

**Univerzita Karlova v Praze**

**Lékařská fakulta v Plzni**



Autoreferát dizertační práce

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

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

**MUDr. Pavla Veselá**

Plzeň 2016



## **Obsah**

Abstrakt .....	4
Summary.....	5
1 Prognostické faktory lymfomu z pláštěvých buněk.....	6
1.1 Úvod .....	6
1.2 Cíle práce.....	7
1.3 Materiál a metody .....	7
1.4 Výsledky .....	9
1.5 Diskuze .....	11
1.6 Závěr .....	15
2 Mikrovaskulární denzita v lymfomu z pláštěvých buněk.....	16
2.1 Úvod .....	16
2.2 Cíle studie.....	17
2.3 Materiál a metody .....	17
2.4 Výsledky .....	18
2.5 Diskuze .....	20
2.6 Závěr .....	23
Použitá literatura.....	25
Přehled publikační činnosti během doktorského studia (2008–2016)..	29

## 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. Klinická data 235 pacientů byla zkompleťována k dubnu 2012. U pacientů 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 (OS i PFS), a to i v multivariátní analýze. Pomocí univariátní analýzy prokázán vliv na OS i PFS i u variant indexu MIPI, a to MIPIb, s-MIPI a v r. 2016 nově navrženého kombinovaného MIPI, dále u agresivních variant proti ostatním cytomorfologickým variantám a u nodální vs. extranodální lokalizace primárního vzorku. Prognostický vliv architektonické varianty ani výsledků imunohistochemického barvení s protilátkami CD23, CD5 či cyklinem 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. Pro stanovení MVD byla na vzorky po reakci s protilátkou CD34 užitá metoda systematického rovnoměrného náhodného vzorkování obrazových polí a následně počítací rámeček pro tzv. nevychýlené počítání. Hodnota byla přepočítána na  $1 \text{ mm}^2$ . Byl prokázán negativní prognostický vliv vyšších hodnot MVD na OS pouze u souboru pacientů léčených konvenční (neagresivní) terapií, nikoli u případů léčených agresivní terapií, ani u celého souboru. Významně vyšší hodnoty MVD byly zjištěny u pacientů s infiltrací kostní dřeně v době diagnózy. MVD koreluje s hodnotami MIPI, ale nikoli s proliferační aktivitou, s cytomorfologickou či architektonickou variantou, s primární lokalizací vzorku. MVD se v naší práci neukazuje u MCL jako vhodný prognostický faktor na rozdíl od jiných lymfomů. Dle multivariátní analýzy se jako nejvhodnější prognostický faktor u MCL jeví MIPI a proliferační aktivita.

## Summary

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<sub>b</sub> 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 mm<sup>2</sup>. 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. Higher MVD was associated with bone marrow infiltration at the time of diagnosis. 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.

# 1 Prognostické faktory lymfomu z pláštěvých buněk

## 1.1 Úvod

Lymfom z pláštěvých buněk (mantle cell lymphoma, MCL) odpovídá 3–10% ne Hodgkinských lymfomů [Swerdlow et al. 2008]. Tento B-lymfom je běžnější u mužů, 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, často se současným extranodálním postižením. Nejčastějšími extranodálními lokalizacemi MCL jsou kostní dřeň, slezina, trávicí trakt a játra [Ioachim et al. 2008].

Histologicky je lymfom z pláštěvých buněk tvořen monomorfní populací malých a středně velkých lymfoidních buněk, které jsou imunohistochemicky pozitivní v reakcích s B-markery (CD79a, CD20), se slabou aberantní koexpresí s CD5 a typickou pozitivitou s cyklinem D1. Podkladem pozitivivity reakce s cyklinem D1 je translokace  $t(11;14)(q13;q32)$ , která je pro tento lymfom typická a její průkaz se používá také v diagnostice tohoto lymfomu [Swerdlow et al. 2008].

