92	A	jiná	A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	30,5	128	178	Int.bez ASCT	intenzivní	N	N	CRu	3347
161	24	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		N	N	45	124	285	Flu	neintenz.	N	N	CR	4867
162	115	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	20,4	149	198	Int.s ASCT	intenzivní	N	N	CR	3264
163	97	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	N	24	149	273	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	3204
164	15	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	N	31,6	141	248	Int.bez ASCT	intenzivní	N	N	CR	3628
165	103	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	37,5	118	421	CHOP	neintenz.	N	N	PR	4195
166	102	N		A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	37,1	138	289	Int.s ASCT	intenzivní	N	N	PR	4456
167	19	A	progrese	A	N	A	N	N	N	N	N	N	A	N	A	N	A	84	101	152	CHOP	neintenz.	N	N	PD	5014
168	103	N		A	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N	A	A	N	12,3	134	196	CHOP	neintenz.	N	N	CRu	4044
169	16	A	progrese	A	A	N	N	A	N	N	N	A	N	N	A	N	N	8,8	83	369	CHOP	neintenz.	N	N	CR	2646
170	95	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	N	29,5	151	270	CHOP	neintenz.	N	N	CR	1852
171	3	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	95,5	127	156	CHOP	neintenz.	N	N	PD	3038
172	12	A	progrese	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	A	35,8	122	163	CHOP	neintenz.	N	N	PR	2172
173	93	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	59,9	150	214	CHOP	neintenz.	N	N	CR	
174	22	A	UNK	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	84	113	168	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR	5309
175	49	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	31	145	220	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR	4959
176	14	A	progrese	A	N	A	N	N	N	A	N	N	N	N	A	N	A	81	138	48	Flu	neintenz.	A	N	SD	5127
177	0,5	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	24,2	139	117	R-CHOP	neintenz.	A	N	PD	1680
178	64	A	jiná	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	39	156	255	Flu	neintenz.	A	A	CR	3624
179	46	A	komp.l.	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	15,8	102	72	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	PR	5667
180	30	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	29	134	195	CHOP	neintenz.	N	N	SD	3192
181	61	N		A	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N	N	38,5	104	229	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	PR	1491
182	41	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	74,5	149	226	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	4147
183	54	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	33,2	142	195	Int.s allo.	intenzivní	A	N	CR	2262
184	27	A	progrese	A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	37,1	143	264	R-CHOP	neintenz.	A	N	SD	2183
185	15	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	57,7	74	116	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	3798
186	4	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	25,2	130	195	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR	2831
187	125	N		A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	27,2	114	370	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	2559
188	75	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	20,5	119	298	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	4458
189	56	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	31,1	139	339	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CRu	4193
190	27	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N		117	96	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	5080
191	14	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N		104	253	CVP	neintenz.	N	N	SD	5684

Č.	Poh.	Věk	Lok. vzorku	CD20	Cykl.	CD5	CD23	Prol.a.	Morf.v.	Archit.v.	EC.	Leu.	LDH/n	MIPI	b-MIPI	s-MIPI	Pr.	P.d.	KS	B-sy.
192	Ž	72	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	25,54	klasická	nod.+dif.		5,9	2,79				N	78	4	A
193	Ž	76	kořen jazyka	poz.	poz.	poz.	neg.	15,02	klasická	difúzní	1	8,1	0,64	6,10	6,42	4	A	24	4	N
194	M	53	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	14,12	klasická	difúzní	1	4,8	0,80	5,20	5,50	2	N	39	3	N
195	M	70	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	19,87	small cell	neh.	1	114	0,94	7,19	7,61	7	A	23	4	A
196	M	55	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	23,58	klasická	nodulární	0	3,71	0,86	5,20	5,71	2	N	63	4	N
197	M	65	plíce	poz.	poz.	poz.	nehod.	31,47	klasická	neh.	1	172	2,23	7,69	8,37	8	A	2	4	N
198	M	78	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	16,46	klasická	nodulární	2	7,54	1,39	7,29	7,64	8	A	71	4	N
199	Ž	59	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	25,95	klasická	m.z.+nod.	1	7,93	0,92	5,70	6,26	3	A	44	4	N
200	M	70	uzlina	poz.	poz.	neg.	síť FDB	76,47	pleomorfní	difúzní	1	9,46	0,90	6,15	7,78	5	A	22	2	N
201	M	61	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	28,65	klasická	nodulární	0	8,99	1,17	5,96	6,58	5	A	6	4	N
202	M	72	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	32,02	klasická	nodulární	1	7,86	1,30	6,36	7,04	6	A	45	3	N
203	Ž	70	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	32,86	klasická	nodulární	1	5,66	1,01	6,01	6,71	5	A	15	4	N
204	M	77	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	58,04	klasická	nodulární	1	11,8	1,89	6,92	8,17	8	A	5	4	A
205	M	65	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	31,18	klasická	nodulární	1	11,9	1,27	6,27	6,94	6	A	2	4	A
206	M	67	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	27,38	klasická	difúzní	1	19,8	1,23	6,53	7,12	7	A	30	4	N
207	Ž	75	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	71,02	pleomorfní	difúzní	2	5,83	2,49	7,43	8,95	8	A	13	4	N
208	Ž	67	uzlina	poz.	poz.	neg.	síť FDB	73,28	pleomorfní	m.z.+dif.	1	4,15	1,54	6,02	7,59	5	A	11	4	A
209	M	60	uzlina	poz.	neg.	poz.	síť FDB	10,67	klasická	m.z.+dif.	1	16,4	0,86	5,99	6,22	6	N	53	4	N
210	Ž	80	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	46,93	klas.+SC	difúzní	2	5,9	1,25	7,20	8,20	7	A	18	4	N
211	Ž	64	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	47,09	klasická	m.z.+nod.	2	71,1	1,43	7,73	8,74	9	A	38	4	A
212	M	67	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	32,89	klas.+MZ	nodulární	1	8,42	0,90	5,99	6,69	4	A	47	4	N
213	M	66	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	54,91	klasická	m.z.+nod.	1	9,69	1,09	6,13	7,31	5	A	34	4	N
214	M	70	oční víčko	poz.	poz.	poz.	síť FDB	53,39	klasická	difúzní	0	8,1	0,84	6,04	7,18	5	N	52	3	N
215	Ž	76	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	55,31	klasická	m.z.+nod.	1	7,33	1,10	6,38	7,56	6	A	27	4	N
216	M	61	slezina	poz.	neh.	poz.	neg.	10,10	klasická	m.z.+nod.	1	24,2	0,68	6,04	6,26	6	A	5	4	A
217	M	66	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	10,68	klasická	difúzní	1	2	0,78	5,29	5,51	3	A	1	4	A
218	M	56	cékum	poz.	poz.	poz.	poz.	8,44	small cell	difúzní	1	9,2	0,82	5,58	5,76	3	N	106	4	A
219	M	76	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	42,44	klasická	nodulární	2	5,4	1,12	6,96	7,86	7	A	6	4	A
220	M	57	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	23,10	klasická	nodulární	0	11,8	0,87	5,76	6,25	4	A	39	4	N
221	Ž	63	tonsila	poz.	poz.	poz.	neg.	9,56	klasická	difúzní	3	9,7	1,08	6,71	6,92	7	A	16	4	A
222	Ž	74	tlusté střevo	poz.	poz.	poz.	síť FDB	33,43	klasická	difúzní	1	4,1	0,83	5,90	6,62	4	A	52	4	A
223	M	58	tenké střevo	poz.	poz.	poz.	síť FDB	30,14	klasická	difúzní	1	6,4	1,03	5,64	6,29	3	A	3	4	N

Č.	M.pr.	Ú.	Př.smrti	LU	GIT	J	CNS	P	PI	K	SZ	O	Ex.	Os.	KD	W	S	Ly.	Hb.	Tro.	Léčba I.linie	Typ léčby	Rit.	Rad.	Odp.	Spoč.b.
192	78	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	29,7	163	300	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	3860
193	39	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	28,9	116	344	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR	5547
194	39	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	19	154	220	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR	4951
195	27	A	progrese	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	93,1	104	74	CHOP	neintenz.	N	N	CR	795
196	63	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	29,4	143	155	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	4126
197	6	A	progrese	A	N	A	N	A	N	N	N	N	N	N	A	N	A	78	97	144	Int.bez ASCT	intenzivní	N	N	PD	1360
198	71	A	jiná	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	54	114	214	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	4951
199	82	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	A	28	132	212	R-CHOP	neintenz.	A	N	CRu	2266
200	35	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	34	150	283	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	2197
201	46	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	14	150	232	R-CHOP	neintenz.	A	N	PD	1773
202	65	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	19	136	197	R-CHOP	neintenz.	A	N	CRu	2592
203	15	A	progrese	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	27	123	175	R-CHOP	neintenz.	A	N	CRu	2094
204	5	A	progrese	A	A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	44	88	65	R-CHOP	neintenz.	A	N	PD	1430
205	2	A	progrese	A	N	A	N	N	N	N	N	N	A	N	A	N	A	21	98	100	R-CHOP	neintenz.	A	N	PD	1767
206	62	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	38	136	131	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR	4610
207	13	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	A	A	N	19	118	245	R-CHOP	neintenz.	A	N	CRu	2371
208	28	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	18	112	169	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	1774
209	53	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	68	136	189	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CRu	4460
210	23	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	23	92	213	CVP	neintenz.	A	N	CR	3437
211	54	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	14	82	15	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	2850
212	51	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N		154	146	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	1788
213	50	N		A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	25	146	159	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	2524
214	52	N		A	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	A	N	23	151	130	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	3111
215	31	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	42	115	180	CVP	neintenz.	A	N	CRu	2421
216	6	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	A	57	108	576	CHOP	neintenz.	N	N	PR	4723
217	1	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	N	A	48	102	46	CHOP	neintenz.	N	N	PD	5813
218	106	N		A	A	N	N	A	N	N	N	N	N	N	A	N	A	50,3	129	148	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR	3946
219	6	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	30	87	98	Flu	neintenz.	A	A	SD	3075
220	63	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	A	18	149	212	Flu	neintenz.	A	N	PR	4580
221	31	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	A	N	29,5	154	279	CVP	neintenz.	A	N	CRu	5292
222	68	A	jiná	A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	23,9	133	154	R-CHOP	neintenz.	A	A	CR	3952
223	3	A	jiná	A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	25,3	102	249	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	UNK	4160

Č.	Poh.	Věk	Lok. vzorku	CD20	Cykl.	CD5	CD23	Prol.a.	Morf.v.	Archit.v.	EC.	Leu.	LDH/n	MIPI	b-MIPI	s-MIPI	Pr.	P.d.	KS	B-sv.
224	Ž	81	kostní dřev	poz.	poz.	poz.	neg.		small cell	T-int.+dif.	3	8,7	1,05	7,29		8	A	23	4	A
225	Ž	57	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	40,20	klasická	difúzní	4	27,9	2,51	7,43	8,29	9	A	1	4	A
226	Ž	63	tlusté střevo	poz.	poz.		oj. FDB	22,26	klasická	difúzní	2	7,9	0,59	6,28	6,75	5	N	42	4	N
227	Ž	56	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	22,61	MZ-like	difúzní	1	5,3	0,91	5,42	5,90	2	A	8	4	N
228	M	61	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	17,98	klasická	nodulární	0	5,8	1,22	5,81	6,20	4	A	4	4	N
229	Ž	72	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	12,26	klasická	nod.+dif.	1	5,8	1,79	6,43	6,69	6	A	13	1	N
230	M	79	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	26,24	klas.+pleo.	nodulární	1	4,9	1,12	6,33	6,89	5	A	6		N
231	Ž	66	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	16,24	klasická	nod.+dif.	1	45,2	0,64	6,44	6,79	5	A	27	4	A
232	Ž	86	SŽ submand.	poz.	poz.	poz.	síť FDB	14,86	klasická	difúzní	1	5,4	0,91	6,49	6,81	4	A	7	2	N
233	M	56	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	42,19	klasická	nodulární	0	5,8	1,16	5,60	6,51	3	A	14	4	N
234	M	65	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	73,89	blastoidní	nod.+dif.	1	33	1,30	6,70	8,28	7	A	6	4	N
235	Ž	74	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	44,29	klasická	m.z.+nod.	2	10,1	1,04	7,10	8,05	9	A	20	4	A

Č.	M.pr.	Ú.	Př.smrti	LU	GIT	J	CNS	P	PI	K	SZ	O	Ex.	Os.	KD	W	S	Lv.	Hb.	Tro.	Léčba I.linie	Typ léčby	Rit.	Rad.	Odp.	Spoč.b.
224	23	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	44,6	94	203	Flu	neintenz.	N	N	PR	2793
225	1	A	progrese	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	32	84	44	CHOP	neintenz.	N	N	PD	4015
226	82	N		A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	17	118	161	Flu	neintenz.	A	N	CR	4416
227	8	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	18	140	206	Int.s allo.	intenzivní	A	N	UNK	3405
228	4	A	jiná	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	58	84	127	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	UNK	5323
229	76	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	26,2	126	211	CHOP	neintenz.	N	N	CR	3059
230	6	A	komp.l.	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		N	N	38,9	127	136	CHOP	neintenz.	N	A	UNK	2649
231	44	A	progrese	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	82	94	187	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR	5097
232	13	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N	32	110	218	jen radioterapie		N	A	PD	4415
233	28	A	progrese	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	32	130	210	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR	4309
234	7	A	progrese	A	N	A	N	A	N	N	N	N	N	N	A	N	N	75	139	254	R-CHOP	neintenz.	A	N	PD	2463
235	52	N		A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	68	67	115	CVP	neintenz.	N	N	CR	2100

Příloha 3 – Seznam 177 případů studie mikrovaskulární denzity v lymfomu z plášťových buněk

Č.	Poh.	Věk	Lok. vzorku	CD20	cykl.	CD5	CD23	Prol.a.	Morf.v.	Archit.v.	EC.	Leu.	LDH/n	MIPI	b-MIPI	s-MIPI
1	M	60	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	13,78	klasická	nodulární	1	12,3	UNK			
2	M	63	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	9,78	klasická	nodulární	2	6,8	0,65	6,26	6,47	5
3	Ž	54	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	13,52	klasická	nodulární	1	40,3	1,05	6,26	6,55	6
4	M	47	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	19,49	klas.+pleo.	difúzní	1	11,9	7,85	6,71	7,13	5
5	M	69	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	11,66	klasická	difúzní	1	7,3	UNK			
6	M	46	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	14,64	klasická	difúzní	2	11	1,06	6,16	6,47	6
7	M	44	slezina	poz.	poz.	poz.	nehod.	59,37	klasická	nodulární	3	14,1	5,58	7,17	8,44	7
8	M	66	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	21,70	klasická	difúzní	2	8	1,50	6,94	7,40	8
9	M	42	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	11,38	small cell	difúzní	2	53,2	1,58	6,89	7,14	8
10	M	70	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	29,45	klasická	m.z.+nod.	1	151	1,85	7,71	8,34	9
11	M	47	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	14,64	klasická	nodulární	1	12,1	0,79	5,36	5,67	3
12	M	39	uzlina	poz.	poz.	neg.	síť FDB	8,62	small cell	nodulární	1	5,5	0,85	4,80	4,98	1
13	M	53	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	2,84	small cell	nodulární	3	6,3	1,90	6,52	6,58	6
14	Ž	67	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	5,14	klasická	difúzní	2	2,7	1,08	6,34	6,45	6
15	M	49	tenké střevo	poz.	poz.	poz.	poz.	17,90	klas.+pleo.	nod.+dif.	1	9,7	0,61	5,19	5,57	1
16	M	67	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	28,78	klasická	nodulární	3	78,1	4,06	8,49	9,11	10
17	M	73	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	17,39	klasická	difúzní	1	7,5	1,23	6,34	6,71	6
18	M	68	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	73,15	klasická	nod.+dif.	2	6,6	2,23	7,16	8,73	7
19	M	72	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	56,97	MZ-like	nodulární	1	27,9	1,84	7,08	8,30	9
20	Ž	71	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	33,38	small cell	nod.+dif.	2	9,8	1,85	7,32	8,04	9
21	Ž	67	uzlina	poz.	poz.	neg.	oj. FDB	26,59	klasická	nod.+dif.	1	16	2,54	6,87	7,44	8
22	M	71	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	34,75	klas.+MZ	m.z.+nod.	2	6,5	1,11	6,85	7,59	7
23	M	73	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	16,77	klasická	m.z.+dif.	1	5	1,05	6,08	6,44	5
24	M	63	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	16,30	small cell	neh.	1	4,1	1,86	5,99	6,34	5
25	M	77	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	34,10	klasická	m.z.+nod.	1	6,8	1,05	6,35	7,08	6
26	M	58	tonsila	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	35,02	klasická	nodulární	1	7,96	0,56	5,37	6,13	2
27	Ž	76	uzlina	poz.	neg.	poz.	poz.	13,99	klasická	nodulární	1	8,6	1,31	6,54	6,84	6
28	M	73	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	80,10	klasická	difúzní	1	8,2	0,98	6,24	7,96	5
29	M	59	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	13,19	klasická	m.z.+dif.	1	4,2	0,89	5,42	5,71	2
30	M	53	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	22,50	MZ-like	nodulární	2	7,6	1,59	6,49	6,98	7
31	M	46	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	13,47	klasická	nodulární	0	5,3	0,69	4,90	5,19	1

C.	MVD	Pr.	P.d.	Ú.	Př.smrti	M.pr.	KD	KS	B-sy.	Ly.	Hb.	Tro.	Terapie I. linie	Typ léčby	Rit.	Rad.	Odp.
1	158,23	A	19	N		182	A	4	N	41	148	253	CHOP	neintenz.	N	N	CR
2	229,18	A	31	A	progrese	73	A	4	N	28	138	169	CHOP	neintenz.	N	N	PR
3	202,81	A	29	A	progrese	72	A	4	A	88	114	171	Int.s ASCT	intenzivní	N	N	CR
4	221,65	N	168	N		168	A	4	A		135	118	Int.s ASCT	intenzivní	N	N	CR
5	117,42	A	13	A	progrese	63	A	4	N		133	198	CHOP	neintenz.	N	N	SD
6	264,97	A	48	A	jiná	48	A	4	A		130	180	Int.s allo.	intenzivní	N	N	CR
7	449,58	A	4	A	progrese	6	A	4	A	67	91	36	CHOP	neintenz.	N	N	PR
8	180,84	A	9	A	jiná	12	A	4	A		142	143	CHOP	neintenz.	N	N	PR
9	221,65	A	20	A	jiná	30	A	4	A	89	68	47	Int.s ASCT	intenzivní	N	N	CR
10	163,88	A	18	A	progrese	24	A	4	A	96	5	176	CHOP	neintenz.	N	N	PR
11	198,42	A	20	A	progrese	59	N	2	N				CHOP	neintenz.	N	A	CR
12	251,79	A	43	N		150	A	4	N	35	170	198	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR
13	447,69	A	21	A	progrese	41	A	4	A	43	90	196	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR
14	148,19	A	24	A	progrese	60	A	4	A	21	115	134	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR
15	194,02	A	46	N		117	A	4	A	26	128	185	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR
16	135	A	4	A	progrese	5	A	4	A	88	61	42	Ost.neint.	neintenz.	N	N	PD
17	189,63	A	22	A	progrese	32	A	4	N	22	149	135	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR
18	133,12	A	1	A	jiná	1	A	4	A	16	135	46	CHOP	neintenz.	N	N	UNK
19	203,44	A	25	A	jiná	38	A	4	N	64	125	233	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
20	249,91	A	6	A	progrese	8	A	4	A	60	103	250	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR
21	97,953	A	23	A	progrese	41	A	4	A	23	122	59	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR
22	291,35	A	15	A	progrese	18	A	4	A	29	152	79	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	PR
23	94,813	A	7	A	progrese	29	N	3	N	50	154	193	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
24	131,86	A	48	A	progrese	94	A	4	N	52	111	122	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR
25	264,97	A	17	A	progrese	21	A	4	A	23	143	243	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
26	128,09	A	41	A	jiná	47	N	3	N		135	274	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR
27	111,14	N	3	N		3	N	3	N	20	134	201	CHOP	neintenz.	N	N	CRu
28	140,02	A	24	A	progrese	32	N	2	N	39	135	232	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
29	106,74	A	21	N		124	A	4	N				CHOP	neintenz.	N	N	PR
30	260,58	A	2	A	progrese	3	A	4	A	32	86	98	CHOP	neintenz.	N	N	PD
31	153,21	A	67	N		121	N	3	N	23	159	214	CHOP	neintenz.	N	N	CR

Č.	Poh.	Věk	Lok. vzorku	CD20	cykl.	CD5	CD23	Prol.a.	Morf.v.	Archit.v.	EC.	Leu.	LDH/n	MIPI	b-MIPI	s-MIPI
32	M	64	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	32,36	klasická	difúzní	1	9,4	1,12	6,06	6,75	5
33	M	67	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	12,80	klasická	m.z.+nod.	0	6,1	0,60	5,62	5,89	2
34	Ž	68	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	7,54	klasická	m.z.+nod.	1	7,8	1,35	6,24	6,40	5
35	M	60	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	32,06	klasická	nod.+dif.	1	5,4	1,25	5,76	6,44	4
36	Ž	59	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	20,32	klasická	nod.+dif.	2	44,6	1,34	7,32	7,76	8
37	Ž	63	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	35,51	klasická	difúzní	0	5,8	0,61	5,47	6,23	2
38	M	62	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	10,99	klasická	difúzní	1	6,9	1,01	5,81	6,04	5
39	M	74	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	6,81	klasická	difúzní	1	38,6	0,83	6,81	6,96	7
40	M	80	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	16,17	klasická	m.z.+nod.	3	3,3	0,96	6,81	7,15	6
41	M	61	tonsila	poz.	poz.		neg.	59,21	klasická	difúzní	1	8,8	0,87	5,78	7,05	4
42	M	44	dutina ústní	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	7,94	small cell	neh.	0	6,5	0,79	5,00	5,17	1
43	M	73	tonsila	poz.	poz.	poz.	neg.	38,15	pleomorfní	difúzní	0	8,6	0,58	5,96	6,77	4
44	M	64	orbita	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	6,78	klasická	nodulární	1	5,7	0,75	5,62	5,76	3
45	M	52	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	24,14	klasická	difúzní	2	14,4	2,05	6,87	7,39	8
46	Ž	28	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	21,96	small cell	difúzní	0	8,5	0,86	4,59	5,06	2
47	Ž	85	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	8,25	klas.+MZ	nodulární	2	8,12	0,72	7,18	7,36	7
48	M	63	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	16,41	klasická	nodulární	2	6,4	1,73	6,83	7,18	7
49	Ž	57	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	17,35	small cell	difúzní	1	7,6	1,33	5,87	6,24	4
50	M	49	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	8,26	klasická	difúzní	1	7,9	1,78	5,74	5,91	4
51	M	60	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	64,32	pleomorfní	difúzní	2	29,2	2,81	7,63	9,00	10
52	Ž	69	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	13,15	klasická	nodulární	1	2,2	0,56	5,23	5,51	2
53	Ž	78	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	10,98	klasická	difúzní	3	3,7	0,91	6,75	6,98	6
54	M	59	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	35,37	klasická	nodulární	0	6,5	0,59	5,36	6,11	1
55	M	55	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	25,50	small cell	m.z.+dif.	1	6,9	0,84	5,44	5,99	3
56	M	69	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	11,35	klasická	nodulární	2	23,8	1,16	7,34	7,58	9
57	Ž	62	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	18,04	klas.+MZ	nodulární	2	2,2	1,22	6,15	6,53	6
58	M	65	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	21,07	klasická	nod.+dif.	2	21,5	0,92	7,01	7,47	8
59	Ž	60	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	53,45	klasická	difúzní	1	3,5	1,66	5,75	6,90	5
60	Ž	53	sliznice rekta	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	29,30	klasická	difúzní	1	17,5	1,12	5,93	6,56	6
61	Ž	50	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	52,00	klasická	nod.+dif.	3	16,6	2,22	6,90	8,02	9
62	Ž	59	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	38,41	klasická	difúzní	1	4,7	1,43	5,75	6,57	3
63	M	62	uzlina	poz.	poz.	neg.	sít' FDB	9,56	klas.+MZ	m.z.+nod.	1	15,6	0,93	6,09	6,29	6
64	M	74	tonsila	poz.	poz.	poz.	nehod.	25,33	MZ-like	nod.+dif.	0	5,9	0,96	6,14	6,68	4

Č.	MVD	Pr.	P.d.	Ú.	Př.smrti	M.pr.	KD	KS	B-sv.	Lv.	Hb.	Tro.	Terapie I. linie	Typ léčby	Rit.	Rad.	Odp.
32	352,88	A	2	A	progrese	19	A	4	N	51	164	139	Int.bez ASCT	intenzivní	N	N	PD
33	154,46	A	46	A	jiná	46	N	1	A	18	162	217	Flu	neintenz.	N	N	CR
34	170,79	A	24	N		103	A	4	A	33	101	124	CHOP	neintenz.	N	N	PR
35	230,44	A	24	A	UNK	97	A	4	A	28	130	128	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
36	185,23	A	38	A	komp.l.	78	A	4	A	74	109	203	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR
37	67,186	N	78	N		78	A	4	N	33	140	237	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
38	114,28	A	32	A	jiná	54	A	4	A	12	141	269	Flu	neintenz.	A	N	CR
39	264,97	A	22	A	progrese	29	A	4	N	83	149	311	Flu	neintenz.	A	A	CR
40	208,46	A	5	A	progrese	5	A	4	A	36,9	91	56	CVP	neintenz.	N	N	SD
41	113,02	A	6	A	progrese	13	N	3	A	27,8	136	165	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	PD
42	336,56	A	47	N		71	N	3	N	30	152	278	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR
43	129,98	A	13	A	jiná	18	N	2	N	24,9	148	310	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
44	206,58	A	9	A	jiná	9	A	4	N	19,7	155	173	Flu	neintenz.	A	N	SD
45	339,07	A	11	N		58	A	4	A	69,2	78	92	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	PR
46	143,16	N	61	N		61	A	4	N	35	148	256	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR
47	179,12	A	18	A	progrese	18	A	4	A	40,2	109	222	CVP	neintenz.	N	N	SD
48	186,49	N	56	N		56	A	4	A	26	124	201	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR
49	109,26	N	54	N		54	A	4	A		110	357	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CRu
50	69,697	N	52	N		52	A	4	A	16,7	117	262	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR
51	129,35	A	10	A	progrese	11	A	4	A	69,6	99	63	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	PR
52	197,79	A	35	A	progrese	100	A	4	A	20	121	206	CHOP	neintenz.	N	N	CRu
53	126,21	A	14	A	progrese	72	A	4	A	15,3	117	124	Ost.neint.	neintenz.	N	N	PR
54	182,09	A	25	N		131	N	3	N	22,9	155	250	CHOP	neintenz.	N	N	CR
55	119,93	A	106	A	jiná	106	N	3	N	26,1	142	225	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
56	145,67	A	3	A	progrese	5	A	4	A	65	130	227	CHOP	neintenz.	N	N	PD
57	67,186	A	53	A	progrese	69	N	3	A	15	134	196	Int.bez ASCT	intenzivní	A	A	CR
58	183,35	A	19	A	progrese	32	A	4	A	15,3	146	219	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
59	190,25	A	87	A	progrese	89	N	3	A	34	125	170	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
60	141,09	A	13	A	progrese	17	A	4	A	49	115	278	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	PR
61	307,67	N	101	N		101	A	4	A	43	111	73	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
62	109,88	A	64	N		102	A	4	A	56	112	134	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
63	138,14	A	1	A	jiná	1	A	4	A	20	85	546	Int.bez ASCT	intenzivní	N	N	UNK
64	136,88	N	98	N		98	A	4	N	54,3	155	194	Flu	neintenz.	A	N	CR