Délka přežití u lymfomu z pláštěvých buněk bývá 3–5 let při použití konvenční terapie [Hoster et al. 2008], i když v posledních letech se vyhlídky pacientů díky zavádění nových léčebných postupů zlepšují (monoklonální protilátka rituximab, intenzivní léčebné protokoly obsahující vysokodávkový cytarabin, autologní transplantace krvetvorných buněk a následná udržovací léčba rituximabem [Geisler et al. 2008, Kluijn-Nelemans et al. 2012]). Existuje však i malá skupina pacientů s indolentním průběhem onemocnění, u nichž je doba přežití i délka trvání remise i po konvenční terapii delší než 10 let [Hoster et al. 2008, Swerdlow et al. 2008]. Těchto pacientů je 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. Proto jsou hledány prognostické faktory, které by tyto skupiny od sebe s vysokou pravděpodobností odlišily.

## ***1.2 Cíle práce***

Cíle první části práce věnované prognostickým faktorům lymfomu z pláštěvých buněk jsou:

1. na retrospektivní populační studii pacientů z celé České republiky s lymfomem z pláštěvých buněk ověřit, které z faktorů zjištěných při diagnostice MCL mají prognostický vliv, zda:
  - proliferační aktivita,
  - v r. 2008 nově navržený Mezinárodní prognostický index pro lymfom z pláštěvých buněk (MIPI) a jeho varianty s-MIPI a MIPI<sub>b</sub> [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).
2. prověřit prognostický vliv jednotlivých faktorů pomocí multivariátní analýzy a podle výsledků navrhnout nevhodnější prognostické faktory u MCL

## ***1.3 Materiál a metody***

V databázi Kooperativní lymfomové skupiny bylo nalezeno 279 pacientů s nově diagnostikovaným MCL 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 265 případů z celkem 329 pacientů byly pro centrální potvrzení diagnózy nalezeny na pracovištích patologie po celé České republice parafinové bločky, z nichž byl MCL diagnostikován. Ze vzorků byla prováděna revize diagnózy. U každého případu bylo kromě preparátů barvených hematoxylin-eosinem provedeno imunohistochemické vyšetření s protilátkami CD20, CD5, cyklin D1, CD23 a v případech diagnostických nejasností byly použity i další protilátky. Diagnóza MCL byla potvrzena u 242 z 265 případů. V celkem 23 případech byl zjištěn odlišný nále: v pěti případech byl diagnostikován lymfom z malých B-buněk/chronická lymfatická leukémie (B-SLL/CLL), v jednom případě folikulární lymfom, v jednom

MALT lymfom, ve třech případech 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 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. Doba přežití bez progresu (progression free survival, PFS) byla počítána od data diagnózy k datu progresu onemocnění, relapsu, smrti z jakékoli příčiny či do doby poslední kontroly u pacientů v remisi. Hodnoty MIPI, s-MIPI a MIPI<sub>b</sub> 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].

Proliferační aktivita byla zjišťována pomocí protilátky MIB1 ve třech zorných polích, kde při zvětšení objektivu 40× v poli vyznačeném mřížkou v okuláru o 10 × 10 polích (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 mm<sup>2</sup>. Průměrný počet spočtených buněk na jeden případ, tj. na tři tato zorná pole, byl 3780 buněk, medián 3942 (rozmezí 1360–6783).

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 (např. proliferační aktivity, MIPI) na OS a PFS byl stanoven pomocí Coxovy regresní analýzy relativního rizika, vztah jednotlivých skupin (např. jednotlivé cytomorfologické varianty) na OS a PFS byl stanoven pomocí log-rank testu. Při porovnání rozdílnosti hodnot ve stanovených skupinách (např. hodnoty proliferační 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

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). Klinicky byla u 94,5 % pacientů zjištěna lymfadenopatie, u 77,4 % infiltrace kostní dřene lymfomem, u 41,7 % postižení sleziny, dále pak postižení Waldeyerova okruhu (21,7 %) či trávicího traktu (16,2 %).

V léčbě pacientů byla chemoterapie použita u 231 pacientů, u 158 z nich (67,2 %) v kombinaci s monoklonální protilátkou rituximabem. 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.

Pro stanovení vlivu terapie na přežití byly případy rozděleny do dvou skupin, a to na případy léčené neintenzivní (konvenční) chemoterapií (87 případů) a intenzivní chemoterapií (144 případů). Medián OS u pacientů léčených intenzivní terapií byl 78 měsíců, u neintenzivní terapie 30 měsíců,  $P = 0,0004$ , medián PFS je 43 resp. 19 měsíců,  $P < 0,0001$ .