Č.	Poh.	Věk	Lok. vzorku	CD20	cykl.	CD5	CD23	Prol.a.	Morf.v.	Archit.v.	EC.	Leu.	LDH/n	MIPI	b-MIPI	s-MIPI
65	M	54	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	19,90	klasická	difúzní	0	8,65	1,23	5,73	6,16	4
66	M	73	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	4,90	klasická	difúzní	1	8,89	0,62	6,01	6,11	4
67	Ž	80	slezina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	60,55	klasická	difúzní	2	14,6	1,08	7,48	8,78	9
68	M	70	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	12,48	klasická	difúzní	0	12,4	1,02	6,33	6,60	7
69	M	79	orbita	poz.	poz.	poz.	síť FDB	33,29	klasická	nod.+dif.	1	10,9	0,92	6,54	7,25	6
70	M	49	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	46,51	klas.+MZ	nodulární	1	5,7	1,31	5,42	6,42	2
71	Ž	79	tonsila	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	27,20	klasická	difúzní	1	5,5	0,85	6,21	6,79	4
72	Ž	58	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	18,14	klasická	nodulární	0	8	0,56	5,37	5,76	2
73	Ž	55	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	45,06	klasická	nod.+dif.	0	9,55	0,90	5,62	6,59	3
74	M	67	duodenum	poz.	poz.	poz.	síť FDB	17,53	klasická	nod.+dif.	0	7,8	0,93	5,98	6,36	4
75	Ž	32	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	57,75	klasická	nod.+dif.	0	6,11	0,96	4,66	5,90	1
76	M	51	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	18,61	klasická	nodulární	1	7,3	3,86	6,23	6,63	5
77	M	76	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	29,99	klasická	nodulární	2	15,9	0,94	7,29	7,94	9
78	M	64	uzlina	poz.	poz.		síť FDB	66,48	klasická	difúzní	4	43,7	1,27	7,46	8,88	9
79	M	78	kořen jazyka	poz.	poz.	poz.	poz.	11,81	klasická	difúzní	0	4,5	0,58	5,87	6,12	3
80	Ž	82	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	24,23	klasická	nodulární	3	15,1	1,03	7,54	8,06	10
81	M	55	uzlina	poz.	neg.	poz.	poz.	42,21	pleomorfní	difúzní	2	10,4	4,34	7,29	8,19	8
82	Ž	37	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	73,97	blastoidní	difúzní	0	5,38	1,39	5,01	6,59	2
83	M	67	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	18,12	klas.+MZ	m.z.+dif.	0	7,92	0,98	6,02	6,40	4
84	M	72	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	19,22	klasická	m.z.+nod.	1	7,53	1,40	6,39	6,80	6
85	M	37	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	8,14	klas.+MZ	nodulární	0	5,74	0,80	4,71	4,88	1
86	M	70	hrudní stěna	poz.	poz.	poz.	neg.	28,34	klasická	difúzní	3	8,64	1,37	7,06	7,67	8
87	M	74	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	17,92	klasická	nod.+dif.	0	8,88	1,03	6,34	6,72	6
88	M	56	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	17,09	klasická	m.z.+nod.	0	37,3	0,83	6,16	6,53	5
89	M	53	uzlina	poz.	poz.	poz.	neg.	25,18	klasická	difúzní	2	7,42	1,70	6,52	7,06	7
90	Ž	76	uzlina	poz.	poz.	poz.	neg.	38,60	pleomorfní	difúzní	2	9,39	1,79	7,46	8,29	9
91	M	57	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	26,31	klasická	nodulární	1	10,4	1,25	5,92	6,48	5
92	M	66	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	30,22	klasická	nod.+dif.	0	9,51	1,17	6,16	6,81	5
93	Ž	63	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	64,38	pleomorfní	m.z.+dif.	0	8,1	2,40	6,42	7,80	6
94	M	73	hltan	poz.	poz.	poz.	síť FDB	30,06	small cell	nod.+dif.	1	8,09	1,18	6,35	6,99	6
95	M	58	tvrdé patro	poz.	poz.	poz.	síť FDB	23,44	klas.+SC	difúzní	1	9,34	0,73	5,59	6,09	3
96	Ž	72	jazyk	poz.	poz.	neg.	neg.	26,38	klasická	nodulární	0	11,6	1,16	6,45	7,02	7
97	M	82	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	12,18	klasická	difúzní	0	5,52	0,67	6,18	6,44	3

Č.	MVD	Pr.	P.d.	Ú.	Př.smrti	M.pr.	KD	KS	B-sv.	Lv.	Hb.	Tro.	Terapie I. linie	Typ léčby	Rit.	Rad.	Odp.
65	127,46	A	17	A	progrese	31	A	4	A	21	134	190	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
66	176,44	A	49	N		98	A	4	A	69	103	79	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
67	109,26	A	1	A	progrese	2	A	4	A	22	106	688	Flu	neintenz.	N	N	PD
68	112,39	A	16	A	progrese	63	A	4	N	16	166	191	R-CHOP	neintenz.	A	N	CRu
69	124,32	A	13	A	progrese	17	A	4	A	59	118	170	CVP	neintenz.	N	A	PR
70	116,16	A	6	A	progrese	7	A	4	N	21	148	271	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	PD
71	60,146	A	8	A	progrese	17	A	4	A	17	117	298	CVP	neintenz.	N	N	CRu
72	206,58	N	84	N		84	A	4	N	13,4	152	185	Flu	neintenz.	A	N	CR
73	204,07	A	21	N		91	A	4	N	27	150	208	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
74	350,73	A	22	N		88	A	4	N	27,7	151	242	Flu	neintenz.	A	N	CR
75	158,23	A	25	A	jiná	37	A	4	N	23	138	137	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
76	103,6	A	52	N		91	A	4	A	11	116	234	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
77	109,26	A	5	A	progrese	8	A	4	A	60	103	70	Flu	neintenz.	N	A	PD
78	196,53	A	5	A	progrese	8	A	4	A	82,8	121	226	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
79	75,348	N	48	N		48	N	2	N	23,4	149	168	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
80	236,72	A	2	A	progrese	3		4	A	56,8	88	244	Flu	neintenz.	N	N	PD
81	287,58	A	2	A	progrese	3	A	4	A	44	122	127	R-CHOP	neintenz.	A	N	PD
82	142,53	A	6	A	progrese	17	N	3	N	19,2	125	189	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	PD
83	144,42	A	60	N		77	N	2	N	24,3	141	247	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR
84	157,6	A	8	A	jiná	8	A	4	N	26,7	146	288	Flu	neintenz.	A	N	CRu
85	153,84	A	38	N		74	A	4	N	36	100	167	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
86	219,77	A	26	A	progrese	50		4	N	22,6	148	255	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR
87	239,23	A	57	N		76	A	4	A	23	154	228	Flu	neintenz.	A	N	CR
88	340,32	A	28	A	progrese	50	A	4	N	78,5	126	151	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
89	110,51	A	19	A	progrese	54	A	4	N	19,9	112	186	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CRu
90	120,56	A	16	A	progrese	16	N	4	N	18	129	714	Ost.neint.	neintenz.	N	N	CRu
91	126,21	A	25	N		67	A	4	A	43	138	134	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
92	102,35	A	9	A	progrese	19	A	4	A	39	147	117	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
93	232,95	A	7	A	progrese	9	A	4	N	23,6	95	97	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	PD
94	220,1	A	63	N		68	A	4	N	31,5	148	292	Ost.neint.	neintenz.	A	A	CR
95	173,3	A	42	N		71	N	2	N	21	142	231	Ost.neint.	neintenz.	A	A	CR
96	111,77	A	54	N		63	N	4	N	11	126	317	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
97	99,837	A	16	A	progrese	18	N	1	N	34,6	139	176	chir.res.		N	N	CRu

Č.	Poh.	Věk	Lok. vzorku	CD20	cykl.	CD5	CD23	Prol.a.	Morf.v.	Archit.v.	EC.	Leu.	LDH/n	MIPI	b-MIPI	s-MIPI
98	M	79	tonsila	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	33,56	klasická	difúzní	0	6,85	0,86	6,31	7,03	5
99	Ž	64	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	46,46	klasická	nod.+dif.	0	7,75	1,05	5,94	6,94	5
100	Ž	68	kořen jazyka	poz.	poz.	poz.	síť FDB	16,27	klasická	nodulární	0	7,47	1,01	6,05	6,40	5
101	M	67	uzlina	neh.	poz.	poz.	síť FDB	33,96	small cell	nodulární	1	429	1,65	7,96	8,69	8
102	M	62	tenké střevo	poz.	poz.	poz.	síť FDB	30,14	klasická	m.z.+dif.	0	7,1	2,64	6,39	7,03	6
103	M	74	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	29,32	klasická	difúzní	1	6,07	1,35	6,35	6,98	5
104	Ž	59	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	56,75	klasická	m.z.+nod.	0	7,14	1,26	5,84	7,06	4
105	M	67	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	22,82	klasická	difúzní	1	9,01	0,97	6,07	6,55	4
106	M	67	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	50,75	klasická	nod.+dif.	2	8,14	1,74	7,07	8,15	8
107	Ž	78	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	15,74	klasická	difúzní	1	95	0,88	7,36	7,70	7
108	Ž	69	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	31,98	klasická	m.z.+dif.	0	5,33	0,97	5,92	6,60	3
109	M	53	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	11,19	klasická	nodulární	3	4	1,10	6,01	6,25	5
110	M	54	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	7,49	klasická	difúzní	1	8,4	0,93	5,55	5,71	3
111	M	64	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	20,08	klasická	nodulární	1	6,5	0,74	5,67	6,10	3
112	M	86	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	15,74	klasická	m.zone	0	6,3	0,96	6,58	6,92	4
113	Ž	53	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	14,58	klas.+MZ	m.z.+dif.	0	8,6	0,98	5,56	5,87	3
114	M	57	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	11,64	klasická	nodulární	0	8,5	0,64	5,45	5,69	2
115	Ž	63	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	20,64	klasická	difúzní	0	9,5	1,09	6,01	6,46	5
116	M	66	slezina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	14,59	klasická	difúzní	0	6,1	0,92	5,84	6,15	3
117	M	49	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	20,04	klasická	nodulární	0	11,4	0,87	5,46	5,89	3
118	M	70	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	10,91	klasická	nodulární	2	10,5	1,26	7,08	7,32	9
119	M	60	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	13,55	klasická	nodulární	0	10,1	0,78	5,73	6,02	5
120	Ž	75	tlusté střevo	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	25,47	small cell	nodulární	0	9,4	0,48	5,94	6,49	4
121	M	55	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	20,73	klas.+MZ	nod.+dif.	0	7,9	0,68	5,37	5,82	3
122	M	58	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	19,82	klasická	nod.+dif.	0	27,7	1,47	6,45	6,87	6
123	M	62	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	32,32	MZ+SC	nod.+dif.	1	7,7	0,87	5,76	6,45	4
124	M	62	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	9,83	small cell	nodulární	2	28,5	1,18	7,17	7,38	9
125	M	65	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	19,08	klasická	nodulární	1	8,4	0,67	5,75	6,15	3
126	M	50	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	21,03	klasická	nodulární	0	14,3	0,57	5,34	5,79	3
127	M	73	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	35,24	klasická	nod.+dif.	1	6,5	0,67	5,93	6,68	4
128	M	76	kořen jazyka	poz.	poz.	poz.	poz.	19,56	klasická	difúzní	0	7,2	0,57	5,98	6,40	4
129	Ž	47	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	9,03	klasická	m.z.+dif.	2	3	1,73	5,95	6,15	5
130	M	75	mediastinum	poz.	poz.	poz.	neg.	30,76	klasická	difúzní	1	5,8	1,20	6,29	6,95	5

Č.	MVD	Pr.	P.d.	Ú.	Př.smrti	M.pr.	KD	KS	B-sv.	Lv.	Hb.	Tro.	Terapie I. linie	Typ léčby	Rit.	Rad.	Odp.
98	245,51	A	12	A	progrese	20	A	4	N	20	135	131	Flu	neintenz.	A	N	PR
99	123,07	A	19	A	progrese	20	N	2	N	30,1	153	171	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
100	57,139	N	62	N		62	A	4	N	34,3	134	373	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR
101	141,28	A	12	A	progrese	12	A	4	A	93,1	87	157	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR
102	79,116	A	32	N		60	N	2	N	18,8	104	761	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR
103	194,65	A	2	A	progrese	3	A	4	A	28,5	88	81,3	CVP	neintenz.	N	N	PD
104	99,209	A	12	A	progrese	21	N	3	A	38	152	176	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR
105	109,88	N	50	N		50	N	4	N	14	133	164	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR
106	98,581	A	2	A	progrese	3	A	4	A	38	134	61,9	R-CHOP	neintenz.	A	N	PD
107	219,77	A	23	A	progrese	23	A	4	A	94,2	118	179	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR
108	79,744	A	21	A	jiná	21	N	2	N	28	129	300	Ost.neint.	neintenz.	A	N	CR
109	165,14	A	12	A	progrese	32	A	4	A	20	134	149	Int.bez ASCT	intenzivní	N	N	SD
110	121,19	N	128	N		128	N	3	N		147	223	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR
111	117,42	A	30	A	jiná	92	A	4	A	30,5	128	178	Int.bez ASCT	intenzivní	N	N	CRu
112	180,21	A	22	A	progrese	24		3	N	45	124	285	Flu	neintenz.	N	N	CR
113	112,39	N	115	N		115	N	3	N	20,4	149	198	Int.s ASCT	intenzivní	N	N	CR
114	175,18	A	53	A	progrese	97	A	4	N	24	149	273	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR
115	165,14	A	10	A	progrese	15	A	4	N	31,6	141	248	Int.bez ASCT	intenzivní	N	N	CR
116	205,95	N	103	N		103	A	4	N	37,5	118	421	CHOP	neintenz.	N	N	PR
117	138,77	N	102	N		102	A	4	N	37,1	138	289	Int.s ASCT	intenzivní	N	N	PR
118	168,28	A	13	A	progrese	19	A	4	A	84	101	152	CHOP	neintenz.	N	N	PD
119	117,42	A	53	N		103	A	4	N	12,3	134	196	CHOP	neintenz.	N	N	CRu
120	113,02	A	12	A	progrese	16	A	4	N	8,8	83	369	CHOP	neintenz.	N	N	CR
121	88,534	A	20	N		95	N	4	N	29,5	151	270	CHOP	neintenz.	N	N	CR
122	99,209	A	1	A	progrese	3	A	4	N	95,5	127	156	CHOP	neintenz.	N	N	PD
123	211,6	A	10	A	progrese	12	A	4	N	35,8	122	163	CHOP	neintenz.	N	N	PR
124	87,278	A	18	A	jiná	22	A	4	A	84	113	168	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR
125	74,026	A	19	N		49	A	4	N	31	145	220	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR
126	136,88	A	13	A	progrese	14	A	4	N	81	138	48	Flu	neintenz.	A	N	SD
127	80,636	A	0	A	progrese	0,5	A	4	N	24,2	139	117	R-CHOP	neintenz.	A	N	PD
128	122,44	N	64	A	jiná	64	N	1	N	39	156	255	Flu	neintenz.	A	A	CR
129	503,58	A	43	A	komp.l.	46	A	4	A	15,8	102	72	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	PR
130	312,07	A	14	A	progrese	30	A	4	N	29	134	195	CHOP	neintenz.	N	N	SD

Č.	Poh.	Věk	Lok. vzorku	CD20	cykl.	CD5	CD23	Prol.a.	Morf.v.	Archit.v.	EC.	Leu.	LDH/n	MIPI	b-MIPI	s-MIPI
131	M	59	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	21,19	klasická	difúzní	0	5,6	1,02	5,62	6,07	3
132	Ž	63	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	3,83	klasická	nod.+dif.	0	22,7	1,00	6,32	6,40	7
133	M	61	slezina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	15,12	klas.+SC	nod.+dif.	0	8,1	1,50	6,07	6,39	6
134	M	54	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	11,75	klasická	nodulární	1	5,4	1,47	5,64	5,90	3
135	Ž	58	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	15,10	klasická	nod.+dif.	0	9,9	0,59	5,49	5,81	2
136	Ž	71	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	30,20	klasická	nodulární	1	4,8	0,69	5,75	6,39	4
137	Ž	72	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	25,54	klasická	nod.+dif.		5,9	2,79			
138	Ž	76	kořen jazyka	poz.	poz.	poz.	neg.	15,02	klasická	difúzní	1	8,1	0,64	6,10	6,42	4
139	M	53	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	14,12	klasická	difúzní	1	4,8	0,80	5,20	5,50	2
140	M	55	tonsila	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	23,58	klasická	nodulární	0	3,71	0,86	5,20	5,71	2
141	M	78	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	16,46	klasická	nodulární	2	7,54	1,39	7,29	7,64	8
142	Ž	59	tonsila	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	25,95	klasická	m.z.+nod.	1	7,93	0,92	5,70	6,26	3
143	M	70	uzlina	poz.	poz.	neg.	sít' FDB	76,47	pleomorfní	difúzní	1	9,46	0,90	6,15	7,78	5
144	M	61	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	28,65	klasická	nodulární	0	8,99	1,17	5,96	6,58	5
145	M	72	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	32,02	klasická	nodulární	1	7,86	1,30	6,36	7,04	6
146	Ž	70	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	32,86	klasická	nodulární	1	5,66	1,01	6,01	6,71	5
147	M	77	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	58,04	klasická	nodulární	1	11,8	1,89	6,92	8,17	8
148	M	65	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	31,18	klasická	nodulární	1	11,9	1,27	6,27	6,94	6
149	Ž	75	uzlina	poz.	poz.	poz.	poz.	71,02	pleomorfní	difúzní	2	5,83	2,49	7,43	8,95	8
150	Ž	67	uzlina	poz.	poz.	neg.	sít' FDB	73,28	pleomorfní	m.z.+dif.	1	4,15	1,54	6,02	7,59	5
151	M	60	uzlina	poz.	neg.	poz.	sít' FDB	10,67	klasická	m.z.+dif.	1	16,4	0,86	5,99	6,22	6
152	Ž	80	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	46,93	klas.+SC	difúzní	2	5,9	1,25	7,20	8,20	7
153	Ž	64	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	47,09	klasická	m.z.+nod.	2	71,1	1,43	7,73	8,74	9
154	M	67	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	32,89	klas.+MZ	nodulární	1	8,42	0,90	5,99	6,69	4
155	M	66	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	54,91	klasická	m.z.+nod.	1	9,69	1,09	6,13	7,31	5
156	Ž	76	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	55,31	klasická	m.z.+nod.	1	7,33	1,10	6,38	7,56	6
157	M	61	slezina	poz.	neh.	poz.	neg.	10,10	klasická	m.z.+nod.	1	24,2	0,68	6,04	6,26	6
158	M	66	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	10,68	klasická	difúzní	1	2	0,78	5,29	5,51	3
159	M	56	cékum	poz.	poz.	poz.	poz.	8,44	small cell	difúzní	1	9,2	0,82	5,58	5,76	3
160	M	76	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	42,44	klasická	nodulární	2	5,4	1,12	6,96	7,86	7
161	M	57	uzlina	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	23,10	klasická	nodulární	0	11,8	0,87	5,76	6,25	4
162	Ž	63	tonsila	poz.	poz.	poz.	neg.	9,56	klasická	difúzní	3	9,7	1,08	6,71	6,92	7
163	Ž	74	tlusté střevo	poz.	poz.	poz.	sít' FDB	33,43	klasická	difúzní	1	4,1	0,83	5,90	6,62	4

Č.	MVD	Pr.	P.d.	Ú.	Př.smrti	M.pr.	KD	KS	B-sv.	Lv.	Hb.	Tro.	Terapie I. linie	Typ léčby	Rit.	Rad.	Odp.
131	76,604	N	61	N		61	N	4	N	38,5	104	229	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	PR
132	192,77	N	41	N		41	A	4	N	74,5	149	226	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
133	109,88	N	54	N		54	A	4	N	33,2	142	195	Int.s allo.	intenzivní	A	N	CR
134	180,84	A	48	A	progrese	75	A	4	N	20,5	119	298	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR
135	74,72	A	39	A	progrese	56	A	4	N	31,1	139	339	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CRu
136	185,86	A	25	A	progrese	27	A	4	A		117	96	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
137	99,837	N	78	N		78	A	4	A	29,7	163	300	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
138	194,02	A	24	A	progrese	39	A	4	N	28,9	116	344	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR
139	190,25	N	39	N		39	N	3	N	19	154	220	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CR
140	196,53	N	63	N		63	A	4	N	29,4	143	155	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR
141	201,56	A	71	A	jiná	71	A	4	N	54	114	214	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
142	210,98	A	44	N		82	A	4	N	28	132	212	R-CHOP	neintenz.	A	N	CRu
143	155,72	A	22	A	progrese	35	N	2	N	34	150	283	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
144	128,09	A	6	A	progrese	46	A	4	N	14	150	232	R-CHOP	neintenz.	A	N	PD
145	131,86	A	45	N		65	N	3	N	19	136	197	R-CHOP	neintenz.	A	N	CRu
146	141,91	A	15	A	progrese	15	A	4	N	27	123	175	R-CHOP	neintenz.	A	N	CRu
147	372,35	A	5	A	progrese	5	A	4	A	44	88	65	R-CHOP	neintenz.	A	N	PD
148	207,84	A	2	A	progrese	2	A	4	A	21	98	100	R-CHOP	neintenz.	A	N	PD
149	200,93	A	13	A	jiná	13	A	4	N	19	118	245	R-CHOP	neintenz.	A	N	CRu
150	186,49	A	11	A	progrese	28	A	4	A	18	112	169	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
151	197,16	N	53	N		53	A	4	N	68	136	189	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	CRu
152	209,09	A	18	A	jiná	23	A	4	N	23	92	213	CVP	neintenz.	A	N	CR
153	271,88	A	38	N		54	A	4	A	14	82	15	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
154	136,25	A	47	N		51	A	4	N		154	146	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
155	137,51	A	34	N		50	A	4	N	25	146	159	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
156	129,98	A	27	A	jiná	31	A	4	N	42	115	180	CVP	neintenz.	A	N	CRu
157	101,09	A	5	A	progrese	6	A	4	A	57	108	576	CHOP	neintenz.	N	N	PR
158	238,6	A	1	A	progrese	1	A	4	A	48	102	46	CHOP	neintenz.	N	N	PD
159	150,7	N	106	N		106	A	4	A	50,3	129	148	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	CR
160	230,44	A	6	A	jiná	6	A	4	A	30	87	98	Flu	neintenz.	A	A	SD
161	143,79	A	39	A	jiná	63	A	4	N	18	149	212	Flu	neintenz.	A	N	PR
162	277,53	A	16	A	progrese	31	N	4	A	29,5	154	279	CVP	neintenz.	A	N	CRu
163	190,25	A	52	A	jiná	68	A	4	A	23,9	133	154	R-CHOP	neintenz.	A	A	CR

Č.	Poh.	Věk	Lok. vzorku	CD20	cykl.	CD5	CD23	Prol.a.	Morf.v.	Archit.v.	EC.	Leu.	LDH/n	MIPI	b-MIPI	s-MIPI
164	M	58	tenké střevo	poz.	poz.	poz.	síť FDB	30,14	klasická	difúzní	1	6,4	1,03	5,64	6,29	3
165	Ž	57	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	40,20	klasická	difúzní	4	27,9	2,51	7,43	8,29	9
166	Ž	63	tlusté střevo	poz.	poz.		oj. FDB	22,26	klasická	difúzní	2	7,9	0,59	6,28	6,75	5
167	Ž	56	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	22,61	MZ-like	difúzní	1	5,3	0,91	5,42	5,90	2
168	M	61	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	17,98	klasická	nodulární	0	5,8	1,22	5,81	6,20	4
169	Ž	72	tonsila	poz.	poz.	poz.	síť FDB	12,26	klasická	nod.+dif.	1	5,8	1,79	6,43	6,69	6
170	M	79	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	26,24	klas.+pleo.	nodulární	1	4,9	1,12	6,33	6,89	5
171	Ž	66	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	16,24	klasická	nod.+dif.	1	45,2	0,64	6,44	6,79	5
172	Ž	86	SŽ submand.	poz.	poz.	poz.	síť FDB	14,86	klasická	difúzní	1	5,4	0,91	6,49	6,81	4
173	M	56	uzlina	poz.	poz.	poz.	oj. FDB	42,19	klasická	nodulární	0	5,8	1,16	5,60	6,51	3
174	M	65	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	73,89	blastoidní	nod.+dif.	1	33	1,30	6,70	8,28	7
175	Ž	74	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	44,29	klasická	m.z.+nod.	2	10,1	1,04	7,10	8,05	9
176	M	57	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	11,273	klasická	nodulární	1	16	0,68	5,73	5,97	5
177	M	78	uzlina	poz.	poz.	poz.	síť FDB	9,2568	klasická	difúzní	1	9,8	0,91	6,45	6,65	5

Č.	MVD	Pr.	P.d.	Ú.	Př.smrti	M.pr.	KD	KS	B-sv.	Lv.	Hb.	Tro.	Terapie I. linie	Typ léčby	Rit.	Rad.	Odp.
164	135	A	3	A	jiná	3	N	4	N	25,3	102	249	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	UNK
165	237,35	A	1	A	progrese	1	A	4	A	32	84	44	CHOP	neintenz.	N	N	PD
166	54,628	N	42	N		82	N	4	N	17	118	161	Flu	neintenz.	A	N	CR
167	92,93	A	8	A	jiná	8	A	4	N	18	140	206	Int.s allo.	intenzivní	A	N	UNK
168	180,84	A	4	A	jiná	4	A	4	N	58	84	127	Int.bez ASCT	intenzivní	A	N	UNK
169	113,02	A	13	N		76	N	1	N	26,2	126	211	CHOP	neintenz.	N	N	CR
170	158,23	A	6	A	komp.l.	6			N	38,9	127	136	CHOP	neintenz.	N	A	UNK
171	212,23	A	27	A	progrese	44	A	4	A	82	94	187	R-CHOP	neintenz.	A	N	PR
172	163,25	A	7	A	progrese	13	N	2	N	32	110	218	jen radioterapie		N	A	PD
173	257,74	A	14	A	progrese	28	A	4	N	32	130	210	R-CHOP	neintenz.	A	N	CR
174	200,93	A	6	A	progrese	7	A	4	N	75	139	254	R-CHOP	neintenz.	A	N	PD
175	202,81	A	20	N		52	A	4	A	68	67	115	CVP	neintenz.	N	N	CR
176	236,09	A	66	A	jiná	66	N	3	A	35	153	297	Int.s ASCT	intenzivní	A	N	PR
177	197,16	A	18	A	progrese	22	A	4	N	31,5	141	172	CVP	neintenz.	A	N	CRu

ORIGINAL ARTICLE: CLINICAL

Retrospective analysis of 235 unselected patients with mantle cell lymphoma confirms prognostic relevance of Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index and Ki-67 in the era of rituximab: long-term data from the Czech Lymphoma Project Database

David Salek¹, Pavla Vesela², Ludmila Boudova², Andrea Janikova¹, Pavel Klener³, Samuel Vokurka⁴, Milada Jankovska⁵, Robert Pytlik³, David Belada⁶, Jan Pirnos⁷, Mojmir Moulis⁸, Roman Kodet⁹, Michal Michal², Eva Janousova¹⁰, Jan Muzik¹⁰, Jiri Mayer¹ & Marek Trněný³

¹Department of Hematology and Oncology and ⁸Department of Pathology, Masaryk University and University Hospital Brno, Brno, Czech Republic, ²Sikl's Department of Pathology, Medical Faculty and ⁴Department of Hematooncology, Charles University and University Hospital Pilsen, Pilsen, Czech Republic, ³1st Medical Department, Charles University General Hospital, Prague, Czech Republic, ⁵Department of Hematology, University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic, ⁶Department of Clinical Hematology, University Hospital Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic, ⁷Department of Oncology, Hospital Ceske Budejovice, Ceske Budejovice, Czech Republic, ⁹Department of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Faculty Hospital in Motol, Prague, Czech Republic and ¹⁰Institute of Biostatistics and Analyses, Faculty of Medicine and Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Abstract

Although a prognostic model (MIPI, Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index) for patients with mantle cell lymphoma (MCL) has been established, its clinical significance for daily practice in the rituximab era remains controversial. Data of 235 unselected patients with MCL from the Czech Lymphoma Project Database were analyzed. MIPI, simplified MIPI (s-MIPI) and Ki-67 proliferation index were assessed for all patients and for a subgroup of 155 rituximab-treated (RT) patients. MIPI divided all patients into subgroups of low-risk (22%), intermediate-risk (29%) and high-risk (49%), with median overall survival 105.8 vs. 54.1 vs. 24.6 months, respectively ($p < 0.001$). s-MIPI revealed similar results. The validity of both indexes was confirmed in RT patients. We confirmed the Ki-67 index to be a powerful single prognostic factor for overall survival (64.4 vs. 20.1 months, $p < 0.001$) for all patients and for the RT subset. Our results confirm the clinical relevance of MIPI, s-MIPI and Ki-67 for risk stratification in MCL also in the rituximab era.

Keywords: Mantle cell lymphoma, MIPI, Ki-67, proliferation, immunochemotherapy, prognosis

Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) is a well-defined entity which constitutes approximately 6% of all non-Hodgkin lymphomas [1–3]. MCL is characterized by a specific chromosomal

translocation t(11;14)(q13;q32) resulting in cyclin D1 overexpression and cell-cycle deregulation [4]. In general, MCL represents a lymphoma with aggressive behavior, and is still considered incurable with conventional therapeutic approaches, with a median overall survival of only 3–5 years, even though some improvement and prolongation of survival has been observed [5–9]. Notwithstanding, in some patients the disease has an indolent clinical course with prolonged survival despite the absence of immediate therapy [10,11]. On the other hand, there are patients who are primarily chemoresistant or relapse early and die within 1 or 2 years after the diagnosis. Such prognostically different groups might profit from a risk-adapted therapeutic approach.

One way to predict the risk of treatment failure in MCL is to determine the proliferation rate of tumor cells using the Ki-67 index [6,12–14]. The prognostic role of Ki-67 is generally accepted; however, a disadvantage for clinical practice may be a possible interobserver variability in the interpretation of results. Risk stratification according to the International Prognostic Index (IPI) used in aggressive lymphomas [15] or Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) in follicular lymphomas [16] brings inconsistent results in MCL [5,17,18]. Consequently, considering the need for a specific scoring system for MCL, a new risk index called the Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index (MIPI) was developed by Hoster *et al.* in 2008 [18].

The MIPI was based on data analysis of 455 untreated patients with MCL with advanced clinical stages and was confirmed later in other study cohorts [19,20]. This index includes four independent risk factors: age, performance status according to Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) status, leukocyte (white blood cell, WBC) count and lactate dehydrogenase (LDH) value. According to the MIPI, patients with MCL can be divided into three prognostic groups. Classification according to the original MIPI involves some complicated mathematical operation requiring an electronic calculator. For daily clinical practice and bedside use, a simplified MIPI (s-MIPI) has also been presented, using a simple scoring system defining low risk (LR, 0–3 points), intermediate risk (IR, 4–5 points) and high risk (HR, 6 points or over) categories. The risk factors used are easily accessible and usually known from the basic evaluation of each patient. The MIPI score can also be combined with the Ki-67 rate, setting up the combined biological MIPI (b-MIPI) [18].

However, the MIPI is not accepted by all. Some investigators [21,22] deny the validity of this index, referring to some limitations of the analysis: variability in induction and post-remission treatment and use of immunochemotherapy as current standard in only approximately one-third of patients. More importantly, the majority of presented reports trying to confirm MIPI are limited to smaller cohorts of patients with MCL [23–26]. Two larger analyses were either focused on younger patients [20] or partially calculating using the same source data [19].

Therefore, an external MIPI validation is particularly important in a population-based setting to approve relevance of the index in daily practice outside of a clinical trial, also including patients with more advanced age and/or comorbidity. Restrictive eligibility criteria, such as advanced age, severe concomitant disease, poor performance status and impairment of organ function, may influence the results of the trial-based analyses. Thus we proceeded to a retrospective analysis of patients with MCL recruited into the Czech Lymphoma Project (CLP). During data collection and processing, a Dutch population-based validation of the MIPI in a registry cohort was published [27]. Our work represents, however, another independent confirmation, also including a subanalysis of patients treated with a combination of rituximab and chemotherapy to confirm the validity and applicability of the MIPI, the simplified MIPI and the combined biological MIPI, in the rituximab era.

Materials and methods

Patients

From 1999 to the middle of 2008 there were a total of 279 adult patients with newly diagnosed MCL in the Czech Lymphoma Project Database. This project of the Czech Lymphoma Study Group (CLSG) is based on registration and prospective collection of data on diagnosis, demographics, staging, baseline parameters, treatment and outcome of patients from the majority of lymphoma-treating centers in the Czech Republic. All patients signed an informed consent for data collection and analysis.

The mandatory inclusion criterion was a tumor sample available for central pathology review, although most diagnoses were made in academic centers. Ultimately, 265 tumor samples were available for this review, and diagnosis of MCL was confirmed in 242 cases. All clinical data were available in 235 cases and these patients were further evaluated (Table I).

Staging procedures (computed tomography [CT], bone marrow) were performed according to the Cheson criteria (1999) [28]; the gastrointestinal tract and central nervous system were not routinely examined (only in cases with clinical symptoms). Treatment responses were assessed locally by investigators from the participating centers.

Treatment characteristics

Induction chemotherapy was administered in 231/235 patients. In the remaining four patients with limited disease, radiotherapy only was used in three cases and a surgical intervention in the remaining case. Chemotherapy combined with adjuvant radiotherapy was used in

Table I. Baseline demographic, clinical and laboratory characteristics.

	<i>n</i>	%
Gender	235	100
Female	74	31.5
Male	161	68.5
Age, years*	235	100
< 50	22	9.4
50–59	57	24.3
60–69	76	32.3
≥ 70	80	34.0
ECOG	234 [§]	100
0–1	171	73.1
2–4	63	26.9
LDH/ULN ratio [†]	231 [§]	100
< 0.67	24	10.4
0.67–0.99	79	34.2
1.00–1.49	81	35.1
≥ 1.50	47	20.3
WBC count, × 10 ⁹ /L [‡]	231 [§]	100
< 6.70	70	30.3
6.70–9.99	83	35.9
10.00–14.99	30	13.0
≥ 15.00	48	20.8
B-symptoms	235	100
Present	109	46.4
Clinical stage	234 [§]	100
I	5	2.1
II	14	6.0
III	18	7.7
IV	197	84.2
Site of involvement	235	100
Lymphadenopathy	222	94.5
Bone marrow	182	77.4
Spleen	98	41.7
Waldeyer's ring	51	21.7
Gastrointestinal tract (stomach, intestine)	38	16.2
Liver	30	12.8
Exudates	20	8.5
Lungs	13	5.5
Orbital structures (including eyelids)	10	4.3
Soft tissues/subcutis	6	2.6
Other extranodal sites	16	6.9

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group performance status; LDH, lactate dehydrogenase; ULN, upper limit of normal; WBC, white blood cells.

*Median age 64 years, min–max 24–86.

[†]LDH/ULN ratio: median 1.0, min–max 0.5–7.9.

[‡]WBC count: median 8.1, min–max 2.0–449.6.

[§]Results of examination are not known in all patients.

11 patients. Altogether 158 from 235 patients (67.2%) were treated with a combination of chemotherapy and anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. Chemotherapeutic regimens used in the first line reflect the heterogeneity of MCL treatment. The broad spectrum varying from low- to high-intensive approaches including high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplant (ASCT) is depicted in Table II.

Central pathology review and Ki-67 index scoring technique

A central histopathological review was performed on blocks of formalin-fixed, paraffin-embedded primary diagnostic biopsies by two hematopathologists (P.V. and L.B.), resulting in the confirmation of MCL. The diagnosis of MCL was based on the criteria of the World Health Organization classification [1].

For the diagnosis confirmation, hematoxylin-eosin and Giemsa stains and immunohistochemical reactions were performed on standard 2 µm thick tissue sections, in all cases using the basic panel of antibodies against cyclin D1, CD20, CD23, CD5 and Ki-67 (MIB-1; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). In some cases, additional immunoreactions were needed for the differential diagnosis (CD3, CD10, CD21, CD35, CD79a, CD138, immunoglobulin light chains, BCL6, p27).

Immunohistochemical staining for Ki-67 antigen was performed centrally in 210/235 cases. Only specimens of appropriate size and quality were analyzed (by P.V. and

L.B.). On each slide, three representative microscopic high power fields (HPFs) of the tumor were evaluated using a ×40 objective with an eyepiece grid of 10 × 10 squares (eyepiece WH10/22, microscope BX40F4; Olympus Optical Ltd, Japan) and a hematological manual cell counter. Thus the counted area of the grid was 0.0625 mm². MIB1-positive and -negative nuclei were distinguished. The numbers of cells counted per case (in three HPFs) were as follows: average 3780, median 3942, range 1360–6783. The Ki-67 index was calculated as the percentage of positive cell nuclei. Germinal centers and areas of T-cells were excluded. As a cut-off value for survival analysis, a proliferation rate of 30% was stated.

Statistics

Descriptive statistics such as the mean, median, minimum and maximum were used for summarizing characteristics of the patients. Survival according to monitored parameters was performed using Kaplan–Meier survival curves. Kaplan–Meier analysis of overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) was performed according to the new Cheson criteria [29]. OS was calculated from the date of diagnosis to death or last follow-up. The event in survival analysis was the death of a patient irrespective of cause. PFS was calculated from the date of diagnosis to disease progression, relapse, death from any cause or last follow-up. Events in PFS were disease progression, relapse or death. Differences in survival were tested using the log-rank test. The relationship between the survival of patients and risk factors was explored using the Cox proportional hazards model. As a level of statistical significance, $\alpha = 0.05$ was used. Analysis and graphic visualization were performed using statistical software SPSS 16.0.1 for Windows and STATISTICA 8.0 for Windows.

The original MIPI, s-MIPI and b-MIPI were assessed as published in the original report of Hoster *et al.* [18].

Results

Overall treatment outcomes

Relevant patient characteristics are summarized in Table I. Overall, 228/235 patients were evaluable for the treatment response. In total 146 patients (64.0%) achieved a complete remission (CR) or unconfirmed CR (CRu), with an overall response rate of 82.0% (Table II). During follow-up 193 relapses and 155 deaths were noted. Lymphoma progression was the most common cause of death (80%). With a median follow-up of 75 months in living patients (range 3–182), the median OS was 47.3 months (3.9 years) and estimated 5-year OS 44.0%. The median progression-free survival was 21.7 months (Figure 1).

Patients treated with immunochemotherapy including rituximab ($n = 158$, median follow-up 68 months) had significantly better OS and PFS compared to patients treated without rituximab ($n = 77$). The median OS was 57.8 vs. 24.6 months and the estimated 5-year OS 48.5 vs. 34.9 months [$p = 0.049$; Figure 2(A)]. The median PFS was 25.7 vs. 16.0 months [$p < 0.001$; Figure 2(B)].

Table II. Baseline treatment characteristics and overall outcomes.

	<i>n</i>	%
Type of therapy	235	100
No chemotherapy	4	1.7
Low-dose chemotherapy*	26	11.1
CHOP	36	15.3
R-CHOP	52	22.1
Fludarabine-based combined regimen	16	6.8
Other medium-intensive regimen [†]	14	6.0
Intensive induction without ASCT [‡]	42	17.9
Intensive induction with ASCT [§]	21	8.9
Medium-intensive induction with ASCT [¶]	20	8.6
Allogeneic stem cell transplant	4	1.7
Rituximab	235	100
Yes	158	67.2
ASCT	235	100
Yes	41	17.5
Therapy response	228**	100
Complete response (CR)	125	54.8
Complete response - unconfirmed (CRu)	21	9.2
Partial response (PR)	41	18.0
Stable disease (SD)	12	5.2
Progressive disease (PD)	29	12.7
Progression/relapse	235	100
Yes	193	82.1
Death	235	100
Yes	155	66.0

CHOP, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone; R, rituximab; ASCT, autologous stem cell transplant; CVP, cyclophosphamide, vincristine and prednisone.

*CVP ± R, chlorambucil or fludarabine monotherapy.

[†]e.g. R-CHOP combined with high-dose cytarabine.

[‡]e.g. R-hyperCVAD (dose-escalated CHOP) alternating with high-dose cytarabine and methotrexate.

[§]e.g. Nordic MCL2 protocol (R-maxiCHOP alternating with R-high-dose cytarabine, with ASCT consolidation).

[¶]e.g. CHOP ± R with ASCT consolidation.

**Data are not known in all patients.

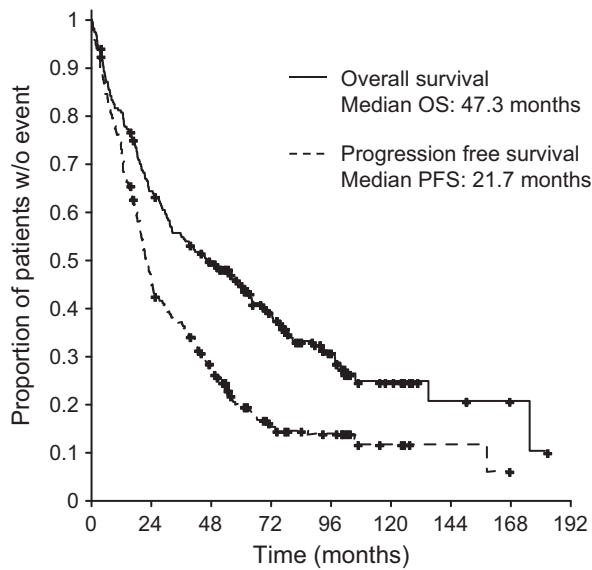


Figure 1. Overall and progression free survival of all patients ($n = 235$).

Original MIPI

The median MIPI was 6.2 (range 4.5–9.4) in 227/235 evaluable patients. In the univariate Cox regression analysis, all risk parameters (ECOG, LDH, age, WBC) were significantly associated with a worse prognosis (Table III). Statistically significant differences in overall survival were found between separate risk categories (LR vs. IR vs. HR) in all patients [median OS 105.8 vs. 54.1 vs. 24.6 months; $p < 0.001$; Table IV; Figure 3(A)] and also in 155 patients treated with rituximab [median OS 105.8 in LR vs. 63.0 in IR vs. 32.2 months in HR, $p = 0.002$; Table IV; Figure 3(B)].

Interestingly, the univariate Cox regression model revealed that the MIPI did not precisely differentiate between the intermediate and high risk groups in rituximab-treated patients ($p = 0.101$). The low-risk category was distinguished clearly from intermediate-risk both in the whole cohort of patients and in the rituximab-treated subgroup ($p = 0.003$ and 0.031 , respectively) (Table V).

Simplified MIPI

The median s-MIPI was 5.0 points (range 0–11). Most patients were in the high-risk group (45.4%). According to the log-rank test, OS was significantly different between LR, IR and HR categories (median OS 105.8 vs. 45.9 vs. 22.8 months, $p < 0.001$) [Table IV; Figure 4(A)]. The rituximab-treated subgroup could also be divided with statistical significance into three risk groups, and estimated 5-year survivals were 67.0 vs. 46.9 vs. 36.5 months in LR, IR and HR categories, respectively, $p = 0.001$ [Table IV; Figure 4(B)].

Univariate Cox regression confirmed that s-MIPI could distinguish exactly between all three risk categories when analyzing all patients, but – analogous to MIPI – it failed to significantly separate the IR from the HR category in the rituximab subgroup ($p = 0.135$). Low risk patients were clearly differentiated both in the entire cohort and in the rituximab subgroup ($p = 0.004$ and 0.014 , respectively) (Table V).

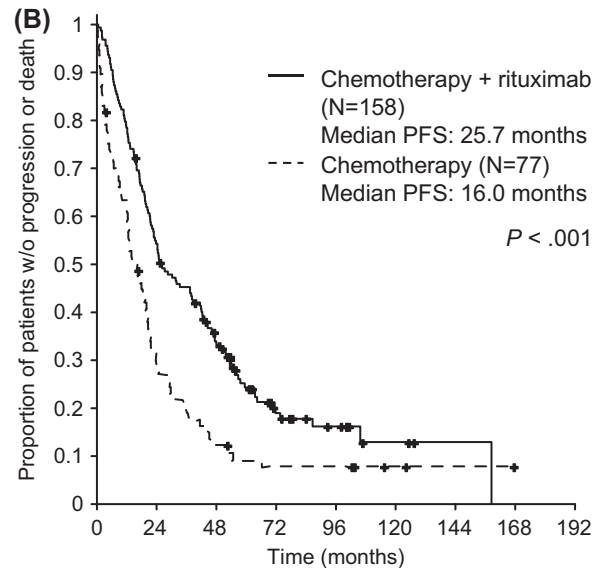
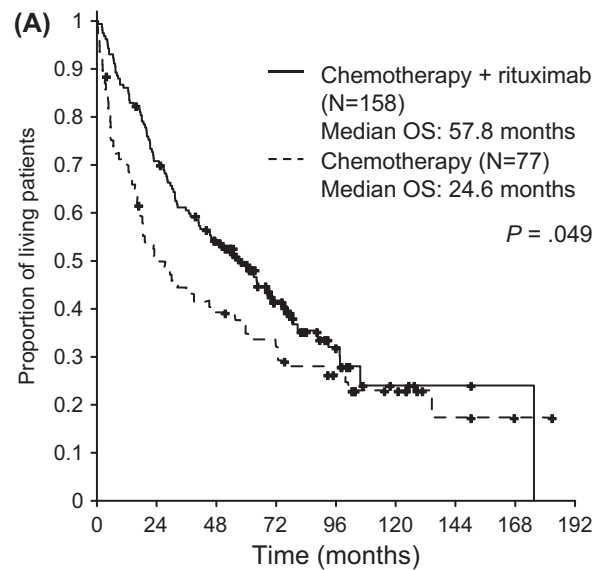


Figure 2. Survival of all patients ($n = 235$) according to induction therapy with or without rituximab. (A) Overall survival (OS). (B) Progression-free survival (PFS).

Proliferation index Ki-67

In total, 210 samples of confirmed MCL were evaluated for the proliferation index Ki-67. The mean Ki-67 rate was 27%, median 22% (range 2.8–80.1%). Patients were divided into two categories (cut-off 30% Ki-67 positive cells). Most patients (136/210, 64.8%) fell into the low-proliferation

Table III. Risk factors included in MIPI and simplified MIPI calculations and associated relative risk for overall survival of all patients according to univariate Cox proportional hazards model.

Risk factor	Risk category/ baseline category	Relative risk	95% CI	p-Value
ECOG	2-4/0-1	2.40	1.64; 3.50	< 0.001
LDH above ULN	Yes/no	2.12	1.45; 3.11	< 0.001
LDH/ULN	One-unit increase	1.17	1.02; 1.34	0.027
Age	One-unit increase	1.05	1.03; 1.07	< 0.001
WBC count	One-unit increase	1.01	1.00; 1.01	< 0.001

MIPI, Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index; CI, confidence interval; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group performance status; LDH, lactate dehydrogenase; ULN, upper limit of normal; WBC, white blood cells.

Table IV. Overall survival (OS) according to MIPI, simplified MIPI (s-MIPI), Ki-67 and combined biological MIPI (b-MIPI).

Risk category	n (%)	No. of events	Median survival, months	5-Year survival, % (95% CI)	p-Value*
MIPI (all patients)	227 (100)				
Low risk	50 (22.0)	23	105.8	69.7 (56.9; 82.5)	< 0.001
Intermediate risk	65 (28.6)	42	54.1	46.0 (33.3; 58.6)	
High risk	112 (49.4)	85	24.6	28.3 (19.6; 37.1)	
MIPI (rituximab-treated patients)	155 (100)				
Low risk	33 (21.3)	14	105.8	66.3 (50.0; 82.5)	0.002
Intermediate risk	53 (34.2)	33	63.0	50.5 (36.2; 64.8)	
High risk	69 (44.5)	48	32.2	35.3 (23.6; 47.1)	
s-MIPI (all patients)	227 (100)				
Low risk	55 (24.2)	25	105.8	68.7 (56.3; 81.0)	< 0.001
Intermediate risk	69 (30.4)	45	45.9	43.8 (31.8; 55.8)	
High risk	103 (45.4)	80	22.8	27.6 (18.4; 36.8)	
s-MIPI (rituximab-treated patients)	155 (100)				
Low risk	37 (23.9)	15	105.8	67.0 (51.7; 82.4)	0.001
Intermediate risk	52 (33.5)	33	49.5	46.9 (33.0; 60.8)	
High risk	66 (42.6)	47	32.4	36.5 (24.2; 48.8)	
Ki-67 (all patients)	210 (100)				
1-29.9%	136 (64.8)	81	64.4	53.0 (44.4; 61.6)	< 0.001
≥ 30%	74 (35.2)	56	20.1	26.7 (16.4; 37.0)	
Ki-67 (rituximab-treated patients)	144 (100)				
1-29.9%	85 (59.0)	43	76.4	61.8 (51.1; 72.5)	< 0.001
≥ 30%	59 (41.0)	44	22.6	29.4 (17.6; 41.2)	
b-MIPI (all patients)	204 (100)				
Low + intermediate risk	81 (39.7)	40	93.0	62.8 (52.0; 73.7)	< 0.001
High risk	123 (60.3)	94	23.0	28.8 (20.6; 37.1)	
b-MIPI (rituximab-treated patients)	142 (100)				
Low + intermediate risk	58 (40.8)	26	97.5	65.2 (52.3; 78.0)	< 0.001
High risk	84 (59.2)	60	31.5	35.8 (25.3; 46.2)	

MIPI, Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index; CI, confidence interval.

*Log-rank test.

group (Ki-67 1.0–29.9%); the remaining patients (74/210, 35.2%) belonged to the group with high proliferation (Ki-67 rate over 30.0%). Overall survival differed significantly in the log-rank test between these two cohorts (median OS 64.4 vs. 20.1 months, $p < 0.001$) [Table IV; Figure 5(A)]. The analysis of 144 rituximab-treated patients revealed similar results (median OS 76.4 vs. 22.6 months, $p < 0.001$) [Table 4; Figure 5(B)]. Patients with a proliferation rate 30% and above had a significantly higher relative risk of death ($p < 0.001$, Table V).

Combined biological MIPI

Overall 204 patients having adequate information to calculate the combined MIPI (MIPI score + 0.02142 times Ki-67 percent value) were analyzed for overall survival and progression-free survival. Due to the low number of patients in the low risk group ($n = 12$) it was merged with the intermediate risk group. Most patients had a high-risk profile anyway ($n = 123$, 60.3%).

Survival curves for both risk categories (LR + IR vs. HR) were clearly separated with statistically significant differences ($p < 0.001$) in the entire cohort of patients (median OS 93.0 vs. 23.0 months) as well as in the rituximab-treated subgroup (median OS 97.5 vs. 31.5 months). Biological MIPI remained fully valid in both the univariate Cox regression analysis and the log-rank test (Tables IV and V).

Discussion

Prognostic models should be valid and feasible for daily clinical practice, allowing risk stratification assessment and

giving a rationale for treatment strategy. Validation of a prognostic index outside of clinical trials in an unselected population is therefore extremely important. In contrast to the original work of Hoster *et al.* [18], we have analyzed a population-based setting of non-study patients, thus reflecting a normal epidemiological situation. We have included elderly (median age 64 vs. 60 years) or clinically worse patients (26.9% vs. 9% ECOG 2 and higher), who would not be eligible to enter the clinical trials that the MIPI was based on [30–32]. Because both ECOG status and age are among the assessed risk factors, this is also reflected in a proportion of patients with a higher MIPI category (median MIPI 6.2 in our cohort vs. 5.78 in the original cohort). In our cohort, LR, IR and HR groups formed 22%, 29% and 49%, respectively, compared with 44%, 35% and only 21% of high risk patients in the original study. Despite these facts, our results were fully comparable with the data of the original German study. MIPI and simplified MIPI can clearly separate the low, intermediate and high risk groups of patients when analyzing the entire cohort. Overall survival differed significantly among risk categories (LR vs. IR vs. HR): median OS 105.8 vs. 54.1 vs. 24.6 months according to MIPI, $p < 0.001$. The OS analysis according to s-MIPI showed very similar results (median OS 105.8 vs. 45.9 vs. 22.8 months, $p < 0.001$).

With the exception of the original report [18] and a subsequent analysis presented later [19], there are several papers dealing with validation of the MIPI in smaller cohorts of patients [24–26,33]. The most robust and similar study to our setting was published by Van de Schans *et al.* [27]. This precise validation analysis was based on a Dutch population with a significantly lower number of patients

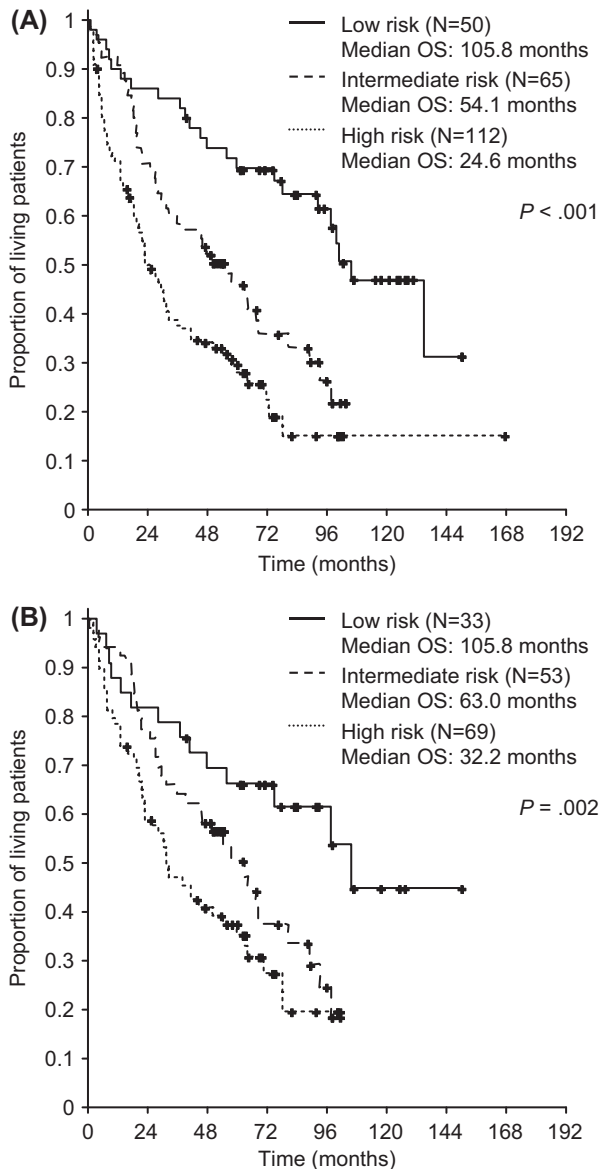


Figure 3. Overall survival (OS) according to MIPI. (A) All patients ($n = 227$). (B) Rituximab-treated patients ($n = 155$).

(178 vs. 235 in our study), and no analysis of s-MIPI or Ki-67 was included. Distribution of patients in risk subgroups according to the MIPI was comparable to our study, but the overall survival was shorter (47.3 vs. 26 months). In accordance with the Dutch patient-based study, we observed that the MIPI discriminated our cohort nearly as well as the original cohort. Unlike work by Van de Schans and Hoster, we also included patients with limited clinical stages I + II, but they constituted only a minority of all cases (about 8%). Out of 19 patients with stage I + II, eight patients (42%) belonged to the LR, eight (42%) to the IR and three (16%) to the HR group. Kaplan-Meier analysis of OS showed no statistically significant difference between stages I + II and III + IV ($p = 0.702$, data not shown), which can be attributed to the low number of patients.

As immunochemotherapy is the standard of care today, the MIPI prognostic model should be confirmed independently even under such conditions. Therefore we also performed a subanalysis of rituximab-treated patients,

Table V. Prognostic indexes and associated relative risk for overall survival according to univariate Cox proportional hazards model.