Při porovnání jednotlivých primárních lokalizací je patrné, že největší rozdíl je mezi nodálními a extranodálními vzorky. Mediány OS extranodálních (80 případů) vs. nodálních vzorků (155 případů) jsou 64 vs. 39 měsíců,  $P = 0,0408$ , medián PFS je 36 vs. 20 měsíců,  $P = 0,0049$ .

Rozdíl v OS a PFS mezi skupinami pozitivními (232 případů) a negativními (2 případy) s cyklinem D1 zjištěn nebyl  $P = 0,8015$ , resp.  $P = 0,6578$ .

U 197 případů byla zjištěna negativita s protilátkou CD23, u 33 případů pozitivita alespoň části nádorových buněk. U případů pozitivních s CD23 je delší OS (72 vs. 46 měsíců) i PFS (45 vs. 21 měsíců), avšak dle log rank testu se nejedná o významný rozdíl,  $P = 0,3090$ , resp.  $P = 0,0631$ .

222 případů bylo pozitivních s CD5, 9 případů bylo negativních, ve 4 případech byl nález nehodnotitelný. Případy CD5 negativní měly nevýznamně lepší prognózu proti případům CD5 pozitivním (medián OS

nedosažen proti 48 měsíců,  $P = 0,1767$ , medián PFS 37 vs. 22 měsíců,  $P = 0,9797$ )

Při porovnání jednotlivých cytomorfologických variant má nejdelší medián OS i PFS skupina případů s malobuněčnou variantou MCL, naopak nejkratší přežití je u případů s blastoidní a pleomorfní variantou, které bývají souhrnně označovány jako agresivní varianty [Swerdlow et al. 2008]. Při porovnání vlivu čisté malobuněčné varianty (26 případů) vůči ostatním variantám (207 případů), je medián OS 94 vs. 46 měsíců,  $P = 0,1934$ , medián PFS 47 vs. 21 měsíců,  $P = 0,0281$ . Významný rozdíl je tedy pouze u vlivu na PFS, což bylo zjištěno i při porovnání případů malobuněčné varianty včetně kombinace s jinými variantami (31 případů) a ostatních variant (202 případů).

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,  $P = 0,0565$ . Z výsledků je patrné, že i pouhý okrsek agresivní varianty má negativní prognostický vliv.

Architektonickou variantu bylo možné určit u 207 případů. Z hodnocení byly vyřazeny vzorky kostní dřeně. Mezi jednotlivými variantami není podle log rank testu prognostický rozdíl ani u OS ani u PFS, a to ani při porovnání varianty pláštěvé zóny proti ostatním případům. Při porovnání difúzní varianty včetně případů v kombinaci (122 případů) vůči ostatním variantám (85 případů) je medián OS 54 a 46 měsíců,  $P = 0,5782$ , mediány PFS 22 a 20 měsíců,  $P = 0,0453$ . V případě PFS se jedná o statisticky významný rozdíl, překvapivě má však lepší prognózu varianta difúzní vůči ostatním architektonickým variantám.

Hodnotu proliferační aktivity bylo možné stanovit u 211 pacientů. Průměrná hodnota proliferační aktivity byla 27,0 %, medián 22,3 % (rozptyl 2,8–80,1 %). Pomocí Coxovy univariátní analýzy byl stanoven vliv hodnot proliferační aktivity na OS i PFS pacientů, v obou případech je  $P < 0,0001$ . Následně byli pacienti rozděleni podle proliferační aktivity do dvou skupin, jedna skupina měla proliferační aktivitu do 30%

(138 případů), druhá od 30% včetně (73 případů). Medián OS byl 63 resp. 21 měsíců,  $P < 0,0001$ , medián PFS 27 resp. 15 měsíců,  $P < 0,0001$ .

Hodnotu MIPI indexu 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 i PFS, v obou případech je  $P < 0,0001$ . 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, 58 a 24 měsíců,  $P < 0,0001$ , medián PFS 42, 25 a 16 měsíců,  $P = 0,0001$ .