Risk category/baseline category	Hazard ratio	95% CI	p -Value
MIPI (all patients)			
Intermediate risk/low risk	2.19	1.30; 3.68	0.003
High risk/low risk	3.56	2.21; 5.75	< 0.001
High risk/intermediate risk	1.63	1.12; 2.36	0.010
MIPI (rituximab-treated patients)			
Intermediate risk/low risk	2.03	1.07; 3.88	0.031
High risk/low risk	2.95	1.59; 5.49	0.001
High risk/intermediate risk	1.45	0.93; 2.26	0.101
s-MIPI (all patients)			
Intermediate risk/low risk	2.10	1.27; 3.44	0.004
High risk/low risk	3.84	2.40; 6.14	< 0.001
High risk/intermediate risk	1.83	1.26; 2.65	0.001
s-MIPI (rituximab-treated patients)			
Intermediate risk/low risk	2.20	1.17; 4.14	0.014
High risk/low risk	3.10	1.69; 5.68	< 0.001
High risk/intermediate risk	1.41	0.90; 2.20	0.135
Ki-67 (all patients)			
Over 30%/1-29.9%	2.05	1.45; 2.89	< 0.001
Ki-67 (rituximab-treated patients)			
Over 30%/1-29.9%	2.63	1.72; 4.04	< 0.001
b-MIPI (all patients)			
High risk/low + intermediate risk	2.70	1.85; 3.94	< 0.001
b-MIPI (rituximab-treated patients)			
High risk/low + intermediate risk	2.47	1.54; 3.95	< 0.001

CI, confidence interval; MIPI, Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index; s-MIPI, simplified MIPI; b-MIPI, combined biological MIPI.

although we did not analyze the impact of different chemotherapeutic regimens. When evaluating the survival of the rituximab-treated subgroup, overall results also showed significant differences between LR, IR and HR groups ($p = 0.002$ for MIPI and $p = 0.001$ for s-MIPI). However, the univariate Cox analysis showed that both MIPI and s-MIPI failed in clear separation of rituximab-treated IR and HR subgroups ($p = 0.101$ and 0.135 , respectively). We cannot easily explain these findings and we could not find similar observations in the literature. Worse separation of HR and IR curves in our analysis compared to the original study published by Hoster and similar independent analysis published by Van de Schans may be caused by the significantly higher proportion of rituximab-treated patients, 67% vs. 31% and 15%, respectively [18,27]. The addition of rituximab to first-line chemotherapy is associated with significantly prolonged survival in elderly patients with MCL [34]. Regarding these observations we can speculate that rituximab might have improved the results most effectively especially in the elderly subgroup of patients (34% of cases ≥ 70 years in our setting), which was transformed into partial disappearance of the survival difference between HR and IR subgroups. However, no such thorough analysis was performed.

The proliferation rate assessed as the Ki-67 index on immunohistochemical slides has been shown to be a strong prognostic biomarker for overall survival, in both homogeneous and heterogeneous populations of patients with MCL, independent of other clinical parameters [6,12,13]. The blastoid and pleomorphic variants of MCL usually show an aggressive behavior [1,6]. Indeed, eight of nine patients with these variants in our cohort died within a year after diagnosis, leaving only one patient alive in progression. However, the low number of patients precluded a statistical comparison.

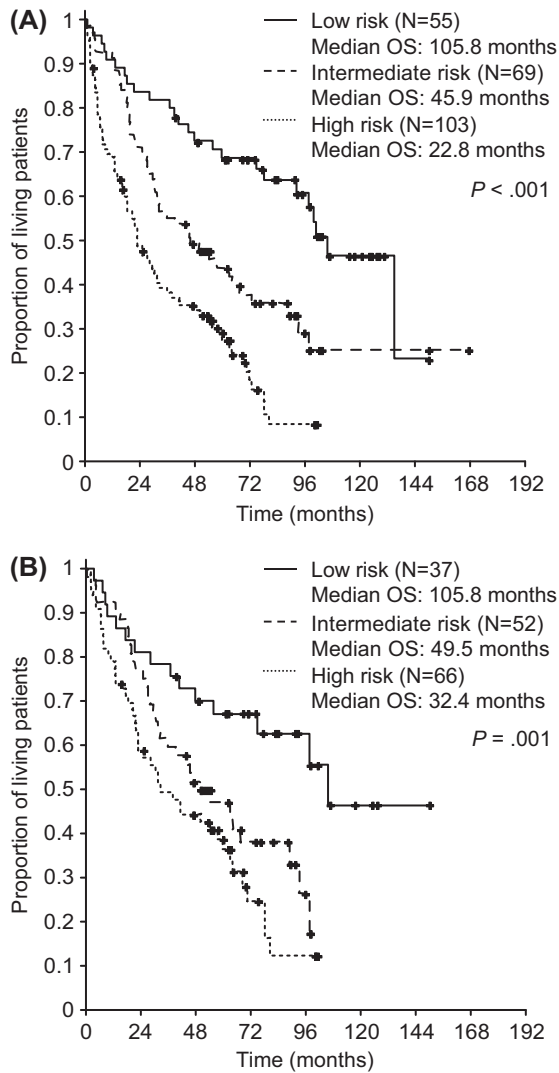


Figure 4. Overall survival (OS) according to simplified MIPI. (A) All patients ($n = 227$). (B) Rituximab-treated patients ($n = 155$).

Our study assessing Ki-67 in 210 cases of MCL represents the second largest series published so far, as the large series of Determann *et al.* [12] (249 cases) and Hoster *et al.* [18] (236 cases) appear to be, for the most part, based on the data of patients included in the same clinical trials [30–32]. Different cut-off values for Ki-67 index were identified in retrospective studies, ranging from 10 to 50% [12–14,35]. Application of the Ki-67 index in experimental as well as routine management is limited by the relatively high interobserver variability. The cut-off used in our study, 30% Ki-67 positive cells, was defined based on published data, and allowed two clinically different subgroups to be discriminated. In accordance with previously reported results, we confirmed the Ki-67 index to be a very powerful single prognostic factor for overall survival. We also demonstrated that the Ki-67 index retained its prognostic relevance in patients treated with rituximab.

Despite certain improvements in recent years, the prognosis of patients with MCL is still disappointing, and the optimal management of treatment remains a matter of debate. A mixture of induction regimens in our cohort reflects this situation. Because of the B-cell phenotype

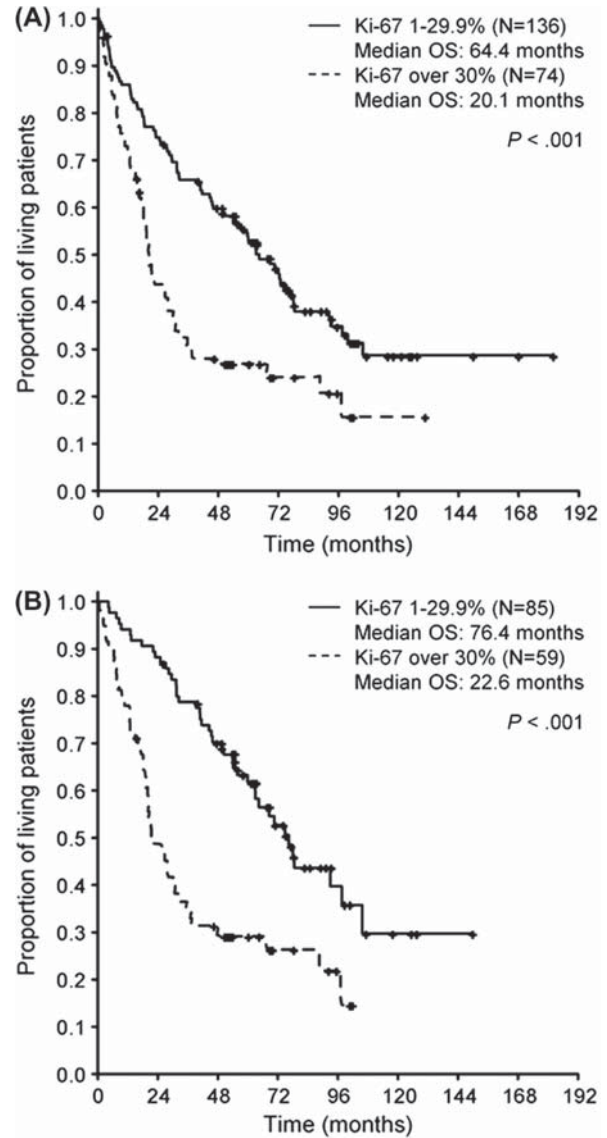


Figure 5. Overall survival (OS) according to Ki-67. (A) All patients ($n = 210$). (B) Rituximab-treated patients ($n = 144$).

with CD20 positivity, the addition of the monoclonal antibody rituximab to chemotherapy is generally accepted. It may improve response rates (CR and partial response [PR]) [30,35], prolong time-to-treatment failure [30] and possibly even improve the overall survival [36]. In accordance with these observations, our data from daily clinical practice show a significant survival improvement with rituximab addition in first-line treatment, resulting in a doubled median OS. Similar results were observed when analyzing PFS (median OS 57.8 vs. 24.6 months, $p = 0.049$, median PFS 25.7 vs. 16.0 months, $p < 0.001$, both in favor of the rituximab-treated population). We are wary of the limitation of this observation, because significant global changes in treatment strategy (not only rituximab addition) have been made since the year 2000, which are mirrored in a general improvement of overall survival in patients with MCL. Nevertheless, even if no detailed analysis between both subgroups (rituximab vs. no rituximab) was performed in terms of variability in given therapy, demographic and other factors, our global results are

similar to published data [7]. A retrospective analysis comparing data from the Kiel Lymphoma Study Group (KLSG; data from 1975–1982) and German Lymphoma Study Group (GLSG; data from 1996–2000) showed a significant improvement in median OS, 2.7 years vs. 4.8 years, between study groups [7]. Patients from the later subgroup (GLSG) were treated more intensively (including high-dose chemotherapy), and a standard part of treatment was anthracyclines and rituximab in most of them, in comparison with the KLSG group. Other independent analyses from the USA and Sweden are concordant with our results, and suggest that the development of new treatment strategies over the past decade may be impacting on the survival of patients with advanced MCL [8,9].

In our cohort, we observed a relatively high proportion of patients achieving CR/CRu (about 64%) with a corresponding overall response rate (ORR) of 82%. Despite the fact that most of the patients were treated with “conventional” doses of therapy, nearly half of the cases (43%) received a more intensive treatment (combination with high dose AraC and high dose methotrexate), and moreover a significant proportion of patients underwent some type of high dose chemotherapy with stem cell transplant (20%). On the other hand, there is evidence from other studies that conventional immunochemotherapy can also lead to a very good response rate, with 58–87% CR/CRu [5,30,37,38]. A high response rate in our patients with MCL could also be overestimated by local investigators’ subjectivity, because no central review of CT was performed. It is necessary to mention that response rate evaluation was only a marginal outcome of our retrospective analysis, and similar validation studies did not present such data [26,27].

In summary, we have confirmed the validity of the MIPI and simplified MIPI for the prognosis of patients with MCL even in the era of rituximab. The general results of both indexes are fully comparable, facilitating the broad application of s-MIPI as a simple bedside prognostic tool. The Ki-67 index represents another independent marker reflecting tumor behavior, and therefore the biological MIPI with incorporated Ki-67 seems to be the most reliable prognosticator for MCL.

Acknowledgements

The help of many participating physicians and data managers providing clinical information and pathological specimens is greatly acknowledged. Special thanks go to the pathologists: Dr. Kren, Dr. Kasparova, Dr. Velenska, Dr. Vernerova and Dr. Stritesky.

Potential conflict of interest: Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at www.informahealthcare.com/lal.

This work was supported by research grants from the Ministry of Education and Youth of the Czech Republic (MSM0021620819 and FAD 200647) (L.B.) and by a grant from the Ministry of Health of the Czech Republic (IGA MZ CR NR/9453-3); on behalf of the CLSG.

References

- [1] Swerdlow SH, Campo E, Seto M, et al. Mantle cell lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC; 2008. pp. 229–232.
- [2] Banks PM, Chan J, Cleary ML, et al. Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am J Surg Pathol* 1992;16:637–640.
- [3] Zucca E, Stein H, Coiffier B. European Lymphoma Task Force (ELTF): report of the workshop on mantle cell lymphoma (MCL). *Ann Oncol* 1994;5:507–511.
- [4] Welzel N, Le T, Marculescu R, et al. Templated nucleotide addition and immunoglobulin JH-gene utilization in t(11;14) junctions: implications for the mechanism of translocation and the origin of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 2001;61:1629–1636.
- [5] Rätty R, Franssila K, Joensuu H, et al. Ki-67 expression level, histological subtype, and the International Prognostic Index as outcome predictors in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2002;69:11–20.
- [6] Tiemann M, Schrader C, Klapper W, et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol* 2005;131:29–38.
- [7] Hermann A, Hoster E, Zwingers T, et al. Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2009;27:511–518.
- [8] Abrahamsson A, Dahle N, Jerkeman M. Marked improvement of overall survival in mantle cell lymphoma: a population based study from the Swedish Lymphoma Registry. *Leuk Lymphoma* 2011;52:1929–1935.
- [9] Chandran R, Gardiner SK, Simon M, et al. Survival trends in mantle cell lymphoma in the United States over 16 years 1992–2007. *Leuk Lymphoma* 2012;53:1488–1493.
- [10] Ondrejka SL, Lai R, Smith SD, et al. Indolent mantle cell leukemia: a clinicopathological variant characterized by isolated lymphocytosis, interstitial bone marrow involvement, kappa light chain restriction, and good prognosis. *Hematologica* 2011;96:1121–1127.
- [11] Fernández V, Salamero O, Espinet B, et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 2010;70:1408–1418.
- [12] Determann O, Hoster E, Ott G, et al. Ki-67 predicts outcome in advanced-stage mantle cell lymphoma patients treated with anti-CD20 immunochemotherapy: results from randomized trials of the European MCL Network and the German Low Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2008;111:2385–2387.
- [13] Katzenberger T, Petzoldt C, Höller S, et al. The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. *Blood* 2006;107:3407.
- [14] Klapper W, Hoster E, Determann O, et al. Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma - consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *J Hematop* 2009;2:103–111.
- [15] A predictive model for aggressive non-Hodgkin’s lymphoma. The International Non-Hodgkin’s Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993;329:987–994.
- [16] Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004;104:1258–1265.
- [17] Møller MB, Pedersen NT, Christensen BE. Mantle cell lymphoma: prognostic capacity of the Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Br J Haematol* 2006;133:43–49.
- [18] Hoster E, Dreyling M, Klapper W, et al. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 2008;111:558–565. Erratum in: *Blood* 2008;111:5761.
- [19] Hoster E, Hasford J, Hermine O, et al. Confirmation of the Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index (MIPI) in an independent prospective patient cohort. *Blood* 2009;114(Suppl. 1): Abstract 138.
- [20] Geisler Ch, Kolstad A, Laurell A, et al. The Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index (MIPI) is superior to the International Prognostic Index (IPI) in predicting survival following intensive first-line immunochemotherapy and autologous stem cell transplantation (ASCT). *Blood* 2010;115:1530–1533.
- [21] Schaffel R, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, et al. Prognostic impact of proliferative index determined by quantitative image analysis and the International Prognostic Index in patients with mantle cell lymphoma. *Ann Oncol* 2010;21:133–139.
- [22] Shah JJ, Fayad L, Romaguera J. Mantle Cell International Prognostic Index (MIPI) not prognostic after R-hyper-CVAD. *Blood* 2008;112:2583.

- [23] Pan L, Guthrie KA, Till BG, et al. The Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index (MIPI) at diagnosis is associated with survival of mantle cell lymphoma patients undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2008;112(Suppl. 1): Abstract 1143.
- [24] Terol MJ, Teruel AI, Amat P, et al. Validation of the new prognostic index (MIPI) in mantle cell lymphoma: a single institution experience. *Ann Oncol* 2008;19(Suppl. 4):iv212
- [25] Chiappella A, Puccini B, Rossi M, et al. Mantle Cell International Prognostic Index (MIPI) is a strong predictor of the outcome of mantle cell lymphoma (MCL) in the rituximab (R) era. *Blood* 2009;114(Suppl. 1): Abstract 2928.
- [26] Smith SD, Hsi E, Bolwell B, et al. Validation of the Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index: a single-center retrospective analysis. *Am J Hematol* 2010;85:454-456.
- [27] Van de Schans SAM, Janssen-Heijnen MLG, Nijziel MR, et al. Validation, revision and extension of Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index in a population-based setting. *Hematologica* 2010;95:1503-1509.
- [28] Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol* 1999;17:1244.
- [29] Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25: 579-586.
- [30] Lenz G, Dreyling M, Hoster E, et al. Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J Clin Oncol* 2005;23:1984-1992.
- [31] Dreyling M, Lenz G, Hoster E, et al. Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood* 2005;105: 2677-2684.
- [32] Nickenig C, Dreyling M, Hoster E, et al. Combined cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and prednisone (CHOP) improves response rates but not survival and has lower hematologic toxicity compared with combined mitoxantrone, chlorambucil, and prednisone (MCP) in follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized trial of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Cancer* 2006;107:1014-1022.
- [33] Eve HE, Gambell J, Smith P, et al. The simplified mantle cell lymphoma international prognostic index predicts overall survival but not progression-free survival in patients with mantle cell lymphoma treated with fludarabine and cyclophosphamide ± rituximab: results of a randomized phase II trial. *Leuk Lymphoma* 2009;50:1709-1711.
- [34] Griffiths R, Mikhael J, Gleeson M, et al. Addition of rituximab to chemotherapy alone as first-line therapy improves overall survival in elderly patients with mantle cell lymphoma. *Blood* 2011;118: 4808-4816.
- [35] Hsi ED, Jung SH, Lai R, et al. Ki67 and PIM1 expression predict outcome in mantle cell lymphoma treated with high dose therapy, stem cell transplantation and rituximab: a Cancer and Leukemia Group B 59909 correlative science study. *Leuk Lymphoma* 2008;49: 2081-2090.
- [36] Howard OM, Gribben JG, Neuberg DS, et al. Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J Clin Oncol* 2002;20:1288-1294.
- [37] Romaguera JE, Fayad L, Rodriguez MA, et al. High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. *J Clin Oncol* 2005;23: 7013-7023.
- [38] Delarue R, Haioun C, Ribrag V, et al. CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 2013;121:48-53.
- [39] Schulz H, Bohlius JF, Trelle S, et al. Immunochemotherapy with rituximab and overall survival in patients with indolent or mantle cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:706-714.

Microvessel density of mantle cell lymphoma. A retrospective study of its prognostic role and the correlation with the Ki-67 and the mantle cell lymphoma international prognostic index in 177 cases

Pavla Veselá · Zbyněk Tonar · David Šálek · Samuel Vokurka · Marek Trněný · Roman Kodet · Mojmir Moulis · Petra Kašparová · Zdeňka Vernerová · Zuzana Velenská · Jan Stříteský · Michal Michal · Ludmila Boudová

Received: 13 April 2014 / Revised: 26 June 2014 / Accepted: 7 July 2014 / Published online: 22 July 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract The clinical course and therapy of mantle cell lymphoma (MCL) are heterogeneous and often unsatisfactory. Prognostic factors are needed to stratify the patients. Microvessel density (MVD) has prognostic significance in some malignancies. There is little information about the vasculature of MCL, although some antiangiogenic drugs are in use. We studied MVD using systematic uniform random sampling and unbiased counting frames in immunohistochemical reactions with anti-CD34 antibody in pre-therapeutic extramedullary MCL samples of 177 patients. We analyzed the relationship of MVD to overall survival (OS) and progression-free survival (PFS), as well as to proliferative activity (Ki-67), mantle cell lymphoma prognostic

index (MIPI), morphological variant, pattern of growth, and localization. MVD varied widely: range 54.6–503.6 vessels/mm², median 158.2 vessels/mm². Higher MVD was associated with bone marrow infiltration at the time of diagnosis ($P=0.001$). High MVD was associated with significantly worse OS ($P=0.04$) only in patients treated with non-intensive (conventional) therapy. MVD correlated positively with MIPI scores but not with the proliferation, morphological variant, growth pattern, or localization. Univariate analysis identified a prognostic influence of morphological variant, MIPI, and proliferative activity on OS and PFS and a prognostic influence of bone marrow infiltration at the time of diagnosis on PFS. Multivariate analysis showed prognostic influence of

P. Veselá · M. Michal · L. Boudová (✉)
Sikl's Department of Pathology, Faculty of Medicine in Pilsen,
Charles University in Prague and University Hospital Pilsen, Alej
Svobody 80, 304 60 Pilsen, Czech Republic
e-mail: boudova@medima.cz

Z. Tonar
Biomedical centre, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University,
Pilsen, Czech Republic

D. Šálek
Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology,
University Hospital and Masaryk University, Brno, Czech Republic

S. Vokurka
Department of Hematooncology, Faculty of Medicine in Pilsen,
Charles University and University Hospital,
Pilsen, Czech Republic

M. Trněný
First Department of Medicine, Charles University and General
University Hospital, Prague, Czech Republic

R. Kodet
Department of Pathology and Molecular Medicine, Second Faculty
of Medicine, Charles University and Faculty Hospital in Motol,
Prague, Czech Republic

M. Moulis
Department of Pathology, Masaryk University and University
Hospital, Brno, Czech Republic

P. Kašparová
Fingerland Department of Pathology, Faculty of Medicine and
Faculty Hospital, Charles University, Hradec Kralove, Czech
Republic

Z. Vernerová
Department of Pathology, Third Faculty of Medicine, Charles
University, Prague, Czech Republic

Z. Velenská · J. Stříteský
Institute of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University
and General University Hospital, Prague, Czech Republic

MIPI and proliferative activity on OS and PFS only. In conclusion, this is the first clinicopathological study of MVD of MCL with long-term follow-up showing negative prognostic trends of high MVD in MCL and positive correlation of MVD and MIPI.

Keywords Angiogenesis · Mantle cell lymphoma · Mantle cell lymphoma international prognostic index · Microvessel density · Prognosis · Proliferative activity

Introduction

Mantle cell lymphoma (MCL) represents about 6 % of non-Hodgkin lymphomas. Its genetic hallmark is the translocation t(11;14)(q13;q32) leading to constitutional overexpression of cyclin D1 and cell cycle dysregulation. Regarding biological behavior and therapy, MCL is heterogeneous. It is aggressive with, in most cases, a poor prognosis. Median survival varies between 3 and 5 years with conventional therapies [1] but has been improved by the implementation of rituximab, intensive induction regimens containing high-dose cytarabine, frontline autologous stem cell transplantation (ASCT), and by rituximab maintenance [2, 3]. In contrast, a minority of patients may have an indolent course, surviving more than 10 years [1, 4] and some may even need no treatment for a long period of time [5].

Considering the variable clinical course and the spectrum of therapies including highly aggressive regimens, it is necessary to identify prognostic factors to stratify patients and to select the optimal individual risk-adapted treatment.

The mantle cell lymphoma international prognostic index (MIPI) comprising the patient's age, performance status according to Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), leukocyte count, and serum level of lactate dehydrogenase has been proved to be a powerful prognostic factor in several clinical studies [1, 6–9], although questioned by others [10]. Blastoid morphology [11], a high mitotic count, and a high proliferative activity assessed with the Ki-67 index using immunohistochemistry [12–14], represent well-recognized adverse histological prognostic factors [4, 14].

Some new drugs have been already introduced into practice (bortezomib, temsirolimus) or are currently being tested in clinical trials, such as lenalidomide, bevacizumab, and ibrutinib [15–18]. Besides immunomodulatory and other effects, some of these influence angiogenesis, which may play an important role in the growth and spread of tumors. Angiogenesis can be characterized in part by microvessel density (MVD), which is known to have a prognostic impact on solid tumors [19, 20], as well as on multiple myeloma [21] and diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) [22, 23]. So far, little information has been available about the vascular parameters of MCL, although they could help improve understanding of the effects

of antiangiogenic antitumor therapy and thus may be clinically useful [15, 24].

The aims of this study were to assess MVD in a well-characterized retrospective series of MCL patients by means of immunohistochemistry using anti-CD34 antibody, to analyze the influence of MVD on the outcome of patients as measured by progression-free survival (PFS) and overall survival (OS), and to compare these vascular features with other clinical and histopathological parameters: MIPI and its variants, Ki-67 ratio, morphological variants, and architecture of the tumor. To our knowledge, this is the first study to assess MVD and its prognostic role in a large series of MCL.

Materials and methods

Cases

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks of pre-therapeutic biopsies of 177 cases of MCL diagnosed between 1996 and 2008 were included. Information about staging, laboratory, and clinical findings were collected at the time of diagnosis; data regarding therapy, survival, and progression-free survival were updated in 2012.

This project of the Czech Lymphoma Study Group (CLSG) is based on registration and prospective collection of data on diagnoses, demographics, staging, baseline parameters, treatment, and outcome of patients from the majority of lymphoma-treatment centers in the Czech Republic. All patients signed an informed consent for data collection and analysis. As no active intervention or commercial activities were carried out on the patients and the project, no ethics board approval was needed.

Histopathological diagnosis

The diagnosis of MCL was based on the criteria of the World Health Organization (WHO) classification, including cytomorphology and architecture [4]. For the central pathological confirmation of the diagnosis, hematoxylin-eosin and Giemsa stains and immunohistochemical reactions were performed on standard 2- μ m thick tissue sections in all cases, using antibodies against cyclin D1, CD20, CD23, CD5, and Ki-67 (MIB-1, DakoCytomation, Glostrup, Denmark). In some cases, additional immunoreactions were evaluated for the differential diagnosis.

In 50 cases, t(11;14)(IGH/CCND1) was detected by means of fluorescence in situ hybridization using LSI IGH/CCND1 XT Dual Color, Dual Fusion or LSI IGH/CCND1 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probes (Abbott Molecular, USA). In two additional cases, juxtaposition of bcl1/JHA was detected using polymerase chain reaction [25].

Proliferative activity

The immunohistochemical staining for Ki-67 antigen was evaluated as detailed previously [8]. In each slide, three representative high-power fields (HPF) were evaluated using a $\times 40$ objective with an eyepiece grid of 10×10 squares (measuring 0.0625 mm^2 ; eyepiece WH10/22; microscope BX40F4, Olympus Optical Ltd., Japan) and a hematological manual cell counter.

Assessment of microvessel density

A uniform random digital sampling was used to evaluate MVD [26, 27] in immunohistochemical slides with the anti-CD34 antibody (CD 34 Class 2, 1:100, DakoCytomation, Glostrup, Denmark). An unbiased counting frame was applied to each micrograph to estimate the number of profiles of microvessels per unit area (Q_A , quantity per area). A countable vessel was defined as any profile of CD34-positive endothelial cells or endothelial cell clusters separate from adjacent microvessels, tumor cells, or connective tissue elements. Profiles appearing to be derived from an adjacent vessel were also counted. The existence of vessel lumina, vessel diameter, and the presence of erythrocytes were not included in the criteria defining a microvessel. Vessels with clearly multilayered or even muscular walls were not counted [26]. Vessel profiles located fully inside the frame or those cutting the acceptance line, but not the rejection line, were counted, giving the number of vascular profiles per unit area. The unit area was estimated with a point grid consisting of 35 points per counting frame (i.e., 700 points per 20 image fields in each specimen) and calculated as the frame area multiplied by the relative fraction of selected points (i.e., lymphoid tissue excluding connective tissue, necrotic areas, and areas not covered with tissue) within the total number of points. Ellipse software (ViDiTo, Kosice, Slovak Republic) was used for all operations described above. In every case, microvessels were counted in 20 HPF (area of each 0.096958 mm^2 , total counted area 1.94 mm^2 per case) and the quantity of microvessels was recalculated to 1 mm^2 .

Statistics

OS was calculated from the date of diagnosis to the death of the patient irrespective of its cause or to the last follow-up in living patients. PFS was calculated from the date of diagnosis to the date of disease progression, relapse, death of any cause, or the last follow-up. The influence of single values (proliferative activity, MIPI, MVD) on OS and PFS was established by Cox proportional hazards regression (univariate analysis). Furthermore, Cox proportional hazards regression was used for multivariate analysis. The relationship of groups of values (quartiles of MVD, bone marrow infiltration, morphological

variants, type of growth, risk groups according MIPI) and of OS and PFS was analyzed by a log-rank test. Kaplan-Meier survival curves were used for visualization. The relationship between single values (proliferative activity and MIPI) and MVD was characterized by linear regression analysis and Pearson correlation coefficients. MVD values were compared with groups of values (MIPI, proliferative activity, MIPI constituents, morphological type, and type of growth) using the Kruskal-Wallis test. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant. For statistical evaluation, the program MedCalc, version 11.2.1.0 (MedCalc software, Mariakerke, Belgium) was used. MIPI, simplified MIPI (s-MIPI), and biological MIPI (b-MIPI) scores were calculated as published [1].

Results

Clinical data

The main data are summarized in Table 1. Of 177 patients with MCL, there were 119 men (67 %) and 58 women (33 %) with both the mean and median age at the time of diagnosis being 64 years (range 28–86). The median follow-up of 59 living patients was 76 months (range 3–182) including 2 patients lost to follow-up (3 and 12 months after the diagnosis; otherwise the follow-up is at least 39 months). The median OS was 46 months, with an OS of 41.7 % at 5 years. The median PFS was 22 months.