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  $P < 0,0001$ ). Významný rozdíl mezi skupinami byl prokázán u skupin dle nízkého (55 případů), středního (71 případů) a vysokého rizika (102 případů), konkrétně u OS byl medián OS je 106, 46, resp. 23 měsíců,  $P < 0,0001$ , u PFS byl medián PFS je 42, 24 a 17 měsíců,  $P = 0,0001$ .

Hodnotu MIPI<sub>b</sub> bylo možné určit u 204 případů. Medián MIPI<sub>b</sub> byl 6,67, aritmetický průměr 6,83, rozptyl hodnot 4,88–9,40. Byl prokázán vliv jeho hodnot na OS i PFS (v obou případech  $P < 0,0001$ ). Protože rozdíly v přežití mezi skupinami nízkého a středního rizika dle MIPI<sub>b</sub> byly malé a také skupina nízkého rizika byla málo početná, bylo vhodné je sloučit do jedné skupiny proti skupině vysokého rizika. Pak je medián OS u skupiny nízkého a středního rizika (81 případů) 94 měsíců a u skupiny vysokého rizika (124 případů) 24 měsíců,  $P < 0,0001$ , u PFS je medián 41 resp. 16 měsíců,  $P < 0,0001$ .

Podle výsledků multivariátní analýzy má vliv na OS i PFS proliferativní aktivita, MIPI a typ terapie (intenzivní/neintenzivní), na PFS ještě také primární lokalizace vzorku.

## ***1.5 Diskuze***

V naší retrospektivní studii pacientů s MCL, léčených různými léčebnými protokoly, byly srovnávány jednotlivé prognostické markery navrhované dřívějšími publikacemi (proliferativní aktivita, MIPI včetně variant, cytomorfoloická a architektonická varianta, primární lokalizace vzorků, odlišnosti od typického imunohistochemického vyšetření při

diagnostice MCL), aby byla potvrzena či vyvrácena jejich platnost a následně v multivariátní analýze byl porovnán jejich prognostický vliv.

Pacienti léčení intenzivními terapeutickými protokoly z našeho souboru mají významně lepší prognózu oproti druhé skupině pacientů. Vzhledem k výrazně horšímu MIPI u případů léčených neintenzivními protokoly se však nabízí otázka, nakolik je to způsobeno pouze vlastní účinnější léčbou a nakolik se uplatňují horší prognostické vlastnosti nádoru.

Bylo zjištěno, že případy, které byly diagnostikovány z lymfatické uzliny, mají významně horší prognózu u OS i PFS než extranodální případy. Obdobné zjištění učinil Ambinder, který popisuje, že případy MCL primárně lokalizované v oblasti trávicího traktu a hlavy a krku mají významně lepší prognózu než jiné extranodální případy a ty než případy primárně lokalizované v lymfatické tkáni [Ambinder et al. 2013].

Prognostický rozdíl mezi případy podle reakce s CD5, CD23 či cyklinem D1 zjištěny nebyly a podobně nebyl prokázán prognostický vliv architektonických variant, a to ani v předchozích studiích zjištěné kombinaci varianty plášťové zóny vs. ostatní [Majlis et al. 1997]. Zatímco v předchozích publikacích byl prokázán negativní vliv difúzní varianty na prognózu ve srovnání s ostatními variantami [Hoster et al. 2016, Rätty et al. 2002, Tiemann et al. 2005], v našem souboru byl prokázán pozitivní prognostický vliv difúzní varianty vůči ostatním variantám u OS, důvod tohoto odlišného zjištění neznáme.

V případě cytomorfologických variant byl zjištěn negativní prognostický vliv agresivních variant na OS i PFS. Podobně jejich negativní prognostický vliv potvrzuje Rätty i Hoster [Rätty et al. 2002, Hoster et al. 2016], naopak Tiemann jej neprokazuje [Tiemann et al. 2005]. Horší prognóza u agresivních variant souvisí s jejich vyšší hodnotou proliferační aktivity stanovené pomocí Ki-67 [Klapper et al. 2009]. V našem souboru byla u agresivních variant (včetně případů v kombinaci – 13 případů) zjištěna průměrná hodnota proliferační aktivity 52,3 % a medián 64,3 %, zatímco u ostatních variant (198 případů) průměrná hodnota 25,3 % a medián 21,0 %,  $P < 0,0001$ . K podobným výsledkům došel i Garcia (22 % proti 10 %,  $P = 0,0038$ ) [Garcia et al. 2009]. Naopak u MIPI významný rozdíl mezi hodnotami skupin zjištěn nebyl.

Naše závěry potvrzují, že proliferální aktivita je významným prognostickým faktorem u MCL. K obdobným výsledkům dochází jak studie, které zahrnují pouze případy léčené shodnou terapií [Determann et al. 2008, Garcia et al. 2009, Hoster et al. 2016], tak populační studie [Tiemann et al. 2005]. Problémem pro přesnější porovnání výsledků jednotlivých studií je fakt, že v některých studiích jsou případy rozděleny na dvě skupiny a v některých případech na tři skupiny a hranice proliferální aktivity u jednotlivých skupin je v rozmezí 10–50 % [Determann et al. 2008, Garcia et al. 2009, Hoster et al. 2016, Martinez et al. 2004, Schrader et al. 2004, Tiemann et al. 2005, Vogt et al. 2013]. V našem souboru byla zvolena jako nejvhodnější mezní hodnota proliferální aktivity 30 % (137 a 74 případů), u OS je medián 63 a 20 měsíců,  $P < 0,0001$ , u PFS 27 a 15 měsíců,  $P < 0,0001$ .

Protože je proliferální aktivita potvrzována jako prognostický faktor u MCL nejen v našem souboru, je vhodné její hodnotu uvádět již při diagnóze MCL, aby byly lépe odlišeny agresivnější nádory již v době diagnózy a mohla být zvolena agresivnější terapie, tedy pokud to stav pacienta dovoluje. Náš způsob stanovení proliferální aktivity je sice vzhledem k započtení velkého množství buněk přesný, avšak jeho rutinní použití v bioptickém provozu je velmi problematické, protože spočítání buněk vyznačených mřížkou okuláru ve 3 zorných polích trvalo u jednoho případu cca 30–45 minut. Jako nejpresnější a přitom nejméně časově náročnou variantu pro určení proliferální aktivity v rutinním bioptickém provozu navrhuje Klapper spočtení po 100 buňkách ve každém ze dvou zorných polí, s tím, že u případu musí být hodnotitelných alespoň pět zorných polí 400× zvětšení. Také doporučuje hodnotu proliferální aktivity určovat v pouze v lymfatické uzlině či extranodální lokalizaci lymfomu z plášťových buněk a nikoli v kostní dřeni [Klapper et al. 2009].

Naše výsledky potvrzují, že mezinárodní prognostický index pro MCL – varianty MIPI, s-MIPI i MIPI<sub>b</sub> [Hoster et al. 2008] jsou významným prognostickým faktorem MCL. Naše práce je přínosná v tom, že ověřuje jejich platnost v neselektované populaci (bez ohledu na věk, klinické stádium či způsob terapie) pro klinickou praxi. Většina souborů pacientů s MCL potvrzuje platnost MIPI [Budde et al. 2011, Geisler et al. 2010, Hoster et al. 2014, Hoster et al. 2016, Martin et al.

2009, Romaguera et al. 2010, Todorovic et al. 2012, van de Schans et al. 2010], pouze ve dvou případech nebyla potvrzena [Shah et al. 2008, Schaffel et al. 2010]. Prognostický vliv s-MIPI i MIPI<sub>b</sub> byl potvrzen ve studii pacientů léčených nordickým protokolem [Geisler et al. 2010] a také ve studii Evropské skupiny pro lymfom z plášťových buněk [Hoster et al. 2014]. V této studii je zajímavé, že stejně jako v našem případě jsou rozdíly v přežití u pacientů s nízkým a středním stupněm rizika dle MIPI<sub>b</sub> jen minimální a výrazný rozdíl je u obou těchto skupin pouze oproti skupině vysokého rizika [Hoster et al. 2014].

Protože rozdělení pacientů pouze do dvou skupin podle rizika dle MIPI<sub>b</sub> považuje Hoster za nedostačující, navrhuje nyní ještě odlišit tzv. kombinované MIPI (c-MIPI), které je rozčleněno do čtyř skupin podle rizika, a zohledňuje rizikové skupiny dle MIPI a hodnotu proliferační aktivity [Hoster et al. 2016]. Výsledky v našem souboru, kde bylo hodnoceno 205 pacientů, potvrzují platnost nyní nově navrženého c-MIPI ( $P < 0,0001$  u OS i PFS).