Treatment

The information about treatment is summarized in Table 1. It was varied, reflecting the retrospective character of our series as well as the heterogeneity of MCL therapy in daily practice. All but two patients (one, surgery only; the other, radiotherapy only) were treated with frontline chemotherapy ($N=175$); in 121 of them, it was combined with anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. In 11 out of 175 cases, a combination of induction chemotherapy and adjuvant radiotherapy was used.

Of 175 patients, 111 (63 %) were considered to be a non-intensive (conventional) treatment group (i.e., treated with R \pm CVP {rituximab \pm cyclophosphamide, vincristine, prednisone}, R \pm CHOP {rituximab \pm cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, and prednisone}, fludarabine or chlorambucil monotherapy or fludarabine/cyclophosphamide combinations protocols), whereas 64/175 (37 %) patients received intensive treatment (i.e., R-hyperCVAD/HD-MTX/AraC {rituximab-cyclophosphamide, vincristine, doxorubicine, dexamethasone/high-dose methotrexate/arabinoside}, maxiCHOP/AraC {cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone/arabinoside} without ASCT, chemoimmunotherapy induction followed by

Table 1 Clinical features and baseline treatment characteristics of patients with mantle cell lymphoma

		Number	Percent (%)
All patients		177	100
Gender	Female	58	33
	Male	119	67
Age at the time of diagnosis	<50	17	9.6
	50–59	43	24.3
	60–69	60	33.9
	≥70	57	32.2
Clinical stage (Ann Arbor)	I	4	2.3
	II	11	6.2
	III	18	10.2
	IV	143	80.8
	Unknown	1	0.6
B-symptoms	Present	79	44.6
Localization of specimen	Lymph node	133	75.1
	Gastrointestinal tract	9	5.1
	Tonsil	17	9.6
	Spleen	5	2.8
	Orbit	2	1.1
	Oral cavity	9	5.1
	Mediastinum + thoracic wall	2	1.1
	Bone marrow infiltration	Positive	133
White blood cells	over 10,000/ μ l	50	28.2
Lactate dehydrogenase	Elevated	97	54.8
ECOG status	2–4	45	25.6
MIPI	Low	39	22.4
	Intermediate	55	31.6
	High	80	46.0
Treatment	Rituximab combined with chemotherapy	121	68
	No chemotherapy	2	1.2
	CVP	10	11.3
	CHOP	69	39.0
	Fludarabine-based	19	10.7
	Other (CHOP/AraC, VAD, chlorambucil)	13	7.3
	Intensive induction without ASCT ^a	34	19.2
	Chemoimmunotherapy followed with high-dose consolidation and ASCT ^b	27	15.3
	Chemoimmunotherapy followed with allogeneic stem cell transplantation	3	1.7

CVP cyclophosphamide, vincristine, prednisone, *CHOP* cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, and prednisone, *VAD* vincristine, adriamycin, dexamethasone, *ASCT* autologous stem cell transplantation

^a For example, R-hyperCVAD (dose-escalated CHOP) alternating with high-dose cytarabine and methotrexate or R-maxiCHOP alternating with high-dose cytarabine without ASCT

^b For example, Nordic MCL2 protocol (R-maxiCHOP alternating with high-dose cytarabine, with ASCT) or standard R-CHOP with frontline ASCT

autologous or allogeneic stem cell transplantation). Maintenance treatment with rituximab was used in only 13 patients, following various firstline protocols.

Microvessel density and its relationship to prognosis and other factors

The vascularity of the lymphomas varied widely: the median MVD 158.2 vessels/mm², range 54.6–503.6 vessels/mm² (Fig. 1). No significant influence of MVD values on OS and PFS was identified ($P=0.1378$ and $P=0.0628$, respectively)

by the Cox proportional hazards regression when tested for the whole series with no subdivisions. To make more detailed analyses, subdivisions according to MVD values and therapy were used. According to their MVD values, the cases were divided arbitrarily into quartiles to enable better identification of the influence of MVD on survival and the construction of the Kaplan–Meier survival curves. The MVD values of the individual quartiles, expressed in vessels per square millimeter, were as follows: the first quartile $MVD < 117.4$, the second quartile $117.4 \leq MVD < 158.2$, the third quartile $158.2 \leq MVD < 206.6$, and the fourth quartile $MVD \geq 206.6$. The only visible

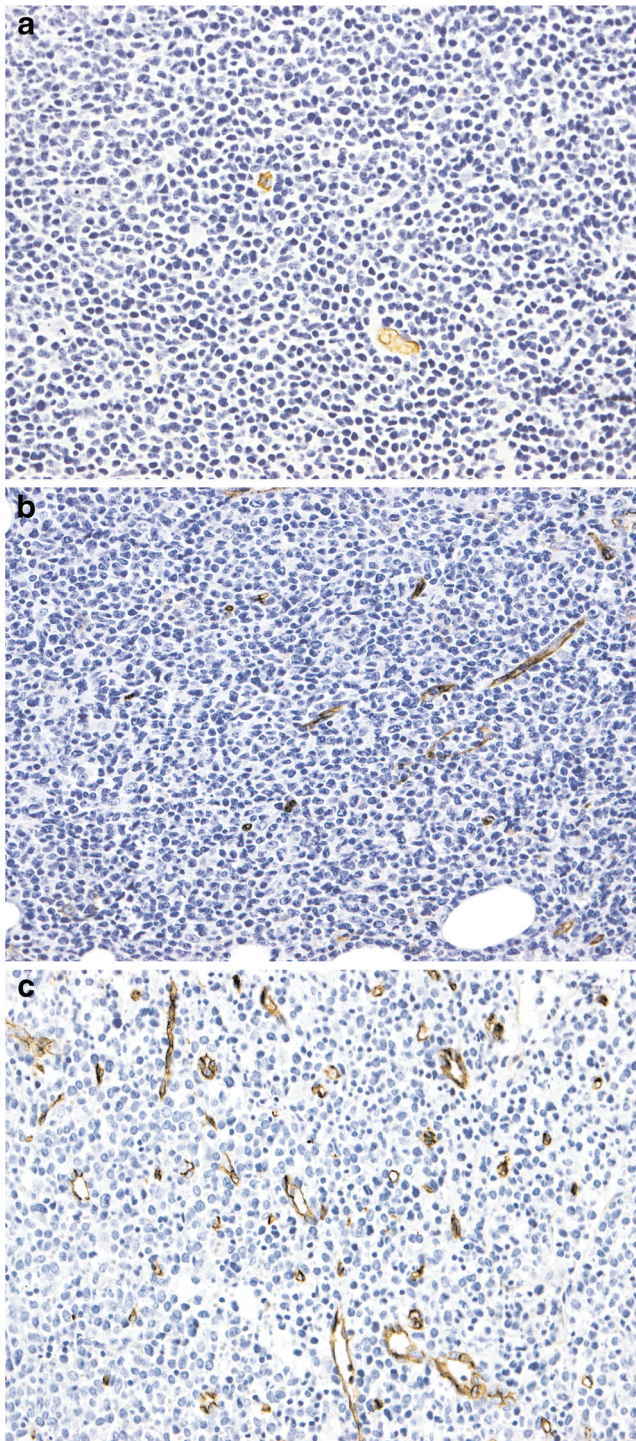


Fig. 1 Microvessels in mantle cell lymphoma: low (a), medium (b), and high (c) microvessel density (CD34, magnification $\times 200$)

difference concerning survival is between the fourth quartile and the grouping of the first three quartiles. The median OS in the first three quartiles (132 cases) vs. the fourth quartile (45 cases) is 56 vs. 30 months ($P=0.0842$), and the median PFS is 22 vs. 18 months ($P=0.0688$); Kaplan-Meier survival curves are shown in Fig. 2.

Furthermore, we assessed the prognostic value of MVD in a comparison of the non-intensive treatment group ($N=111$) with the intensive treatment group ($N=64$). There was a significant difference in the median PFS and OS between the two groups: 19 vs. 40 months ($P=0.0001$) and 31 vs. 72 months ($P=0.01$), respectively. In the Cox proportional hazards regression, higher MVD showed negative prognostic relevance for OS ($P=0.0419$) in the non-intensive treatment group but not for PFS ($P=0.0551$). No impact of MVD was observed for either PFS ($P=0.2052$) or OS ($P=0.6208$) in the intensive treatment group.

There were no significant differences in MVD values related to the tumor localization (nodal vs. various extranodal specimens; data not shown), the morphological variant, or the architecture of the tumor (see the following paragraphs).

The architecture and morphology

The patterns of growth and morphological variants were assessed according to the WHO [4] (Table 2). No correlation was identified between the type of growth and the following: survival, prognosis, Ki-67, MIPI, and MVD (data not shown).

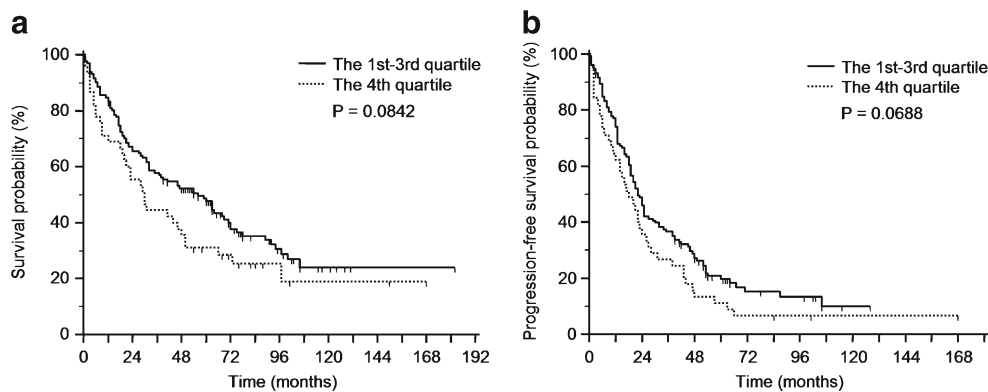
With regard to morphology, in 132 cases, the classical morphological variant prevailed. In 10 cases, aggressive variants (blastoid and pleomorphic) made up the sole morphological appearance; however, three of the 17 mixed cases displayed a combination of classical and pleomorphic variants, and the remainder of the mixed cases consisted of a combination of classical, small cell, and marginal-zone-like variants.

Comparing the 13 cases with morphological aggressive MCL variants to cases with other morphological variants ($N=164$), MVD values do not differ statistically significantly, but the proliferative activity, OS, and PFS do differ (Table 3). In the 13 cases with the aggressive variants, the median OS was 16 months, yet in the remaining 50 months ($P=0.0309$), and similarly, the median PFS was 11 vs. 22 months ($P=0.0548$).

Bone marrow infiltration and its relationship to survival and MVD

An initial bone marrow (BM) histology was available in 173 of 177 cases. Patients without BM infiltration ($N=40$) were compared to patients with involved BM ($N=133$) at presentation using log-rank test. Patients without BM infiltration have better PFS (median PFS 41 vs. 20 months, $P=0.0443$) but not OS (median OS 66 vs. 41 months, $P=0.0833$). Furthermore, cases with BM infiltration at the time of diagnosis ($N=133$) have a significantly higher MVD in the parallel tumor sample taken outside the BM than the cases without BM infiltration ($N=40$), median MVD 180.8 vs. 122.8 vessels/ mm^2 , $P=0.0001$.

Fig. 2 Kaplan-Meier survival curves demonstrating the relationship of values of microvessel density (the first to third quartiles vs. the fourth quartile) to overall survival (a) and progression-free survival (b)



Proliferative activity and its relationship to survival and microvessel density

The median number of cells counted per case (in three HPF) was 3,952 (range 1,430–6,783). The median Ki-67 value was 21.7 % (range 2.8–80.1 %). The statistically significant influence of Ki-67 index on OS ($P < 0.0001$) and PFS ($P < 0.0001$) was confirmed by Cox proportional hazards regression. The relationship between proliferative activity and MVD was not found to be significant using linear regression analysis ($P = 0.689$). In the cases with a Ki-67 index below 40 % (145 cases), the median MVD was 154.5 vessels/mm²; in the cases with a Ki-67 index above 40 % (32 cases), the median MVD was 194.6 vessels/mm² ($P = 0.0577$).

MIPI and its variants

MIPI, b-MIPI, and s-MIPI were assessed in 174 cases [1]. A statistically important influence of MIPI, b-MIPI, and s-MIPI values on OS and PFS was demonstrated using Cox

proportional hazard regression (in all instances, $P < 0.0001$). A correlation was found between MIPI including its variants and MVD values (Table 4). According to the values of MIPI (as well as b-MIPI and s-MIPI, respectively), the cases were divided into three risk groups [1]. As the low- and intermediate-risk groups do not show any significant differences in MVD values, they were grouped together and compared with the high-risk group (Table 3). In this way, we found a significant difference concerning MVD between the high-risk group and the low- + intermediate-risk cases.

Furthermore, a significant influence of some constituents of the MIPI score on MVD was found using Kruskal-Wallis test, namely, ECOG performance and white blood cell count (Table 3).

Univariate and multivariate analysis of prognostic influence

Complete data were available in 160 cases. The results of univariate and multivariate analyses are summarized in Table 5. In univariate analysis prognostic influence of morphological variant, MIPI, and proliferative activity was proved both for OS and PFS. The prognostic influence of bone marrow infiltration at the time of diagnosis was demonstrated for PFS. In multivariate analysis, MIPI and proliferative activity were proved to be prognostic markers both for OS and PFS, but other markers are not significant.

Table 2 Morphological variants and pattern of growth of MCL

Morphological variant	Number	Percent (%)
Classical	132	74.6
Small cell	14	7.9
Marginal zone-like	4	2.3
Mixed	17	9.6
Pleomorphic	8	4.5
Blastoid	2	1.1
Total	177	100.0
Pattern of growth	Number	Percent (%)
Diffuse	61	35.1
Nodular	56	32.2
Mantle zone	1	0.6
Nodular + diffuse	29	16.7
Mantle zone + diffuse	11	6.3
Mantle zone + nodular	16	9.2
Total	174	100.0

Discussion

There have been little available data about the vascular parameters of MCL [24] although some recent approaches in therapy, including drugs with antiangiogenic effects [15–18], have resulted in improved survival. Only a few studies have investigated the antiangiogenic effects of the therapy in MCL, but they have lacked baseline vascular parameters [16, 28]. This is why we evaluated MVD using anti-CD34 immunoreactions in our retrospective series of 177 MCL cases. In addition, we have investigated the relationship

Table 3 The relationship of clinical and morphological factors in mantle cell lymphoma (MCL); relationship of aggressive and other morphological variants to microvessel density (MVD), proliferative activity, and MCL international prognostic index (MIPI); relationship of high-versus

low- + intermediate-risk group of MIPI to MVD, median overall survival (OS), and progression-free survival (PFS); and relationship of MIPI constituents to MVD (survival by log-rank test, the remaining by Kruskal-Wallis test)

Morphological variants	Blastoid/Pleomorphic	Other	Kruskal-Wallis test, in survival log-rank test
<i>N</i> (%)	13 (7.3)	164 for MVD, MIPI (92.5), 161 for Ki-67, b-MIPI, s-MIPI (92.6)	
Median MVD (vessels/mm ²)	186.5	157.9	<i>P</i> =0.2728
Median Ki-67 (%)	64.3	20.7	<i>P</i> <0.001
Median MIPI	6.4	6.1	<i>P</i> =0.1397
Median b-MIPI	7.8	6.6	<i>P</i> =0.0015
Median s-MIPI	5.0	5.0	<i>P</i> =0.3081
MIPI risk group	High-risk	Low- + intermediate-risk	
<i>N</i> (%)	80 (45.2)	94 (53.1)	
Median MVD (vessels/mm ²)	191.2	141.5	<i>P</i> =0.0009
Median OS (months)	23	68	<i>P</i> <0.0001
Median PFS (months)	16	35	<i>P</i> <0.0001
b-MIPI risk group	High-risk	Low- + intermediate-risk	
<i>N</i> (%)	100 (57.5)	74 (42.5)	
Median MVD (vessels/mm ²)	180.5	149.4	<i>P</i> =0.0403
Median OS (months)	23	94	<i>P</i> <0.0001
Median PFS (months)	16	41	<i>P</i> <0.0001
s-MIPI risk group	High-risk	Low- + intermediate-risk	
<i>N</i> (%)	71 (40.8)	103 (59.2)	
Median MVD (vessels/mm ²)	186.5	150.7	<i>P</i> =0.0154
Median OS (months)	23	64	<i>P</i> <0.0001
Median PFS (months)	16	27	<i>P</i> =0.0001
Age	<60 years	≥60 years	
<i>N</i> (%)	60 (33.9)	117 (66.9)	
Median MVD (vessels/mm ²)	161.7	158.2	<i>P</i> =0.3622
White blood cells	Below 10,000/μl	Over 10,000/μl	
<i>N</i> (%)	127 (71.8)	50 (28.2)	
Median MVD (vessels/mm ²)	153.8	189.0	<i>P</i> =0.024
Lactate dehydrogenase	Lower than upper limit of laboratory	Higher than upper limit of laboratory	
<i>N</i> (%)	78 (44.1)	97 (54.8)	
Median MVD (vessels/mm ²)	154.2	165.1	<i>P</i> =0.2052
ECOG status	0–1	2–4	
<i>N</i> (%)	131 (74.4)	45 (25.6)	
Median MVD (vessels/mm ²)	144.4	200.9	<i>P</i> =0.0017

between MVD and other histopathological and clinical characteristics.

Our results show a broad distribution of MVD in MCL (range 54.6–503.6 vessels/mm², median 158.2 vessels/mm²). So far, MVD values obtained in various studies have been difficult to compare because vascular markers, as well as microscopic and mathematical evaluations, have differed greatly. Furthermore, the MVD and its role may vary according to the type of hematolymphoid neoplasm [22–24, 29–31]. Tzankov showed a markedly lower MVD in their 19 cases of

MCL than our present analysis, likely to be due to technical reasons. Using anti-CD34 antibody, they found MVD highest in DLBCL, followed by follicular lymphoma, and then by MCL and CLL [24]. A study by Ridell showed contradictory results: a markedly higher MVD in CLL contrasting with much lower counts in more aggressive lymphomas, namely, in MCL (nine cases) and DLBCL [29].

For the whole of our series, the median OS was 46 months and the median PFS 22 months, in concordance with other population-based studies of MCL [7, 32–34]. We found

Table 4 Correlations between MVD, MIPI, s-MIPI, b-MIPI, and Ki-67 with Pearson correlation coefficients

		Ki-67	MIPI	b-MIPI	s-MIPI
Microvessel density	Correlation coefficient	0.03	0.174	0.153	0.187
	Significance level <i>P</i>	0.689	0.021	0.044	0.013
	<i>N</i>	177	174	174	174
Ki-67	Correlation coefficient		0.235	0.616	0.229
	Significance level <i>P</i>		0.002	<0.001	0.002
	<i>N</i>		174	174	174
MIPI	Correlation coefficient			0.91	0.932
	Significance level <i>P</i>			<0.001	<0.001
	<i>N</i>			174	174
b-MIPI	Correlation coefficient				0.853
	Significance level <i>P</i>				<0.001
	<i>N</i>				174

statistically significantly worse OS in cases with higher MVD only in the non-intensive treatment group yet not in the intensive treatment group and in the whole series. Additional analyses would be needed, however, to verify whether a higher MVD confers a worse OS in patients indicated only for conventional chemoimmunotherapy. Other studies identified a higher MVD as a negative prognostic factor in some hematolymphoid tumors, namely, in multiple myeloma [21] and DLBCL [22, 23], while in follicular lymphoma, results have been contradictory [30, 31]. Further, Tzankov did not prove a prognostic role of MVD in their series of 266 B cell lymphoma [24]. Thus far, the prognostic role of MVD in lymphomas remains far from settled.

We have shown, for the first time, that BM infiltration by MCL at presentation correlates with a higher MVD in extramedullary MCL specimens. Thus a higher MVD seems to correspond with a higher biological aggressiveness in MCL. The exact mechanisms by which these features can be associated have not been elucidated. The relationship of MVD and of BM infiltration have not yet been analyzed in lymphomas, except for a single MCL case reported to have a higher MVD in the bone marrow after therapy with lenalidomide in comparison to that before the therapy, likely due to

immunomodulatory effects of lenalidomide activating macrophages [18].

In our study the BM infiltration correlates with shorter PFS but not with OS. Pittaluga also found a worse prognosis associated with BM infiltration in their 55 cases [35], but in contrast, Argatoff did not identify any influence of BM infiltration in their 80 patients with MCL [32].

Importantly, we identified a correlation of MVD values with MIPI, b-MIPI, and s-MIPI: MVD values are higher in the high risk groups of all of these MIPI variants. Taking a more detailed look, we can see higher MVD values correlating with the individual constituents of MIPI: a worse ECOG performance status and higher leukocytosis. Comparing age, higher MVD is seen in younger patients than in those above 60 years of age but without any statistical significance.

Importantly, we did not find any dependence of MVD values on the proliferative index (Ki-67). Similarly, a comparison of MVD between the two subgroups of MCL divided according to the Ki-67 index—namely, below and above 40 %—shows only statistically non-significant results. In contrast, Tzankov found a strong correlation of Ki-67 and MVD in their series of 266 B-non-Hodgkin lymphomas of various types. However, data concerning MCL were not

Table 5 Univariate and multivariate Cox proportional hazards regression of prognostic influence of MVD, MIPI, proliferative activity, morphological variant, and infiltration of bone marrow on OS and PFS

Characteristics (160 cases)	Reference level	OS <i>P</i> value		PFS <i>P</i> value	
		Univariate	Multivariate	Univariate	Multivariate
Microvessel density	Absolute value	0.2906	0.667	0.0858	0.6645
MIPI	Absolute value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0005
Ki-67	Absolute value	<0.0001	0.0105	<0.0001	0.0174
Bone marrow infiltration	Detected vs. not detected	0.0587	0.2124	0.0436	0.1487
Morphological variant	Aggressive vs. other	0.0117	0.2642	0.0044	0.1643

specifically stated [24]. Regarding other hematological malignancies, the relationship between MVD and Ki-67 has not been studied except for multiple myeloma in which a strong positive correlation was proven between these factors [36].

We did not find any statistically significant difference in MVD values when comparing the classical, aggressive, and other morphological variants in our series, and similarly, no such differences were identified between individual growth types. There have been no other data published on this subject with which to compare.

In multivariate analysis, we confirmed proliferative activity (Ki-67 index) and MIPI to be reliable prognostic markers of MCL. Neither morphological variants (aggressive vs. other), bone marrow infiltration at the time of diagnosis, nor MVD have a prognostic influence in multivariate analysis. In our univariate analysis, the prognostic influence of morphological variants (on OS and PFS) and bone marrow infiltration (on PFS) was identified. A majority of other authors showed a prognostic influence of proliferative activity [33, 37–39]. Regarding MIPI and its prognostic role, there have been conflicting results both in univariate and multivariate analyses [9, 37, 40, 41]. In concordance with our results, Romaguera [40], Rätty [33], and Tiemann [38] found no prognostic influence of aggressive morphological variants in multivariate analysis, but in contrast, it was demonstrated by Geisler [2].

We are aware of the limitations of this retrospective study. First, the therapy of our patients diagnosed between 1996 and 2008 was heterogeneous, and thus, their outcome may be strongly influenced by individual therapy types as well as by other factors such as clinical stage, BM infiltration, and MIPI [6, 7, 9, 32, 35]. Second, our series does not include non-nodal leukemic MCL cases. This is because our case inclusion criterion was a reliable diagnosis of MCL requiring an extramedullary FFPE specimen for a review, suitable for the Ki-67 and MVD assessment, thus practically excluding non-nodal leukemic cases of MCL [5].

One has to be aware that MVD only represents partial information about the tumor angiogenesis which may be characterized further by, e. g., analysis of other endothelial markers, the expression of vascular endothelial growth factor, and its receptors by means of immunohistochemistry, gene expression profiling, or serum studies. There is a need for future studies to better understand lymphoma-specific and drug-specific antiangiogenic mechanisms and subsequently to validate clinically useful biomarkers [15]. To this end, the data presented in our article provide the first systematic view of the vascular parameters of MCL and so may serve as a basis for such analyses.

In conclusion, this is the first clinicopathological study of MVD in MCL, assessed retrospectively using immunohistochemical reactions with anti-CD34 antibody in a series of 177 patients with long-term follow-up. Higher MVD in MCL is associated with more aggressive behavior, namely, with BM

infiltration at the time of diagnosis. Furthermore, in our series, high MVD is associated with worse OS in patients treated by conventional (non-intensive) therapy but not in the intensive treatment group and in the whole series. Univariate analysis identified a prognostic influence of morphological variant, MIPI, and proliferative activity on OS and PFS and a prognostic influence of bone marrow infiltration at the time of diagnosis on PFS. Multivariate analysis showed prognostic influence of MIPI and proliferative activity on OS and PFS only. Importantly, MVD correlates positively with the prognostic scores of MIPI and its variants but not with the proliferation Ki-67 index, the morphological variant, the pattern of growth, or with the localization.

Acknowledgments The help of many participating physicians and data managers providing clinical information and pathological specimens is greatly acknowledged. This study was supported in part by research grants of the Ministry of Education and Youth of the Czech Republic MSM0021620819 (LB), by the Charles University in Prague, Project No. P36 (ZT), and by the grant of the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic IGA MZ CR NT 12193-5 (LB, PV, DS, MT, on behalf of CLSG).

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, van Hoof A, Kluin-Nelemans HC, Pfreundschuh M, Reiser M, Metzner B, Einsele H, Peter N, Jung W, Wörmann B, Ludwig WD, Dührsen U, Eimermacher H, Wandt H, Hasford J, Hiddemann W, Unterhalt M (2008) A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 111:558–565
2. Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, Andersen NS, Pedersen LB, Jerkeman M, Eriksson M, Nordström M, Kimby E, Boesen AM, Kuittinen O, Lauritzsen GF, Nilsson-Ehle H, Ralfkiaer E, Akerman M, Ehinger M, Sundström C, Langholm R, Delabie J, Karjalainen-Lindsberg ML, Brown P, Elonen E (2008) Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in vivo-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group. *Blood* 112:2687–2693
3. Kluin-Nelemans HC, Hoster E, Hermine O, Walewski J, Trneny M, Geisler CH, Stilgenbauer S, Thieblemont C, Vehling-Kaiser U, Doorduijn JK, Coiffier B, Forstpointner R, Tilly H, Kanz L, Feugier P, Szymczyk M, Hallek M, Kremers S, Lepeu G, Sanhes L, Zijlstra JM, Bouabdallah R, Lugtenburg PJ, Macro M, Pfreundschuh M, Prochazka V, Raimondo FD, Ribrag V, Uppenkamp M, André M, Klapper W, Hiddemann W, Unterhalt M, Dreyling MH (2012) Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med* 367:520–531
4. Swerdlow SH, Campo E, Seto M, Müller-Hermelink HK (2008) Mantle cell lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (eds) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue. IARC Press, Lyon, pp 229–232
5. Fernández V, Salamero O, Espinet B, Solé F, Royo C, Navarro A, Camacho F, Beá S, Hartmann E, Amador V, Hernández L, Agostinelli C, Sargent RL, Rozman M, Aymerich M, Colomer D,

- Villamor N, Swerdlow SH, Pileri SA, Bosch F, Piris MA, Montserrat E, Ott G, Rosenwald A, López-Guillermo A, Jares P, Serrano S, Campo E (2010) Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 70:1408–1418
6. Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, Rätty R, Jerkeman M, Eriksson M, Nordström M, Kimby E, Boesen AM, Nilsson-Ehle H, Kuittinen O, Lauritzen GF, Ralfkiaer E, Ehinger M, Sundström C, Delabie J, Karjalainen-Lindsberg ML, Brown P, Elonen E (2010) The Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index (MIPI) is superior to the International Prognostic Index (IPI) in predicting survival following intensive first-line immunochemotherapy and autologous stem cell transplantation (ASCT). *Blood* 115:1530–1533
 7. van de Schans SA, Janssen-Heijnen ML, Nijziel MR, Steyerberg EW, van Spronsen DJ (2010) Validation, revision and extension of the Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index in a population-based setting. *Haematologica* 95:1503–1509
 8. Salek D, Vesela P, Boudova L, Janikova A, Klener P, Vokurka S, Jankovska M, Pytlík R, Belada D, Pimos J, Moulis M, Kodet R, Michal M, Janousova E, Muzik J, Mayer J, Trnecny M (2014) Retrospective analysis of 235 unselected patients with mantle cell lymphoma (MCL) confirms prognostic relevance of MIPI (MCL international prognostic index), and Ki-67 in the era of rituximab: long-term data from the Czech Lymphoma Project Database. *Leuk Lymphoma* 55:802–810
 9. Hoster E, Klapper W, Hermine O, Kluijn-Nelemans HC, Walewski J, van Hoof A, Trnecny M, Geisler CH, Di Raimondo F, Szymczyk M, Stügelbauer S, Thieblemont C, Hallek M, Forstpointner R, Pott C, Ribrag V, Doorduijn J, Hiddemann W, Dreyling MH, Unterhalt M (2014) Confirmation of the mantle-cell lymphoma International Prognostic Index in randomized trials of the European Mantle-Cell Lymphoma Network. *J Clin Oncol* 32:1338–1346
 10. Shah JJ, Fayad L, Romaguera J (2008) Mantle Cell International Prognostic Index (MIPI) not prognostic after R-hyper-CVAD. *Blood* 112:2583
 11. Ott G, Kalla J, Ott MM, Schryen B, Katzenberger T, Müller JG, Müller-Hermelink HK (1997) Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. *Blood* 89:1421–1429
 12. Katzenberger T, Petzoldt C, Höller S, Mäder U, Kalla J, Adam P, Ott MM, Müller-Hermelink HK, Rosenwald A, Ott G (2006) The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. *Blood* 107:3407
 13. Determann O, Hoster E, Ott G, Wolfram Bernd H, Loddenkemper C, Leo Hansmann M, Barth TE, Unterhalt M, Hiddemann W, Dreyling M, Klapper W (2008) Ki-67 predicts outcome in advanced-stage mantle cell lymphoma patients treated with anti-CD20 immunochemotherapy: results from randomized trials of the European MCL Network and the German Low Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 111:2385–2387
 14. Klapper W, Hoster E, Determann O, Oschlies I, van der Laak J, Berger F, Bernd HW, Cabeçadas J, Campo E, Cogliatti S, Hansmann ML, Kluijn PM, Kodet R, Krivolapov YA, Loddenkemper C, Stein H, Möller P, Barth TE, Müller-Hermelink K, Rosenwald A, Ott G, Pileri S, Ralfkiaer E, Rymkiewicz G, van Krieken JH, Wacker HH, Unterhalt M, Hiddemann W, Dreyling M (2009) Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma—consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *J Hematop* 2:103–111
 15. Ruan J, Hajjar K, Raffi S, Leonard JP (2009) Angiogenesis and antiangiogenic therapy in non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 20:413–424
 16. Wang L, Shi WY, Wu ZY, Varna M, Wang AH, Zhou L, Chen L, Shen ZX, Lu H, Zhao WL, Janin A (2010) Cytostatic and antiangiogenic effects of temsirolimus in refractory mantle cell lymphoma. *J Hematol Oncol* 3:30
 17. Wang M, Rule SA, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, Jurczak W, Advani RH, Romaguera JE, McGreivy J, Clow F, Stevens-Brogan M, Kunkel L, Blum KA (2012) Interim results of an international, multicenter, phase 2 study of Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor, ibrutinib (PCI-32765), in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (MCL): durable efficacy and tolerability with longer follow-up. *ASH Annu Meet Abstr* 120:904
 18. Zaja F, De Luca S, Vitolo U, Orsucci L, Levis A, Salvi F, Rusconi C, Ravelli E, Tucci A, Bottelli C, Balzarotti M, Brusamolino E, Bonfichi M, Pileri SA, Sabbatini E, Volpetti S, Monagheddu C, Vacca A, Ria R, Fanin R (2012) Salvage treatment with lenalidomide and dexamethasone in relapsed/refractory mantle cell lymphoma: clinical results and effects on microenvironment and neo-angiogenic biomarkers. *Haematologica* 97:416–422
 19. Bono AV, Celato N, Cova V, Salvatore M, Chinetti S, Novario R (2002) Microvessel density in prostate carcinoma. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 5:123–127
 20. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY (2004) Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res* 64:2941–2955
 21. Kumar S, Gertz MA, Dispenzieri A, Lacy MQ, Wellik LA, Fonseca R, Lust JA, Witzig TE, Kyle RA, Greipp PR, Rajkumar SV (2004) Prognostic value of bone marrow angiogenesis in patients with multiple myeloma undergoing high-dose therapy. *Bone Marrow Transplant* 34:235–239
 22. Gratzinger D, Zhao S, Tibshirani RJ, Hsi ED, Hans CP, Pohlman B, Bast M, Avigdor A, Schiby G, Nagler A, Byrne GE Jr, Lossos IS, Natkunam Y (2008) Prognostic significance of VEGF, VEGF receptors, and microvessel density in diffuse large B cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy. *Lab Invest* 88:38–47
 23. Cardesa-Salzmann TM, Colomo L, Gutierrez G, Chan WC, Weisenburger D, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Arenillas L, Serrano S, Tubbs R, Delabie J, Gascoyne RD, Connors JM, Mate JL, Rimsza L, Brazier R, Rosenwald A, Lenz G, Wright G, Jaffe ES, Staudt L, Jares P, López-Guillermo A, Campo E (2011) High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy. *Haematologica* 96:996–1001
 24. Tzankov A, Heiss S, Ebner S, Sterlacci W, Schaefer G, Augustin F, Fiegl M, Dirnhofer S (2007) Angiogenesis in nodal B cell lymphomas: a high throughput study. *J Clin Pathol* 60:476–482
 25. Lasota J, Franssila K, Koo CH, Miettinen M (1996) Molecular diagnosis of mantle cell lymphoma in paraffin-embedded tissue. *Mod Pathol* 9:361–366
 26. Tonar Z, Egger GF, Witter K, Wolfesberger B (2008) Quantification of microvessels in canine lymph nodes. *Microsc Res Tech* 71:760–772
 27. Wolfesberger B, Tonar Z, Witter K, Guija de Arespacohaga A, Skalicky M, Walter I, Thalhammer JG, Egger GF (2008) Microvessel density in normal lymph nodes and lymphomas of dogs and their correlation with vascular endothelial growth factor expression. *Res Vet Sci* 85:56–61
 28. Ruan J, Martin P, Coleman M, Furman RR, Cheung K, Faye A, Elstrom R, Lachs M, Hajjar KA, Leonard JP (2010) Durable responses with the metronomic regimen RT-PEPC in elderly patients with recurrent mantle cell lymphoma. *Cancer* 116:2655–2664
 29. Ridell B, Norrby K (2001) Intratumoral microvascular density in malignant lymphomas of B-cell origin. *AMPIS* 109:66–72
 30. Koster A, van Krieken JH, MacKenzie MA, Schraders M, Borm GF, van der Laak JA, Leenders W, Hebeda K, Raemaekers JM (2005) Increased vascularization predicts favorable outcome in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res* 11:154–161
 31. Taskinen M, Jantunen E, Kosma VM, Bono P, Karjalainen-Lindsberg ML, Leppä S (2010) Prognostic impact of CD31-positive

- microvessel density in follicular lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Eur J Cancer* 46:2506–2512
32. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD (1997) Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood* 89:2067–2078
 33. Rätty R, Franssila K, Joensuu H, Teerenhovi L, Elonen E (2002) Ki-67 expression level, histological subtype, and the International Prognostic Index as outcome predictors in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 69:11–20
 34. Kimura Y, Sato K, Arakawa F, Karube K, Nomura Y, Shimizu K, Aoki R, Hashikawa K, Yoshida S, Kiyasu J, Takeuchi M, Nino D, Sugita Y, Morito T, Yoshino T, Nakamura S, Kikuchi M, Ohshima K (2010) Mantle cell lymphoma shows three morphological evolutions of classical, intermediate, and aggressive forms, which occur in parallel with increased labeling index of cyclin D1 and Ki-67. *Cancer Sci* 101:806–814
 35. Pittaluga S, Verhoef G, Criel A, Maes A, Nuyts J, Boogaerts M, De Wolf Peeters C (1996) Prognostic significance of bone marrow trephine and peripheral blood smears in 55 patients with mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 21:115–125
 36. Alexandrakis MG, Passam FH, Dambaki C, Pappa CA, Stathopoulos EN (2004) The relation between bone marrow angiogenesis and the proliferation index Ki-67 in multiple myeloma. *J Clin Pathol* 57:856–860
 37. Schaffel R, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, Persky D, Maragulia J, Lin D, Portlock CS, Moskowitz CH, Zelenetz AD (2010) Prognostic impact of proliferative index determined by quantitative image analysis and the International Prognostic Index in patients with mantle cell lymphoma. *Ann Oncol* 21:133–139
 38. Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling MH, Campo E, Norton A, Berger F, Kluijn P, Ott G, Pileri S, Pedrinis E, Feller AC, Merz H, Janssen D, Hansmann ML, van Krieken H, Möller P, Stein H, Unterhalt M, Hiddemann W, Parwaresch R (2005) Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol* 131:29–38
 39. Schrader C, Meusers P, Brittinger G, Teymoortash A, Siebmann JU, Janssen D, Parwaresch R, Tiemann M (2004) Topoisomerase II α expression in mantle cell lymphoma: a marker of cell proliferation and a prognostic factor for clinical outcome. *Leukemia* 18:1200–1206
 40. Romaguera JE, Fayad LE, Feng L, Hartig K, Weaver P, Rodriguez MA, Hagemeister FB, Pro B, McLaughlin P, Younes A, Samaniego F, Goy A, Cabanillas F, Kantarjian H, Kwak L, Wang M (2010) Ten-year follow-up after intense chemoimmunotherapy with Rituximab-HyperCVAD alternating with Rituximab-high dose methotrexate/cytarabine (R-MA) and without stem cell transplantation in patients with untreated aggressive mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 150:200–208
 41. Oberley MJ, Rajguru SA, Zhang C, Kim K, Shaw GR, Grindle KM, Kahl BS, Kanugh C, Laffin J, Yang DT (2013) Immunohistochemical evaluation of MYC expression in mantle cell lymphoma. *Histopathology* 63:499–508

Mikrovaskulární denzita v lymfomech - hodnocení a klinický význam

Pavla Veselá¹, Zbyněk Tonar², Ludmila Boudová¹

¹Šiklův ústav patologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK v Plzni

²Ústav histologie a embryologie a Biomedicínské centrum LF UK v Plzni

SOUHRN

V posledních letech je u solidních nádorů i u lymfomů zaváděna do léčebných protokolů antiangiogenní terapie. To je jedním z důvodů, proč se podrobněji zkoumají parametry popisující nádorovou vaskularizaci, z nichž nejvýznamnější jsou mikrovaskulární denzita a imunohistochemická exprese VEGF (vascular endothelial growth factor) a jeho receptorů. Tento text shrnuje různé metody zjišťování mikrovaskulární denzity a prognostický vliv mikrovaskulární denzity u lymfomů.

Klíčová slova: mikrovaskulární denzita - lymfom - prognóza

Microvascular density in lymphomas - evaluation methods and clinical impact

SUMMARY

In recent years antiangiogenic therapy has become a part of treatment protocols of solid tumors as well as of lymphomas. This is why tumor vascularization has been explored, the most important parameters to describe it being the microvascular density and immunohistochemical assessment of the expression of VEGF (vascular endothelial growth factor) and of its receptors. This review summarizes various methods of assessment of the microvascular density and the prognostic impact of microvascular density in lymphomas.

Keywords: microvascular density - lymphoma - prognosis

Cesk Patol 2015; 51(2): 94 – 98

Nedílnou součástí nádorového růstu je aktivní angiogeneze v nádoru. Tento poznatek již začátkem sedmdesátých let popsal u solidních nádorů Folkman (1), dle něhož se prostou difúzí nádorová tkáň může živit jen do 1 - 2 mm in vivo a 2 - 4 mm in vitro. Pak je již zcela nutné vlastní cévní zásobení a tehdy dojde k tzv. angiogennímu přepnutí (angiogenní switch), kdy převáží angiogenní faktory nad antiangiogenními a dochází k novotvoře cév. Hlavní příčinou spuštění tohoto procesu je tkáňová hypoxie. U hematologických malignit novotvorba cévních struktur probíhá podobně jako v jiných tkáních za pomoci dvou cest. Jednou z nich je vaskulogeneze, tj. migrace progenitorových endoteliálních buněk z kostní dřeně, které se následně diferencují do zralých endotelií. Tento způsob je nezávislý na preexistujících cévách. Druhým mnohem významnějším způsobem je angiogeneze, odpovídající pučení již existujících cév s migrací zralých endoteliálních buněk (2). Hlavním spouštěcím faktorem je hypoxie, dále např. cytokiny či růstové faktory jako PDGF (platelet derived growth factor), či bFGF (basic fibroblast growth factor). Při hypoxii se uplatňuje von Hippel-Lindauův gen, který napomáhá stabilizaci a následnému transportu transkripčního faktoru HIF-1 alfa (hypoxia inducible factor alpha) do jádra, kde se váže se specifickou sekvencí HRE (hypoxia response element)

a tak stimuluje transkripci a navazující expresi VEGF (vascular endothelial growth factor), který je považován za hlavní angiogenní faktor. Jeho podtypy VEGF-A, VEGF-B a VEGF-E stimulují proliferaci a migraci endotelií a zvyšují cévní permeabilitu, zatímco VEGF-C a VEGF-D vedou k stimulaci lymfangiogeneze (2). VEGF není faktorem specifickým pro lymfatické uzliny s nádorem, nýbrž je exprimován i v normálních uzlinách (3,4). VEGF-A působí na endotel prostřednictvím receptorů VEGFR-1 (vascular endothelial growth factor receptor) a VEGFR-2 (5), které prostřednictvím své tyrosinkinázové aktivity spouštějí kaskádu intracelulárních informačních molekul („druhých posílů“). VEGFR-1 má pravděpodobně duální funkci a může se uplatňovat při podpoře, ale i útlumu angiogeneze, zatímco stimulace VEGFR-2 je považována za jednoznačně mitogenní faktor endotelií (6-9). Oba typy receptorů mohou být navíc v cílových tkáních tumoru zvýšeně externalizovány (up-regulace), což vede k vyšší senzitivě na VEGF, nebo internalizovány (down-regulace), což snižuje odpověď na VEGF (6).

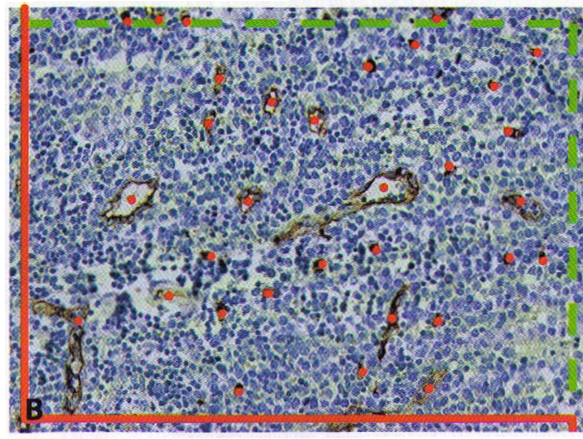
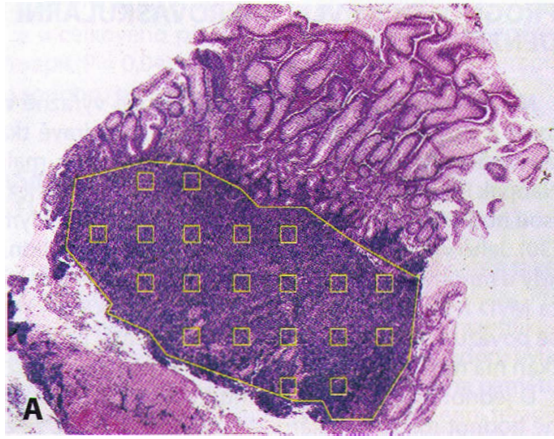
Nejrozšířenějším způsobem popisu míry angiogeneze v tkáni je mikrovaskulární denzita, o čemž svědčí mimo jiné více než 9000 publikací s heslem „microvessel density“ v databázi PubMed. Tato metoda je pro svou jednoduchost velmi oblíbená. Její aplikace a interpretace však má kromě výhod i některá omezení.

✉ Adresa pro korespondenci:

MUDr. Pavla Veselá
Šiklův ústav patologie
Dr. E. Beneše 13, 305 99 Plzeň
tel.: 377 402 294, fax: 377 402 634
e-mail: veselap@fnplzen.cz

MIKROVASKULÁRNÍ DENZITA

Mikrovaskulární denzita (MVD) je velmi často používána s cílem popsat intenzitu angiogeneze ve tkáních, nejčastěji nádorových. Pojmu mikrocévy (angl. microvessels) odpovídají nejdrobnější cévy, tedy arterioly, metarterioly, prekapiláry, vlastní kapi-



Obr. 1. Stanovení mikrovaskulární denzity pomocí metody systematického náhodného výběru zorných polí v definované oblasti. **A:** vzorkování v mantle cell lymfomu (MCL) infiltrujícím sliznici tlustého střeva (hematoxylin-eosin, zvětšení 50x). **B:** označení počítaných profilů mikrocév v jednom zorném poli MCL v lymfatické uzlině s využitím počítačového rámečku pro tzv. nevychýlené počítání (42), který sestává ze zakázaných linií (červeně, protínající cévní profily nejsou započítány) a povolených linií (zeleně přerušované, dotýkající se cévní profily jsou započítány) (protilátka CD34, zvětšení 200x).

láry, postkapiláry a venuly. Mikrovaskulární denzita pak odpovídá hustotě cévních profilů zastížených na řezu přepočtené na jednotku plochy tkáňového řezu nebo jeho analyzované části. Problémem u mikrovaskulární denzity je způsob jejího stanovení, protože najít dvě studie u jednoho typu nádoru prováděné stejnou metodou s použitím shodné protilátky je spíše výjimkou než pravidlem.

Používané imunoprotilátky

Odlišnosti ve studiích jsou už při použití jednotlivých endoteliálních protilátek pro vyznačení cévních struktur. Lze použít buď panendoteliální markery či markery vážící se na aktivované/proliferující endotelie.

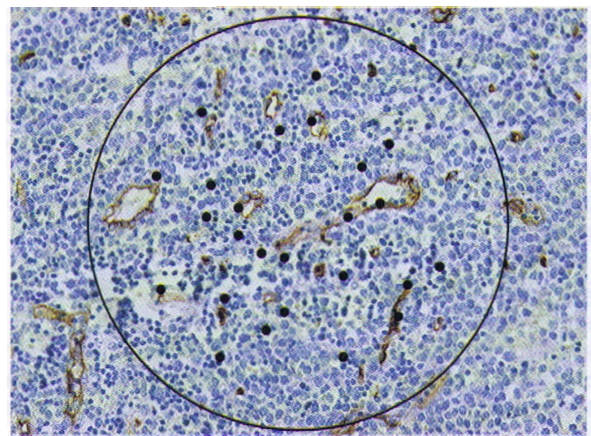
Z panendoteliálních markerů je nejužívanějším CD31. Jeho výhodou je, že nebarví lymfatické cévy. Naopak nevýhodou však může být, že reaguje i se zánětlivými buňkami jako jsou makrofágy, plazmocytů, neutrofilů či lymfocytů, což může být problém u nádorů s výraznějším zánětlivým pozadím, obzvláště při počítačové analýze obrazu. Dalším je CD34, u něhož jsou omezení v případě některých stromálních nádorů. U absolutních hodnot MVD stanovených imunoreakcí s protilátkou CD34 je při porovnání s CD31 třeba vzít v úvahu, že CD34 barví i část lymfatických cév, podobně jako další panendoteliální marker - faktor VIII. Omezením pro využití u faktoru VIII jsou také zjištění, že v některých orgánech chybí na části endoteliální populace, která není co do exprese imunohistochemicky využitelných povrchových molekul zcela homogenní (10,11). Studie porovnávající dva a více panendoteliálních markerů na sousedních řezech identickými bločky nádorové tkáně jsou vzácné (12) a nelze je bohužel zcela zobecňovat, protože mají vypovídací hodnotou omezenou na konkrétní orgán, na němž byly provedeny.

Druhou skupinou jsou markery vážící se na aktivované/proliferující endotelie. Příkladem je nestin (13) a CD 105 (endoglin) (14), které značí proliferující a nezralé endotelie. Způsobem zjištění míry proliferace endotelií může být také dvojité imunohistochemické barvení spojující proliferativní marker Ki-67 a endoteliální marker (15).

Způsoby hodnocení MVD

Vlastní stanovení hodnoty MVD lze provést různými způsoby (10,11,15). Metoda tzv. hot spots, zvaná také podle Weidnera (16), je patrně nejužívanější. Je založena nejdříve na nalezení

tzv. hot spots, tj. při malém zvětšení nalezení okrsků s nejvyšší mikrovaskulární denzitou, a v nich je pak v definované ploše při větším zvětšení spočítán počet drobných cévních prostor (jedno zorné pole při zvětšení 200x odpovídá ploše 0,74 mm², u 400x 0,19 mm²). Kritériem pro započtení mikrocévy není přítomnost vlastního lumen (může kolabovat či být komprimováno při odběru či zpracování bločku) či erytrocytů, je to pouze imunohistochemická pozitivita vybraného endotelového markeru v endotelové buňce či jejich clusteru. Naopak cévy většího kalibru s přítomností hladké svaloviny ve stěně se již jako mikrocévy nezapočítávají. Tento způsob je používán jak při manuálním počítání jednotlivých mikrocév, tak při použití počítačové analýzy obrazu, kdy jsou jednotlivé tzv. hot spots manuálně nalezeny a teprve vyfocená zorná pole analyzuje počítač. Je nutno poznamenat, že tzv. hot spots se nacházejí především na periferii nádoru, MVD je nejvyšší při jeho kontaktu se zdravou tkání, směrem do centra se snižuje (11). Některé studie však upozorňují na nedostatečnou opakovatelnost subjektivního výběru těchto oblastí maximální vaskularizace (17-19). Mikrovaskulární denzita získaná analýzou tzv. hot spots je interpretována jako číselný popis zastoupení nejvíce prokrvených míst tumoru s nejvyšší novotvorbou cév (18). Charakter vzorců rozmístění mikrocév v tumorech (tzv. vascular pattern) může být však velmi heterogenní a takto získaná mikrovaskulární denzita nemusí vypovídat o nádoru jako celku, nýbrž



Obr. 2. Projekce Chalkley count mřížky na mantle cell lymfom (protilátka CD34, zvětšení 200x).

o jeho biologicky nejaktivnějších oblastech s tím omezením, že nedokáže rozlišit poměrné zastoupení těchto center angiogeneze ve vyšetřovaném nádoru nebo jeho částce. Případy s několika izolovanými hot spots pak vedou ke stejnému číselnému výsledku jako tumor, jehož celé růstové čelo či dokonce celá periferie jeví zvýšenou neovaskularizaci.

Další možností využití počítačové analýzy při zjišťování hodnot MVD je počítání v systematicky náhodně vybraných arbitrárně stanovených zorných polích (18,20), tedy zorných polí v přesně stanovené vzdálenosti od sebe. Proto nejprve provádíme systematické vzorkování zorných polí v rámci řezu s cílem zajistit standardizovaný rozestup mezi snímanými zornými poli (obr. 1A). Po technické stránce lze systematický rozestup zorných polí v osách XY mikroskopického posuvu garantovat buďto pomocí mikroskopu s motorizovaným stolčkem, nebo i manuálním posuvem o určitý počet zorných polí, což je v praxi úkon proveditelný s dostatečnou přesností. Tento způsob vzorkování zajistí, aby se jednotlivé oblasti řezu s mnohdy rozmanitou hustotou mikrocév podílely na výsledné hodnotě reprezentující celý řez vahou úměrnou četnosti svého výskytu v preparátu. K vlastním počítání cévních profilů v zorném poli lze pak s výhodou použít klasického počítacího rámečku, kde jsou počítačovým programem s interaktivní kontrolou odečítajícího nalézány profily odpovídající mikrocévám (obr. 1B) (18,21). Výsledky MVD získané počítačovou analýzou vybraných polí korelují s výsledky získanými manuálním počítáním jak u metody hot spots (22), tak u metody systematicky náhodně vybraných polí (20). Obecně je hlavní výhodou počítačové analýzy obrazu časová úspora a omezení subjektivních vlivů jednotlivých odečítajících. Je zde i možnost získat další údaje o vaskularitě v daném zorném poli, jmenovitě o ploše či průměru cévních lumen (23). Je nutné poznamenat, že zapojení obrazové analýzy klade vysoké nároky na uniformitu barvení a eliminaci artefaktů.

Dalším způsobem počítačové analýzy obrazu je skenování celého preparátu a počítání mikrocév na celé ploše s následným přepočtením na jednotku plochy (24), kde je vytvořen virtuální řez pomocí skeneru pro digitalizaci skla, který je následně celý pomocí programů pro analýzu obrazu vyhodnocen. Tato strategie se nazývá „whole mount pathology“ či „whole slide imaging“ a umožňuje systematické vyšetření celé plochy řezu tak, aby i zde měla data získaná z jednotlivých oblastí váhu úměrnou svému zastoupení (25). Analýzou po sobě následujících řezů je možné rovněž vytvořit trojrozměrný obraz cévních struktur, z něhož je možné zjistit procentuální objemové zastoupení cév na objemu vyšetřované tkáně (mikrovaskulární objem) (26). Trojrozměrné rekonstrukce cévních stromů nabízejí sice současně i zajímavé vizualizace, svou pracností se však obvykle vymykají požadavkům rutinního odečtu mikrocév.

Další způsobem zjišťování hodnot MVD je tzv. Chalkley count. V tomto případě se po nalezení oblastí obsahující nejvíce drobných cév použije speciální okulár s mřížkou s 25 náhodně rozloženými body na velkém zvětšení 200 - 250x, ten je pak rotován tak, aby co nejvíce bodů bylo na stěně cév či uvnitř jejich lumen a tyto body jsou pak spočítány (obr. 2), tato hodnota je pak použita pro porovnání mezi jednotlivými vzorky. Tento způsob spíše popisuje míru plochy cév v daném zorném poli než jejich hustotu (27).

Výjimečně používanou metodou je semikvantitativní stanovení MVD, tedy určení nízké, střední a vysoké MVD dle subjektivního hodnocení posuzovatele. Hlavním problémem tohoto způsobu je velmi subjektivní hodnocení s vysokou variabilitou mezi posuzovateli, naopak za výhodu lze považovat nízkou časovou náročnost. U solidních nádorů byla prokázána korelace mezi kvantitativní a semikvantitativní metodou (28).

PROGNOSTICKÝ VLIV MIKROVASKULÁRNÍ DENZITY V LYMFOMECH

Mikrovaskulární denzita je dle Ribattiho výrazně vyšší u lymfomů s nízkým stupněm malignity než u zdravé tkáně a ještě výrazně vyšší u lymfomů s vysokým stupněm malignity (29). Naopak Ridell popisuje, že mimo chronické lymfatické leukémie jsou hodnoty MVD ostatních lymfomů nižší než u lymfadenitidy (30). Jeho výsledkům jsou podobná zjištění od solidních nádorů, kdy u mnohých z nich (prs, mozek, plíce, tlusté střevo) je hodnota MVD nižší než u původní nenádorové tkáně (31). Za důvod se považuje fakt, že hodnoty MVD jsou nižší proto, že nádorová tkáň má nižší spotřebu kyslíku než normální tkáň (32).

U jednotlivých typů lymfomů lze ze stávajících studií ohledně hodnot mikrovaskulární denzity učinit závěr, že agresivnější lymfomy mívají vyšší absolutní hodnotu MVD. Jmenovitě Tzankov pomocí protilátky CD34 (33) zjišťuje nejvyšší hodnotu MVD u difúzního velkobuněčného B-lymfomu (DLBCL), dalšími v pořadí jsou folikulární lymfom, lymfom z pláštových buněk (mantle cell lymfom, MCL), lymfom z malých B-lymfocytů/chronická lymfatická leukémie (B-SLL/B-CLL). Jorgensen (27) s využitím protilátky CD34 zjišťuje, že nejvyšší hodnotu MVD má periferní T lymfom (PTCL), střední hodnotu DLBCL a nejnižší má folikulární lymfom, a to v intrafolikulární oblasti, je zajímavé, že když byly hodnoty MVD zjišťovány v interfolikulárních oblastech, byly hodnoty výrazně vyšší než jsou hodnoty MVD u PTCL. Výsledky byly v této studii shodné, ať byla použita Chalkley count metoda či metoda hot spots. Naproti tomu Ridell pomocí imunoprotilátky CD34 popisuje vyšší MVD u chronické lymfatické leukémie, zatímco agresivnější lymfomy (MCL, DLBCL) ji mají nižší (30).

Problémem při porovnání studií věnovaných prognostickému vlivu MVD u jednotlivých typů lymfomů je jednak různý způsob zjišťování MVD a také použití různých protilátek.

Toho lze dokumentovat u DLBCL, kde jedna studie byla provedena pomocí protilátky CD34 (34), zatímco druhá pomocí CD31 (35). V první studii (34) bylo zjištěno, že zvýšené hodnoty MVD jsou spojeny s horším přežitím ($P = 0,047$), avšak nebylo možné stanovit jasný předěl v hodnotě MVD mezi skupinami s lepší a horší prognózou, při rozdělení dle mediánu nebyl rozdíl mezi skupinami prokázán u celkového přežití (medián přežití 77 a 48 měsíců, $P = 0,065$), ani u doby přežití bez progresu (progression free survival - PFS) (medián PFS 47 a 28 měsíců, $P = 0,17$). Naproti tomu, ve druhé studii (35) se případy dělily dle mediánu MVD a je zde vliv těchto skupin MVD na 4 leté celkové přežití (78 resp. 54 %, $P = 0,001$) a 4 leté PFS (65 resp. 48 %, $P = 0,048$). Přestože v obou publikacích byl prokázán negativní vliv vyšších hodnot MVD na přežití pacientů, výsledky obou studií jsou vzhledem k parametrům vzájemně neporovnatelné.

V případě klasického Hodgkinova lymfomu (většina případů odpovídala variantě nodulární skleróza) byla hodnota MVD zjišťována pomocí protilátky CD34 (36). Případy byly rozděleny dle mediánu, u případů s nízkou MVD je 5leté přežití 94%, u vysoké MVD 84% ($P = 0,0397$).

V případě folikulárního lymfomu byla publikována studie prováděná pomocí protilátky CD34 (37), kde byly případy rozděleny na třetí tercil a zbývající část případů. V případě 3. tercilu dle hodnot MVD je lepší celkové přežití (94 vs. 50 měsíců, $P = 0,03$) i PFS (47 vs. 13 měsíců, $P = 0,02$). Naopak ve studii s použitím protilátky CD31 (38) je u případů s vyšší MVD horší celkové přežití i PFS.

U chronické lymfatické leukémie v kostní dřeni nebyl ve 2 studiích pomocí faktoru VIII či CD34 zjištěn prognostický vliv MVD, pouze hodnoty MVD zjištěné pomocí CD34 jsou významně vyšší než hodnoty získané pomocí faktoru VIII (39,40).

V případě lymfomu z pláštových buněk byla studie prováděna pomocí imunoprotilátky proti CD34 při využití počítačové

analýzy náhodně vybraných 20 polí, prognostický vliv MVD byl zjištěn pouze u celkového přežití u skupiny pacientů léčených konvenční terapií (P = 0,04), nikoli u pacientů s intenzivní terapií ani u celého souboru pacientů z populační studie (21).

MIKROVASKULÁRNÍ DENZITA V HODNOCENÍ ÚČINNOSTI ANTIANGIOGENNÍ TERAPIE

U MVD se v případě aplikace antiangiogenní terapie nabízí také možnost využít ji jako faktor ukazující efektivitu této léčby. Při tomto použití roste význam hodnocení založeného na kvantifikaci celého řezu tak, aby statistická váha různých oblastí nádoru byla úměrná jejich zastoupení na řezu (25). Je vhodné mít na paměti, že MVD je číselným zlomkem, přičemž při antiangiogenní terapii může být ovlivněn jak jeho číselník (množství cév), tak jmenovatel (plocha řezu, v níž se tyto cévy vyskytují). Například úbytek cév provázený proporcionálním zmenšením tumoru vyústí v nezměněnou MVD, přestože terapeutického ovlivnění mohlo být částečně dosaženo. U nádorů obsahujících složku, která z principu není nositelem vaskularizace (epitelová složka karcinomů), se do výsledné MVD promítá i poměr mezi epitelovými nádorovými buňkami a nádorovým vaskularizovaným stromatem. Tento aspekt sice u lymfomů odpadá, ale při interpretaci dat MVD je vhodné mít na paměti, že MVD nepopisuje vaskulární inhibici nezávisle na ostatním prostředí, ale je to spíše komplex změn ovlivněných iniciální vaskulární supresí a následně interakcí mezi vaskulárními a nádorovými elementy. Při podání antiangiogenní léčby totiž nejdříve dochází k inhibici, případně eliminaci kapilár, následované eliminací nádorových buněk a celý tento proces ovlivňuje hodnoty MVD. Nejdříve dochází k jejich rychlejšímu poklesu a později se pokles hodnot MVD v odebraných vzorcích během léčby zpomaluje. U některých nádorů může dojít po ukončení terapie k zvýšení hodnot MVD na předterapeutické hodnoty, přestože efekt antiangiogenní léčby u pacienta je zdokumentován, a to v případech, kdy terapie významně nenaruší metabolické po-

třeby či produkci angiogenních faktorů nádorových buněk (32). U solidních nádorů se ukazuje, že efekt antiangiogenní terapie se významněji neliší u případů s nízkou ani vysokou hodnotou MVD nádoru. Jen je popsáno, že při poklesu MVD ve vzorku z doby terapie je terapie efektivní (11), avšak pokud k poklesu nedochází či naopak dochází k zvýšení hodnoty MVD, vůbec to nevylučuje efektivitu terapie (32). Tento jev byl mimo jiné popsán při použití thalidomidu u mnohočetného myelomu, kde byl patrný významný pokles MVD pouze u části případů s terapeutickým efektem (41). U lymfomů tyto poterapeutické změny ještě nebyly podrobněji zkoumány.

ZÁVĚR

MVD je v případě mnoha hematologických malignit prokázán jako další prognostický faktor. Problémem je, že u většiny typů nádorových onemocnění jsou k dispozici pouze jedna či dvě studie, tedy praktické využití je třeba podrobněji a rozsáhleji studovat a také stanovit standardně opakovatelný a rychlý způsob, jak hodnotit MVD v denní praxi patologa. Pro hodnocení efektivnosti antiangiogenní léčby se stanovování hodnot během a po terapii dosud nejvíce jako přínosné, stejně jako pro výběr pacientů vhodných k antiangiogenní léčbě.

PODĚKOVÁNÍ

Práce byla podpořena projektem ED2.1.00/03.0076 Evropského fondu pro regionální rozvoj, grantem Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR NT 12193-5 a částečně financována projektem PRVOUK P36 Univerzity Karlovy v Praze.

PROHLÁŠENÍ

Autor práce prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou. Toto prohlášení se týká i všech spoluautorů.

LITERATURA

1. Folkman J. Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res* 1974; 34: 2109-2113.
2. Kleiner P. Angiogeneze jako součást nádorového „ekosystému“ a možnosti jejího ovlivnění. *Klin Onkol* 2010; 23(1): 14-20.
3. Turley H, Scott PA, Watts VM, Bicknell R, Harris AL, Gatter KC. Expression of VEGF in routinely fixed material using a new monoclonal antibody VG1. *J Pathol* 1998; 186: 313-318.
4. Wolfesberger B, Guija de Arespacohaga A, Willmann M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in canine lymphomas. *J Comp Pathol* 2007; 137(1): 30-40.
5. Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7533-7537.
6. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9(6): 669-676.
7. Rahimi N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Front Biosci* 2006; 11: 818-829.
8. Roskoski R Jr. VEGF receptor-tyrosine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 375: 287-291.
9. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39: 469-478.
10. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14): 2474-2484.
11. Nico B, Benaglio V, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A, Ribatti D. Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol* 2008; 23: 601-607.
12. Norrby K, Ridell B. Tumour-type-specific capillary endothelial cell stainability in malignant B-cell lymphomas using antibodies against CD31, CD34 and Factor VIII. *AMPIS* 2003; 111: 483-489.
13. Tichý M, Tichá V, Ščudla V, Šváchová M, Zápletalová J. Analýza angiogeneze v kostní dřeni u plazmocytárního myelomu. *Cesk Patol* 2010; 46(1): 15-19.
14. Sugita Y, Takase Y, Mori D, Tokunaga O, Nakashima A, Shigemori M. Endoglin (CD 105) is expressed on endothelial cells in the primary central nervous system lymphomas and correlates with survival. *J Neurooncol* 2007; 82: 249-256.
15. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1564-1579.
16. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
17. Fox SB, Harris AL. Histological quantitation of tumour angiogenesis. *AMPIS* 2004; 112(7-8): 413-430.
18. Tonar Z, Egger GF, Witter K, Wolfesberger B. Quantification of microvessels in canine lymph nodes. *Microsc Res Tech* 2008; 71: 760-772.
19. Preusser M, Heinzl H, Gelpi E, et al. Histopathologic assessment of hot-spot microvessel density and vascular patterns in glioblastoma: Poor observer agreement limits clinical utility as prognostic factors-A translational research project of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Cancer* 2006; 107: 162-170.
20. Brawer MK, Deering RE, Brown M, Preston SD, Bigler SA. Predictors of pathologic stage in prostatic carcinoma. The role of neovascularity. *Cancer* 1994; 73: 678-687.
21. Veselá P, Tonar Z, Šálek D, et al. Microvessel density of mantle cell lymphoma. A retrospective study of its prognostic role and the correlation with the Ki-67 and the mantle cell lymphoma.

- phoma international prognostic index in 177 cases. *Virchows Arch* 2014; 465(5): 587-597.
22. **Rana C, Sharma S, Agrawal V, Singh U.** Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma and its correlation with clinicopathological factors. *Ann Hematol* 2010; 89: 789-794.
 23. **Kašparová P, Smolej L.** Angiogeneze v kostní dřeni u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií. *Cesk Patol* 2007; 43(2): 50-58.
 24. **Chantrain CF, DeClerck YA, Groshen S, McNamara G.** Computerized quantification of tissue vascularization using high-resolution slide scanning of whole tumor sections. *J Histochem Cytochem* 2003; 51(2): 151-158.
 25. **Liu W, Xu J, Wang M, Wang Q, Bi Y, Han M.** Tumor-derived vascular endothelial growth factor (VEGF)-a facilitates tumor metastasis through the VEGF-VEGFR1 signaling pathway. *Int J Oncol* 2011; 39(5): 1213-1220.
 26. **Liu YA, Pan ST, Hou YC, et al.** 3-D Visualization and Quantitation of Microvessels in Transparent Human Colorectal Carcinoma. *PLoS One* 2013; 8(11): e81857.
 27. **Jorgensen JM, Sorensen FB, Bendix K, et al.** Angiogenesis in non-Hodgkin's lymphoma: clinico-pathological correlations and prognostic significance in specific subtypes. *Leuk Lymphoma* 2007; 48(3): 584-595.
 28. **Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL.** Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, chalcid count, and computer image analysis. *J Pathol* 1995; 177(3): 275-283.
 29. **Ribatti D, Vacca A, Nico B, Fanelli M, Roncali L, Dammacco F.** Angiogenesis spectrum in the stroma of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. An immunohistochemical and ultrastructural study. *Eur J Haematol* 1996; 56(1-2): 45-53.
 30. **Ridell B, Norrby K.** Intratumoral microvascular density in malignant lymphomas of B-cell origin. *AMPIS* 2001; 109: 66-72.
 31. **Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG.** Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* 2000; 60(5): 1388-1393.
 32. **Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J.** Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(12): 883-893.
 33. **Tzankov A, Heiss S, Ebner S, et al.** Angiogenesis in nodal B cell lymphomas: a high throughput study. *J Clin Pathol* 2007; 60: 476-482.
 34. **Gratzinger D, Zhao S, Tibshirani RJ, et al.** Prognostic significance of VEGF, VEGF receptors, and microvessel density in diffuse large B cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy. *Lab Invest* 2008; 88: 38-47.
 35. **Cardesa-Salzmann TM, Colomo L, Gutierrez G, et al.** High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy. *Haematologica* 2011; 96(7): 996-1001.
 36. **Korkolopoulou P, Thymara I, Kavantzis N, et al.** Angiogenesis in Hodgkin's lymphoma: a morphometric approach in 286 patients with prognostic implications. *Leukemia* 2005; 19: 894-900.
 37. **Koster A, van Krieken JH, MacKenzie MA, et al.** Increased vascularization predicts favorable outcome in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 154-161.
 38. **Taskinen M, Jantunen E, Kosma VM, Bono P, Karjalainen-Lindsberg ML, Leppä S.** Prognostic impact of CD31-positive microvessel density in follicular lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Eur J Cancer* 2010; 46(13): 2506-2512.
 39. **Smolej L, Kašparová P.** Choice of endothelial marker is crucial for assessment of bone marrow microvessel density in chronic lymphocytic leukemia. *AMPIS* 2008; 116(12): 1058-1062.
 40. **Antic D, Jovanovic MP, Fekete MD, Cokic V.** Assessment of bone marrow microvessel density in chronic lymphocytic leukemia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010; 18(4): 353-356.
 41. **Singhal S, Mehta J, Desikan R, et al.** Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999; 341(21): 1565-1571.
 42. **Gundersen HJG.** Notes on the estimation of numerical density of arbitrary particles. The edge effects. *J Microsc* 1977; 111: 219-223.

Nové perspektivy v patogenezi a diagnostice lymfomu z plášťových buněk (mantle cell lymfomu)

David Šálek¹, Andrea Janíková¹, Pavla Veselá², Jiří Mayer¹

¹Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice a Masarykova univerzita Brno

²Šiklův ústav patologie, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Plzni a Fakultní nemocnice Plzeň

Mantle cell lymfom (MCL) neboli lymfom z plášťových buněk patří mezi vzácnější B-lymfoproliferace s podílem asi 7–8% na celkovém množství všech neHodgkinových lymfomů. Klinicky se MCL vyznačuje neblahou kombinací vlastností indolentních (rekurentní průběh) a agresivních (vysoká proliferační aktivita, chemorezistence) lymfomů. Prognóza onemocnění zůstává stále neuspokojivá s mediánem přežití 4–5 let. V současné době se předpokládá, že pro vznik klinicky manifestního MCL je nutný souběh několika patologických událostí na genové úrovni. Nezbytným předpokladem je porucha regulace buněčného cyklu řízené cyklinem D1, za další krok se považuje defekt v buněčné odpovědi na poškození DNA. Prvotní a zásadní genovou přestavbou je u MCL pravděpodobně translokace t(11;14), při níž vzniká patologický fuzní gen BCL1/IGH. Produktem této přestavby je nadměrná produkce cyklinu D1, která však ke vzniku maligního lymfomu sama o sobě nestačí. U MCL je také častá delece 11q22–23. Na tomto lokusu je umístěn gen pro ATM kinázu. V případě delece ATM genu se výrazně zvyšuje genomická nestabilita a vzrůstá tak frekvence dalších mutací. Na základě studií genové exprese byly identifikovány další patogenetické mechanismy. Jedním z nich je například konstitutivní aktivace transkripčního faktoru NF-kappaB majícího anti-apoptotický účinek nebo aktivace systému mTOR zvyšujícího translaci mRNA. Je důležité zmínit možnost cíleného terapeutického ovlivnění výše zmíněných drah (bortezomib, temsirolimus). Dalšími sekundárními aberacemi je rekurentní somatická mutace NOTCH1 a SOX 11 (neuronální transkripční faktor), jejich význam v prognóze a patogenezi zůstává nejednoznačný.

Klíčová slova: mantle cell lymfom, cyklin D1, t(11;14), SOX-11, NOTCH1.

New perspectives in the pathogenesis and diagnosis of mantle cell lymphoma

Mantle cell lymphoma represents about 7-8 % of all non-Hodgkin lymphomas. This entity is characterized by a combination of mostly aggressive clinical course and frequent relapses. The prognosis remains poor with a median overall survival of 4-5 years. It is hypothesized that a coincidence of several pathological events is necessary for arise of clinically manifest MCL. The primary oncogenic mechanism is considered to be a chromosomal translocation t(11;14) with juxtaposition of BCL1 gene to the IGH gene. It results in overexpression of cyclin D1, which positively affects the G1-S transition of cell cycle. Another frequent mutation is a deletion 11q22-23 leading to the inactivation of the ATM gene responsible for the DNA damage response. In such case, the genomic instability and subsequently the frequency of another mutations is highly increased. The gene expression profiling revealed many additional genetic alterations, such as constitutive activation of transcription factor NF-kappaB with anti-apoptotic effect or activation of mTOR system. Importantly, these pathways can be influenced by new targeted drugs (bortezomib, temsirolimus). Another secondary aberrations found in MCL are mutations in NOTCH1 gene and overexpression of neuronal transcription factor SOX11. However their significance for the pathogenesis and prognosis remains unclear.

Key words: mantle cell lymphoma, cyclin D1, t(11;14), SOX-11, NOTCH1.

Onkologie 2013; 7(3): 121–126

Úvod

Lymfom z plášťových buněk – z anglického termínu „mantle cell lymphoma“ (MCL) – tvoří zhruba 6–8% všech ne-Hodgkinových lymfomů (NHL). Dle aktuální klasifikace malignit hematopoetické a lymfoidní tkáně WHO (Health Organization) z roku 2008 je definován jako zralá neoplazie B-řady, která je obvykle tvořena monomorfní populací malých až středně velkých lymfoidních buněk s nepravidelným jádrem, nesoucích pro MCL typickou chromozomální translokaci t(11;14) (q13;q32) (1). Tato přestavba postihující gen pro cyklin D1 byla v souvislosti s lymfoproliferacemi popsána sice již v roce 1979 (2), nicméně až s pochopením její zásadní role u MCL počátkem 90. let se vlastně začala psát novodobá historie této jednotky (3, 4). Mantle

cell lymfom byl poprvé pod tímto označením jasně definován v evropsko-americké klasifikaci REAL z roku 1994 (5) a následně v první verzi klasifikace WHO z roku 2001. V dřívějších schématech lymfomu z plášťových buněk odpovídal centrocytický lymfom dle Kielské klasifikace a intermediárně diferencovaný lymfocytický lymfom dle klasifikace Rappaportovy.

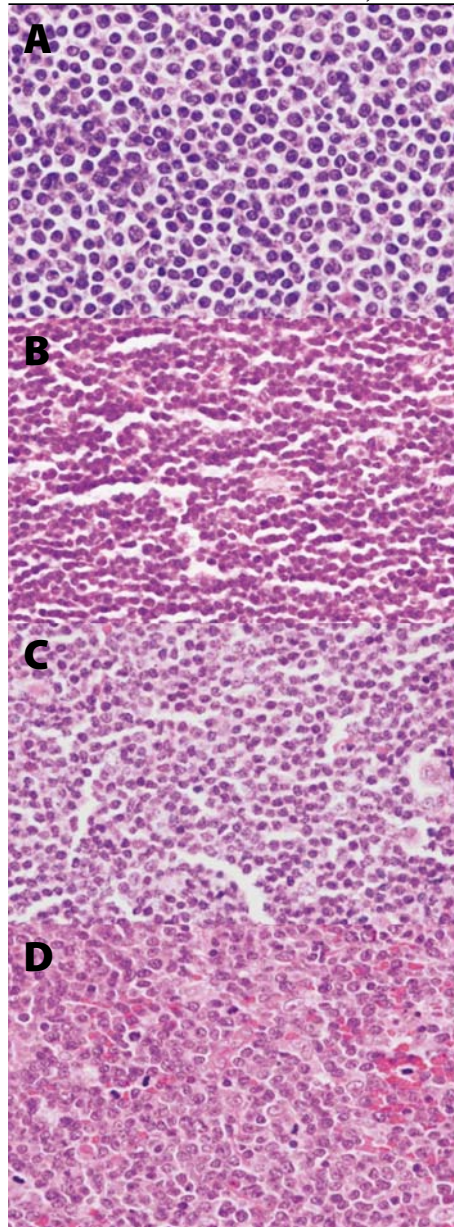
Následující sdělení přináší podrobný přehled poznatků o tomto typu maligního lymfomu, od klinického obrazu přes morfolologii až po současný pohled na patogenезi s potenciálním ovlivněním některých drah cílenými léky.

Klinický obraz

Mantle cell lymfom je onemocnění spíše vyššího věku s mediánem výskytu okolo 64 let,

s převahou mužů nad ženami (přibližně 2:1). U naprosté většiny pacientů (80–90%) je nemoc diagnostikována v pokročilém klinickém stadiu (III-IV dle Ann Arbor), typicky s generalizovanou lymfadenopatií (až 80% pacientů), infiltrací kostní dřevě (70–80%) a leukemizací, případně i se splenomegalií (40%) (6–8). Poměrně časté je postižení různých extranodálních orgánů, zejména gastrointestinálního traktu (GIT) a Waldeyereova mízního okruhu (17–22% případů; dle údajů z databáze české Kooperativní lymfomové skupiny (KLS). Infiltrace GIT však bude ve skutečnosti zřejmě mnohem častější. Například dle práce Salara et al., lze podrobným vyšetřením trávicího traktu u všech nově diagnostikovaných MCL lymfom histologicky prokázat až u 90% pacientů, včetně 2/3 případů s makroskopicky normální

Obrázek 1. Cytologické varianty MCL: klasická (A), malobuněčná (B), marginal zone-like (C), blastoidní (D). Vše zvětšení 400x, barvení hematoxylin-eosin



sliznicí (9). Postižení trávicího traktu může být diagnostikováno i pod obrazem tzv. mnohočetné lymfomatózní polypózy.

Stagingové procedury se nijak zásadně neliší od jiných lymfomů. Zahrnují zhodnocení krevního obrazu a biochemie včetně laktát-dehydrogenázy, histologické a cytomorfolické vyšetření kostní dřeně (ideálně trepanobiopsie), flowcytometrii a případně i PCR periferní krve a kostní dřeně (k průkazu klonality či specifického fuzního genu *bcl-1/IgH*). Ze zobrazovacích metod je standardem CT v rozsahu hrudník, břicho a pánev, případně dle kliniky i CT či MR krku a hlavy. Vzhledem k pravidelné FDG aviditě lze ke zpřesnění stagingu či hodnocení léčebné odpovědi s výhodou využít i pozitronové emisní tomografie (PET). Její indikace by nicméně měla být individuální, paušálně není PET u MCL

doporučena (10). Kolonoskopie a gastrofibroskopie rovněž nepatří mezi standardní procedury, měly by však být provedeny u všech pacientů s příslušnou GIT symptomatologií či suspektním CT nálezem. Lumbální punkce je indikována u blastoidních MCL, jinak se rutinně při absenci neurologických příznaků neprovádí.

Prognóza mantle cell lymfomu je obecně nepříznivá. Navzdory poměrně vysokému procentu léčebných odpovědí po indukční léčbě lymfom pravidelně relabuje a v dalším průběhu nemoci se dříve či později rozvíjí chemorezistence. I přes určitý pokrok v posledních letech (v důsledku např. intenzifikace terapie, účinnější léčby relapsů či zlepšení podpůrné péče) zůstává medián celkového přežití (OS) po konvenční léčbě stále okolo 4–5 let, s mediánem doby do progresu (PFS) okolo 1–2 let (7, 8, 11).

Morfologie a imunofenotypizace

Lymfom z pláštových buněk se dle WHO 2008 dělí na několik morfologických variant (obrázek 1A-D). Nejčastější je klasická varianta (okolo 87%) tvořená monotónní populací malých až středně velkých lymfocytů s nepravidelnou jadernou konturou (se „zářezem“), s disperzním jemným chromatinem a nezřetelným jadérkem. Další dvě varianty připomínají jiné lymfomy. Jednak je to tzv. varianta malobuněčná, která je tvořena malými kulatými lymfocyty s hustým chromatinem imitujícími chronickou lymfatickou leukemii/lymfom z malých B-buněk (B-CLL/SLL), jednak varianta marginal zone-like typická buňkami s bohatší světlou cytoplazmou, které napodobují lymfom z buněk marginální zóny. Z praktického hlediska jsou ovšem nejdůležitější tzv. agresivní varianty tvořící 8–21% případů MCL s velmi špatnou prognózou (11–13). Řadíme sem variantu blastoidní s buňkami připomínajícími lymfoblasty s vysokou mitotickou aktivitou a variantu pleomorfní, jejíž buňky mají velká nepravidelná jádra s prominujícím jadérkem připomínající tak difúzní velkobuněčný B-lymfom. Nutno poznamenat, že histologická transformace do difúzního velkobuněčného lymfomu se u MCL nepopisuje. V případě relapsu se však cytologické varianty často mění, je popisována transformace u 22% původně klasických/malobuněčných případů do agresivních variant, naopak polovina původně agresivních subtypů může vykazovat v relapsu klasickou morfologii (12).

Způsoby infiltrace lymfatické uzliny odpovídají míře postupu MCL ve tkáni (obrázek 2). Za výjimečně časnou variantu je považována infiltrace pouze pláštové zóny lymfatického folikulu (z anglického mantle zone také pochází i vlastní pojmenová-

ní tohoto typu lymfomu), pokročilejší je varianta nodulární s vágně naznačenými uzlíky, u nichž již není přítomen ani zbytek zárodečného centra. Za nejpokročilejší je považována difúzní varianta odpovídající homogenní infiltraci zcela nahrazující strukturu lymfatické uzliny, která je také nejčastějším případem (asi 80%) (11, 14). Přestože některé studie prokazují lepší prognózu u varianty s infiltrací pouze pláštové zóny proti ostatním (8, 15), jinými tento vliv prokázán nebyl (9, 14).

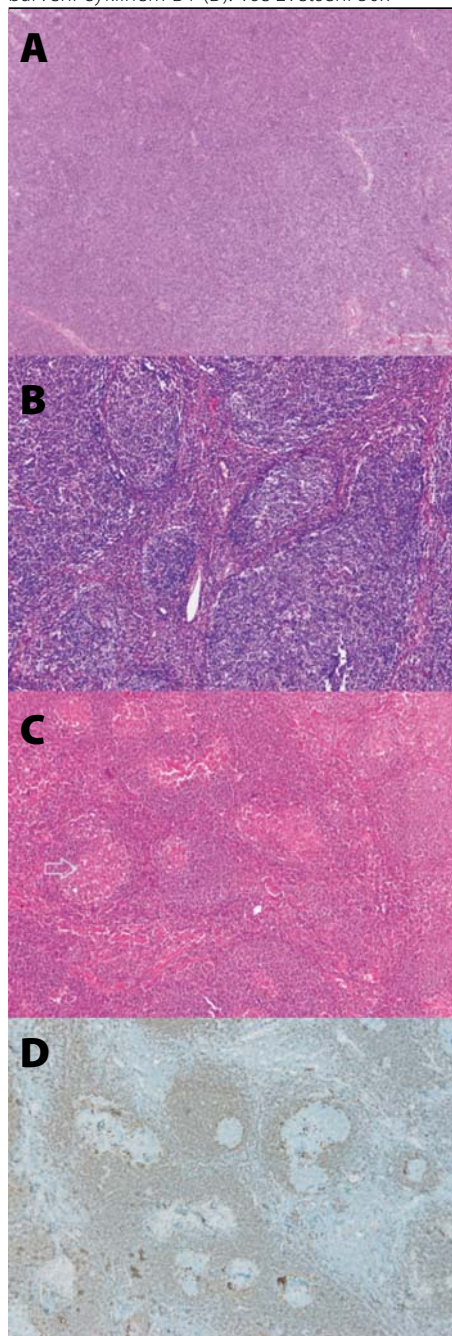
V této souvislosti je nutné ještě zmínit velmi řídkou se vyskytující variantu, která je považována za prekursor manifestního MCL – tzv. „MCL in situ“. Tento bývá diagnostikován často náhodně při imunohistochemickém vyšetření histologických řezů, v nichž je zastížena infiltrace tvořená malým množstvím cyklin D1 pozitivních buněk ve vnitřní části pláštové zóny jinak normálního reaktivního folikulu. U těchto buněk bývá prokázána i typická translokace *t(11, 14)*. Problémem této jednotky je, že MCL nebo případně jiný B-lymfom se vyvine jen u naprosté menšiny pacientů s touto diagnózou (asi jen 8% případů) (16). Při popisu této jednotky se proto doporučuje používat spíše termín „MCL-podobné B-buňky nejasného významu“ než termín „MCL-in situ“, aby se předešlo případné zbytečné léčbě.

Dnes již standardní součástí diagnostiky bývá flowcytometrická analýza lymfocytů uzliny, kostní dřeně či periferní krve. Průtokovou cytometrii lze využít jak ke zpřesnění rozsahu postižení, tak k diferenciaci diagnostice vůči ostatním typům lymfomů či leukémií. Buňky MCL exprimují hlavní znaky zralých B-lymfocytů CD19 a CD20, pravidelně nacházíme i povrchovou expresi imunoglobulinů třídy IgM a IgD, na rozdíl od ostatních lymfomů častěji s restrikcí lehkého řetězce lambda než kappa. Dále bývá typicky pozitivní T-lymfocytární antigen CD5. Tato aberantní koexprese CD5+19+ se nachází jen u B-CLL/SLL a MCL, a je tak důležitým diferenciací diagnostickým ukazatelem (obrázek 3). Znak CD10 je na rozdíl od folikulárního lymfomu negativní, k odlišení od výše zmíněné B-CLL/SLL přispívá negativní či jen slabě pozitivní CD23 a negativní CD200 (17). BCL2 bývá pozitivní, BCL6 naopak pravidelně negativní. Výjimečně lze nalézt i CD5 negativní případy MCL, což může někdy mylně vést k diagnóze jiné B-lymfoproliferace. CD5 negativní případy nejsou vázány na žádnou konkrétní cytomorfolickou variantu (18).

Patogeneze

Již na úrovni časného B-prekurzoru probíhá u všech případů MCL přestavba V-D-J oblastí v genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (IGH), která dává vzniknout DNA sekvenci unikátní pro

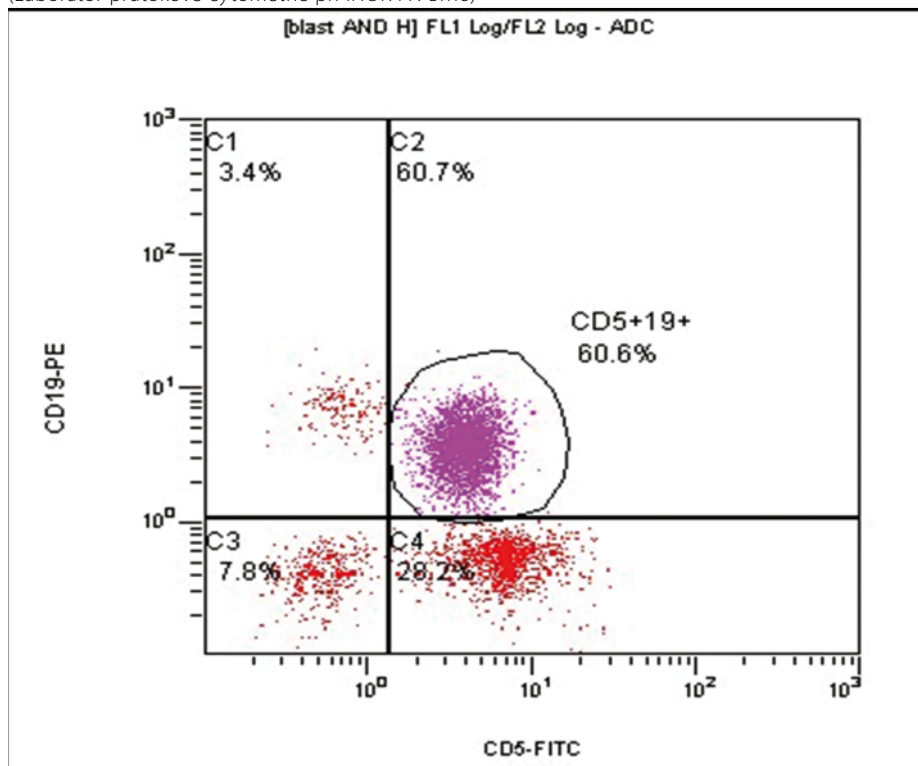
Obrázek 2. Varianty MCL dle způsobu infiltrace lymfatické tkáně: difuzní (A), nodulární tvořící drobné uzlíky (B), infiltrace pouze plášťové zóny lymfatického foliklu v barvení hematoxylin-eosin, šipkou označeno zárodečné centrum (C) a zobrazení nádorové infiltrace v imunohistochemickém barvení cyklinem D1 (D). Vše zvětšení 50x



každý klon B-lymfocytů. Tato klonální genová přestavba tak představuje vysoce specifický marker, který lze využít například pro sledování minimální zbytkové nemoci pomocí PCR metod.

Variabilní oblasti IGHV genu nejsou u většiny případů mutovány (hranici je standardně 98% homologie), což vede k představě, že fyziologickým protějškem MCL je antigen-naivní B-buňka pregerminálního typu. Nicméně asi u 15–40% MCL lze somatické hypermutace detekovat a v těchto případech se předpokládá

Obrázek 3. Typický flowcytometrický nálezní patologické populace B-lymfocytů fenotypu CD5+19+ (Laboratoř průtokové cytometrie při IHOK FN Brno)



vznik z antigenem aktivované B-buňky, analogicky jako je tomu u B-CLL. Prognostická role mutačního stavu genu IGHV není však na rozdíl od B-CLL vyjasněna. Dříve tradičně převládá názor, že se neliší celkové přežití mezi případy s mutovaným a nemutovaným IGHV (19), nicméně některé poslední práce dokládají lepší přežití ve skupině s mutovaným IGHV (20).

V současné době se předpokládá, že stejně jako u většiny jiných nádorů, tak i pro vznik klinicky manifestního MCL je nutný souběh několika patologických událostí na genové úrovni. Nezbytným předpokladem je porucha regulace buněčného cyklu řízené cyklinem D1, za další krok se považuje defekt v buněčné odpovědi na poškození DNA (21).

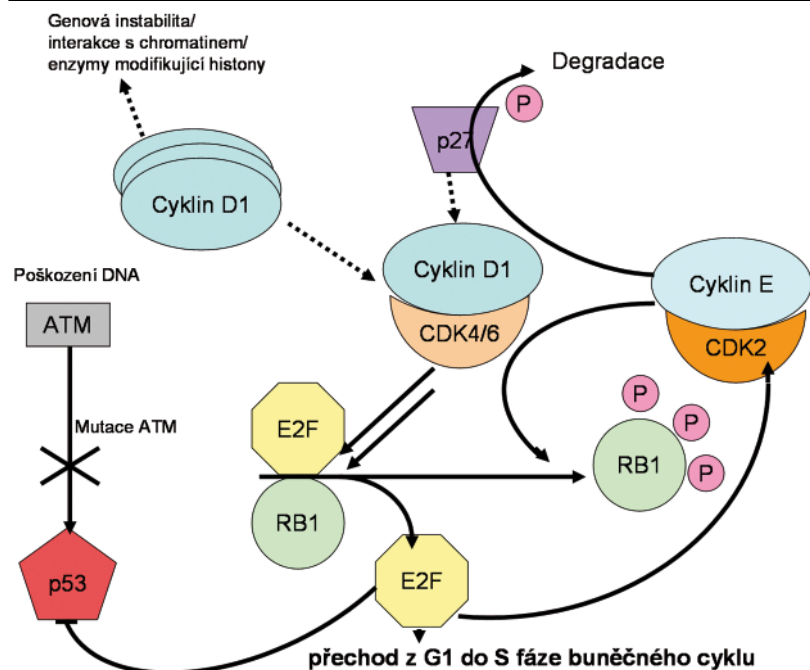
Porucha regulace buněčného cyklu

Primární onkogenetickou změnou u MCL je patrně translokace t(11;14) (q13;q32). Tato chromozomální aberace je prokazatelná téměř u všech případů MCL a považuje se za vysoce specifickou pro tuto jednotku. Dochází při ní ke zlomu v joining (J) regionu genu pro těžký imunoglobulinový řetězec (IGH) na 14. chromozomu a dále ke zlomu v blízkosti genu BCL1 (syn. CCND1) kódujícího cyklin D1 na dlouhém raménku chromozomu 11. Asi 30–40% zlomů na 11. chromozomu nastává v užší oblasti zvané MTC (major translocation cluster). Při přestavbě chromozomů 11 a 14 vzniká patologický fuzní gen BCL1/IGH. Takto se gen pro cyklin D1 dostává do oblasti vlivu silného

zesilovače transkripce, který za normálních podmínek zajišťujícího dostatečnou transkripci genu pro těžký řetězec Ig. Výsledkem je patologicky zvýšená transkripce BCL1 a následně nadměrná exprese jeho produktu cyklinu D1, který jinak u normálních B-lymfocytů nebývá detekovatelný.

Cyklin D1 se podílí zásadně na genezi lymfomu, neboť má řídicí roli v regulaci přechodu buněčného cyklu z G1 do S fáze (obrázek 4). Tvoří aktivní komplexy s cyklin-dependentními kinázami CDK4 a CDK6, které fosforylují a inaktivují supresní gen pro retinoblastom (Rb1), čímž je zablokován jeho inhibiční na řadu transkripčních faktorů (např. E2F1), které pak umožňují lymfocytu vstup do S-fáze buněčného cyklu. Nefyziologické množství komplexů cyklin D1-CDK1-CDK4 vyvolává také jiné inhibitory cyklinových kináz, jako je například protein p27Kip1. Tím je omezena inhibice ostatních typů cyklinů (např. cyklinu E v komplexu s kinázou CDK2), které pak mohou volně opět přes fosforylaci Rb proteinu působit jako promotory buněčného cyklu. Kromě vlivu na deregulaci buněčného cyklu se předpokládá i modulační vliv cyklinu D1 na transkripční faktory a také na enzymy modifikující chromatin a histony (22).

Mezi další patogenetické mechanismy, které mohou potencovat efekt cyklinu D1 a ve svém konečném důsledku tak rovněž pozitivně ovlivňovat buněčný cyklus, patří genomická amplifikace kinázy CDK4, delece inhibitoru p16INK4a (zamezují vazbě mezi cyklinem D1 a CDK4/6)

Obrázek 4. Řídící role cyklinu D1 v regulaci přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu

a nadměrná exprese BMI-1, což je inhibitor transkripce lokusu p16INK4a (23).

K translokaci t(11;14) dochází během přestavy těžkých řetězců imunoglobulinu již na úrovni pre-B buňky v kostní dřeni. Navzdory tomu je nádor složen ze zralých periferních B-lymfocytů, které jsou lokalizovány v plášťové zóně kolem germinálních center lymfatických folikulů a mají tomu odpovídající fenotyp. Jednotlivé kroky malignizace od prvotní změny až do klinicky evidentního lymfomu nejsou dosud zcela známy, ale pravděpodobně zahrnují hromadící se sekundární genetické alterace, které podporují progresi maligního klonu, přičemž tento vývoj může trvat mnohdy i několik let (24). Je zajímavé, že buňky nesoucí t(11;14) lze detekovat pomocí PCR i u některých zdravých jedinců, i když na rozdíl od translokace t(14;18) nacházené u lymfomu folikulárního jen s velmi malou frekvencí (25).

Porucha buněčné odpovědi na poškození DNA

Jak již bylo výše zmíněno, mezi zásadní patogenetické mechanismy u MCL patří i porucha buněčné odpovědi na poškození DNA. Jako příklad lze uvést jednu z nejčastějších cytogenetických abnormalit, vyskytující se asi u 40–75% MCL, a to delecí 11q22–23. Na tomto lokusu je umístěn gen pro ATM kinázu (z anglického „ataxia telangiectasia mutated“). Tato fosfokináza je fyziologicky aktivována při detekci úplného zlomu v dvoušroubovici DNA, kdy cestou transkripčního faktoru p53 iniciuje zástavu buněčného cyklu, opravu DNA a případ-

ně apoptózu buňky s kriticky poškozenou DNA. V případě delece ATM genu se výrazně zvyšuje genomická nestabilita a vzrůstá tak frekvence dalších mutací. Obdobné následky má i inaktivace dalších členů ATM kaskády, například kináz CHK-1 a CHK-2 (26, 27).

Podobně jako u jiných typů nádorů, i u MCL je popsána mutace samotného protoonkogenu TP53 nebo delece jeho lokusu na chromozomu 17p13. Mutace TP53 se vyskytují až u 30% blastoidních variant MCL a jsou spojeny s agresivním klinickým průběhem a výrazně horší prognózou (28). Za normálních okolností je protein p53 imunohistochemicky neprokazatelný, zatímco v případě mutace kódujícího genu je v důsledku prodlouženého poločasu nefunkčního proteinu v buňce detekovatelná jeho nadměrná exprese.

Přidatné genetické aberace a agresivní varianty MCL

Na základě studií genové exprese a in vitro pokusů byly identifikovány další patogenetické mechanismy, které jsou aktivní hlavně u prognosticky nepříznivých agresivních (blastoidních a pleomorfních) variant MCL (29). Jedním z nich je například konstitutivní aktivace dráhy PI3K/Akt. V tomto případě mutovaná fosfatidylinositol 3 kináza (PI3K) nadměrně fosforyluje kinázu Akt, což má za následek stálou aktivaci jedné z hlavních signálních drah zajišťující přenos extracelulárních stimulů a regulující zásadní buněčné děje, jako je buněčný cyklus, transkripce či apoptóza. Důsledkem této mutace je například aktivace transkripčního faktoru NF-kappaB („nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of

activated B cells“) majícího antiapoptotický účinek nebo aktivace systému mTOR („mammalian target of rapamycin“) zvyšujícího translaci mRNA, v případě MCL např. pro cyklin D1 (30). V této souvislosti je nutné zmínit i možnost terapeutického ovlivnění výše zmíněných drah. Preparát bortezomib, schválený americkým FDA (Food and Drug Administration) v roce 2006 pro léčbu relabovaného MCL, cestou inhibice proteasomu finálně blokuje i systém NF-kappaB, což má za následek mimo jiné apoptózu buňky, snížení produkce adhezivních molekul i inhibici angiogenezy. V pokročilém stadiu klinického zkoušení u relabovaných pacientů je i dihydroester rapamycinu temsirolimus, jehož protinádorový účinek spočívá v inhibici mTOR kinázy.

Ukazuje se, že minimálně u části MCL se na onkogenezi podílí i patologická aktivace Wnt kanonické signální dráhy (31). U těchto případů bývá zvýšeně exprimován tzv. Wnt ligand, který po vazbě na specifický cytoplazmatický receptor blokuje degradaci B-cateninu. Tento protein se jinak v klidové buňce vyskytuje v minimálním množství, protože je plynule fosforylován a odbouráván ubiquitin-proteasomovým systémem. B-catenin se však při zvýšení Wnt hromadí v cytoplazmě a poté přestupuje do buněčného jádra, kde vytváří komplex s různými transkripčními faktory. Tím se aktivuje transkripce vícečetných efektorových genů, včetně proliferace působících CCND1 a c-MYC.

Jednou z dalších sekundárních genetických aberací je i rekurentní somatická mutace NOTCH1, která byla nalezena u 12–20% případů MCL. Tato aberace byla již dříve popsána u většiny akutních T-lymfoblastických leukemií (60% případů) a u třetiny případů B-CLL s transformací do agresivního velkobuněčného B-lymfomu. Gen NOTCH1 kóduje transmembránový protein, který se po navázání ligandu rozštěpí a jeho intracelulární část se translokuje do buněčného jádra. Zde pak způsobuje aktivaci transkripce rozličných genů hrajících důležitou roli v buněčné diferenciaci, proliferaci a apoptóze (např. c-MYC). U všech zmíněných diagnóz včetně MCL znamená mutace NOTCH1 špatnou prognózu (32).

Metodou komparativní genomové hybridizace bylo zjištěno, že blastoidní MCL má signifikantně vyšší zastoupení různých chromozomálních aberací ve srovnání s klasickým MCL – průměrně 10 aberací u agresivních variant oproti 4 aberacím u klasických MCL. Jako nejčastější změny byly popsány 3q+, 7p+, 12q+ (CDK4) a 17p- (TP53), u MCL nacházíme i častější aneuploidii nebo tetraploidii (33).

SOX11 a další varianty MCL – cyklin D1 negativní MCL a indolentní MCL

I když je t(11;14) a zvýšená exprese cyklinu D1 diagnostickou známkou MCL, ojediněle se vyskytují i tzv. cyklin D1 negativní MCL, které jsou jinak neodlišitelné od „klasických“ MCL – mají typickou morfolologii, fenotyp i kliniku, ale hlavně s výjimkou absence bcl1/IgH prakticky shodný profil genové exprese. Ohledně případných rozdílů v prognóze se závěry několika studií rozcházejí a jasný prognostický rozdíl oproti cyklin D1 pozitivním případům prokázán nebyl (34–36). Tyto případy většinou mívají vysokou expresi cyklinu D2 nebo D3, popřípadě cyklinu E. Přibližně polovina cyklin D1 negativních MCL například vykazuje translokaci genu pro cyklin D2 s genem pro lehký řetězec Ig kappa (34, 35). Nicméně vzhledem k tomu, že tyto cykliny nejsou zcela specifické a mohou být prokazatelné i u jiných typů lymfomů, je nutný k potvrzení „opravdového“ CCND1 negativního MCL další biomarker – z analýz profilů genové exprese se zdá, že by jím mohl být SOX11.

Neuronální transkripční faktor SOX11, fyziologicky se podílející na embryonálním vývoji CNS, je u MCL aberantně exprimován u 90–95% případů včetně klasických i agresivních variant, včetně zmíněných cyklin D1 negativních případů. Exprese SOX11 je dále prokazatelná u vlasatobuněčné leukemie, u Burkittových lymfomů (30–50%) a u lymfoblastického lymfomu, jinak bývá negativní včetně fyziologických B-lymfocytů (37). SOX11 by mohl být jedním z klíčových onkogenů u MCL. Předpokládá se, že zastřešuje regulaci transkripce důležitých efektorových genů zodpovědných za transformaci predisponované B-buňky do klinicky agresivní malignity. Důsledkem této mutace je například zvýšená exprese proteinu PAX5, který cestou inhibice osy PRDM1/BLIMP1 potlačuje terminální diferenciaci B-lymfocytu do plazmocyty. Otevřenou otázkou zůstává, co vlastně způsobuje nadměrnou expresi SOX11 u MCL (38).

Výjimkou vyznačující se SOX11 negativitou je určitá malá část případů cyklin D1 pozitivních MCL (5–10%), které se typicky projevují leukemizací s dominantní lymfocytózou, absencí lymfadenopatie a dobrou prognózou (39). Lymfomy tohoto typu, známé též jako tzv. indolentní varianta MCL, nesou klasicky translokaci t(11;14), mají vyšší zastoupení somatických hypermutací IGHV a téměř žádné sekundární genetické změny. Tato podskupina pacientů se SOX11-/cyklinD1+ MCL s dlouhodobým přežitím, často bez nutnosti okamžité léčby, poněkud „nabourává“ zažitou představu o MCL jakožto

agresivního lymfomu s nepříznivým klinickým průběhem. To, že existují indolentní případy MCL, se všeobecně sice uznává, nicméně prognostický význam exprese SOX11 zatím zůstává kontroverzní, další práce totiž lepší přežití ve skupině SOX11 negativních MCL nepotvrdily (40).

Mikroprostředí MCL

V kontextu opakovaných relapsů a postupného vývoje rezistence na léčbu se buňky MCL zdají v organismu pacientů „nesmrtelné“, při kultivaci in vitro však podléhají spontánní apoptóze. Tento jev podporuje hypotézu, že k vývoji klinicky plnohodnotného nádoru je třeba „něco“, co leží zřejmě mimo vlastní nádorovou buňku a je naopak součástí nenádorového prostředí uzliny či kostní dřeně. Význam buněk mikroprostředí byl potvrzen u mnoha nádorů, například u folikulárního lymfomu, mnohočetného myelomu (MM) či B-CLL. U MCL je však informací tohoto druhu velmi málo a význam mikroprostředí zatím není považován za zásadní. Nicméně výzkumy posledních let ukazují, že i u MCL hrají mezibuněčné interakce nádorových a stromálních buněk významnou roli v přežití a rezistenci nádoru vůči léčbě (41). MCL podobně jako MM velmi často a záhy infiltruje kostní dřeň. Zdá se, že analogicky jako u MM, který je znám svou „závislostí“ na mikroprostředí kostní dřeně, i MCL buňky jsou závislé na sekreci interleukinu-6 (IL-6) autokrinního a parakrinního původu. IL-6, jenž je důležitým růstovým a protektivním faktorem i u řady jiných nádorů, chrání MCL buňky před účinky chemoterapie a apoptózou (42)

Závěr

Lymfom z pláštových buněk patří v běžné klinické praxi mezi raritnější diagnózy. Můžeme říci „naštěstí“, protože prognóza většiny pacientů s MCL zůstává i v dnešní době neuspokojivá. S pomocí konvenční imunochemoterapie již velmi pravděpodobně není možné další zásadní zlepšení léčebných výsledků. Postupující hlubší poznání patogeneze MCL však odhaluje řadu potenciálních terapeutických cílů, které lze ovlivnit „chytrými“ cíleně působícími molekulami. Řada těchto léků je v pokročilých fázích klinického zkoušení a některé se již také úspěšně prosazují v klinické praxi. Jsme tak svědky toho, jak se léčba MCL na základě primárního výzkumu posouvá od klasické nespecifické chemoterapie se všemi svými nežádoucími účinky do nové éry biologické léčby, která by mohla mít potenciál zásadně zlepšit celkovou prognózu tohoto fatálního onemocnění.

Literatura

1. Swerdlow SH, Campo E, Seto M, et al. Mantle cell lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al., eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008:229–232.
2. Van Den Berghe H, Parloir C, David G, et al. A new characteristic karyotypic anomaly in lymphoproliferative disorders. *Cancer*. 1979; 44(1): 188–195.
3. Raffeld M, Jaffe ES. Bcl-1, t(11; 14), and mantle cell-derived lymphomas. *Blood*. 1991; 78(2): 259–263.
4. Banks PM, Chan J, Cleary ML, et al. Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am J Surg Pathol*. 1992; 16(7): 637–640.
5. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994; 84(5): 1361–1392.
6. Zucca E, Roggero E, Pinotti G, et al. Patterns of survival in mantle cell lymphoma. *Ann Oncol*. 1995; 6(3): 257–262.
7. Samaha H, Dumontet C, Ketterer N, et al. Mantle cell lymphoma: a retrospective study of 121 cases. *Leukemia*. 1998; 12(8): 1281–1287.
8. Rätty R, Franssila K, Joensuu H, et al. Ki-67 expression level, histological subtype, and the International Prognostic Index as outcome predictors in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2002; 69(1): 11–20.
9. Salar A, Juanpere N, Bellosillo B, et al. Gastrointestinal involvement in mantle cell lymphoma: a prospective clinic, endoscopic, and pathologic study. *Am J Surg Pathol*. 2006; 30(10): 1274–1280.
10. Seam P, Juweid ME, Cheson BD. The role of FDG-PET scans in patients with lymphoma. *Blood*. 2007; 110(10): 3507–3516.
11. Tiemann M, Schrader C, Klapper W, et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol*. 2005; 131(1): 29–38.
12. Vogt N, Klapper W. Variability in morphology and cell proliferation in sequential biopsies of mantle cell lymphoma at diagnosis and relapse: clinical correlation and insights into disease progression. *Histopathology*. 2013; 62(2): 334–342.
13. Bernard M, Gressin R, Lefrère F, et al. Blastic variant of mantle cell lymphoma: a rare but highly aggressive subtype. *Leukemia*. 2001; 15(11): 1785–1791.
14. Argatoff LH, Connors JM, Klasa JK, et al. Mantle Cell Lymphoma: A Clinicopathologic Study of 80 Cases. *Blood* 1997; 89(6): 2067–2078.
15. Majlis A, Pugh WC, Rodriguez MA, et al. Mantle cell lymphoma: correlation of clinical outcome and biologic features with three histologic variants. *J Clin Oncol*. 1997; 15: 1664–1671.
16. Carvajal-Cuenca A, Sua LF, Silva NM, et al. In situ mantle cell lymphoma: clinical implications of an incidental finding with indolent clinical behavior. *Haematologica*. 2012; 97(2): 270–278.
17. Palumbo GA, Parrinello N, Fargione G, et al. CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2009; 33(9): 1212–1216.
18. Liu Z, Dong HY, Gorczyca W, et al. CD5- mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2002; 118(2): 216–224.
19. Kienle D, Kröber A, Katzenberger T, et al. VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*. 2003; 102(8): 3003–3009.
20. Navarro A, Clot G, Royo C, et al. Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer Res*. 2012; 72(20): 5307–5316.
21. Fernández V, Hartmann E, Ott G, et al. Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol*. 2005; 23(26): 6364–6369.
22. Sherr CJ, McCormick F. The Rb and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*. 2002; 2(2): 103–112.

- 23.** Nogai H, Dörken B, Lenz G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2011; 29(14): 1803–1811.
- 24.** Christian B, Zhao W, Hamadani M, et al. Mantle cell lymphoma 12 years after allogeneic bone marrow transplantation occurring simultaneously in recipient and donor. *J Clin Oncol* 2010; 28: e629–632.
- 25.** Hirt C, Schüler F, Dölken L, et al. Low prevalence of circulating t(11;14) (q13;q32)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals as detected by real-time quantitative PCR. *Blood.* 2004; 104(3): 904–905.
- 26.** Stilgenbauer S, Winkler D, Ott G, et al. Molecular characterization of 11q deletions points to a pathogenic role of the ATM gene in mantle cell lymphoma. *Blood.* 1999; 94(9): 3262–3264.
- 27.** Camacho E, Hernández L, Hernández S, et al. ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood.* 2002; 99(1): 238–244.
- 28.** Hernandez L, Fest T, Cazorla M, et al. p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood.* 1996; 87(8): 3351–3359.
- 29.** Rizzatti EG, Falcao RP, Panepucci RA, et al. Gene expression profile of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFbeta signaling pathways. *Br J Haematol* 2005; 130: 516–526.
- 30.** Rudelius M, Pittaluga S, Nishizuka S, et al. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood.* 2006; 108(5): 1668–1676.
- 31.** Gelebart P, Anand M, Armanious H, et al. Constitutive activation of the Wnt canonical pathway in mantle cell lymphoma. *Blood.* 2008; 112(13): 5171–5179.
- 32.** Kridel R, Meissner B, Rogic S, et al. Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood.* 2012; 119(9): 1963–1671.
- 33.** Beà S, Ribas M, Hernández JM, et al. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood.* 1999; 93(12): 4365–4374.
- 34.** Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood.* 2005; 106(13): 4315–4321.
- 35.** Salaverria I, Royo C, Carvajal-Cuenca A, et al. CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1 (-) mantle cell lymphoma. *Blood.* 2013; 121(8): 1394–1402.
- 36.** Yatabe Y, Suzuki R, Tobinai K, et al. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood* (2000) 95: 2253–2261.
- 37.** Mozos A, Royo C, Hartmann E, et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica.* 2009; 94(11): 1555–1562.
- 38.** Vegliante MC, Palomero J, Pérez-Galán P, et al. SOX11 regulates PAX5 expression and blocks terminal B-cell differentiation in aggressive mantle cell lymphoma. *Blood.* 2013; 121(12): 2175–2185.
- 39.** Fernández V, Salamero O, Espinet B, et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 2010; 70(4): 1408–1418.
- 40.** Nygren L, Baumgartner Wennerholm S, et al. Prognostic role of SOX11 in a population-based cohort of mantle cell lymphoma. *Blood.* 2012; 119(18): 4215–4223.
- 41.** Medina DJ, Goodell L, Glod J, et al. Mesenchymal stroma cells protect mantle cell lymphoma cells from spontaneous and drug-induced apoptosis through secretion of B-cell activating factor and activation of the canonical and non-canonical nuclear factor κB pathways. *Hematologica* 2012; 97(8): 1255–1263.
- 42.** Zhang L, Yang J, Qian J, et al. Role of the microenvironment in mantle cell lymphoma: IL-6 is an important survival factor for the tumor cells. *Blood.* 2012; 120(18): 3783–3792.

Článek přijat redakcí: 4. 7. 2013

Článek přijat k publikaci: 12. 7. 2013

MUDr. David Šálek

Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice a Masarykova univerzita Brno
Jihlavská 20, 625 00 Brno
dsalek@seznam.cz