Při porovnání prognostického vlivu jednotlivých faktorů pomocí multivariátní analýzy byl prokázán vliv MIPI indexu, 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 výsledků multivariátních analýz je problematické v tom, že porovnávané hodnoty se v různých pracích liší 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 publikovaných prací [Geisler et al. 2008, Rätey et al. 2002, Romaguera et al. 2010, Schaffel et al. 2010]. Výsledky univariátních analýz vliv MIPI a proliferační aktivity na přežití potvrzují konzistentněji.

## 1.6 Závěr

Ve studii pacientů s MCL:

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

Proliferační aktivita a MIPI index se i podle multivariátní analýzy jeví jako nejvýznamnější prognostické známky u MCL, dle nichž pak může být optimálněji zvolen léčebný protokol pro daného pacienta. Zatímco data pro výpočet hodnoty MIPI indexu má ošetřující lékař k dispozici z klinických údajů pacienta a laboratorního vyšetřením 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%. Výhodou je také oproti např. molekulárně genetickým metodám významně nižší cena zjištění těchto prognostických faktorů a jejich široká dostupnost.

## 2 Mikrovaskulární denzita v lymfomu z pláštěvých buněk

### 2.1 Úvod

Mikrovaskulární denzita popisuje intenzitu angiogeneze ve tkáních, nejčastěji nádorových. Pod pojmem mikrocévy 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.

Možnosti praktického využití zjištěných hodnot mikrovaskulární denzity se nabízejí dvě, první z nich je užití MVD k indikaci antiangiogenní terapie a ke sledování její účinnosti, tou druhou je užití MVD jako prognostického faktoru.

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]. U lymfomů tyto změny ještě nebyly podrobněji zkoumány. Při stanovování efektivity antiangiogenní terapie u jednotlivých pacientů bylo zjištěno, že pokles MVD potvrzuje účinnost antiangiogenní terapie [Nico et al. 2008], avšak pokud během léčby nedochází ke snížení MVD, či dochází naopak k jejímu zvýšení, nevylučuje to efektivitu terapie [Hlatky et al. 2002]. Příkladem je mnohočetný myelom, kde byl patrný významný pokles MVD pouze u části případů s terapeutickým efektem [Singhal et al. 1999].

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] či u některých lymfomů, např. difúzního velkobuněčného B-lymfomu (DLBCL) [Gratzinger et al. 2008, Korkolopoulou et al. 2005].

V případě lymfomu z pláštěvých buněk dosud nebyla publikována komplexní studie věnovaná prognostickému vlivu MVD, pouze práce věnované porovnání hodnot MVD s jinými lymfomy, kde bylo



zkoumáno pouze několik MCL, jmenovitě 9 případů [Ridell et al. 2001], resp. 19 případů [Tzankov et al. 2007].

## **2.2 Cíle studie**

Cíle studie jsou:

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

## **2.3 Materiál a metody**

Do studie bylo z předchozího souboru vybráno 177 pacientů s lymfomem z plášťových 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 množství 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 cytomorfologické a architektonické variantě, hodnoty proliferační aktivity a MIPI indexu, včetně s-MIPI a MIPI<sub>b</sub>.

Pro stanovení MVD byla použita imunoprotilátka CD34. Pomocí metody systematického rovnoměrného náhodného vzorkování obrazových polí [Gundersen et al. 1987, Wolfesberger et al. 2008] bylo z každého vzorku vybráno 20 zorných polí, z nichž byly udělány digitální mikrofotografie, které byly dále vyhodnoceny pomocí počítačového rámečku pro tzv. nevychýlené počítání [Gundersen 1977],

kde byly spočítány jednotlivé struktury pozitivní s CD34. Přítomnost cévního lumen či erytrocytů nebyla podmínkou započtení mikrocévy, naopak cévy s jasně mnohvrstevnou stěnou či svalovinou ve stěně započítány nebyly [Tonar et al. 2008, Wolfesberger et al. 2008]. Každá fotografie odpovídala ploše 0,096958 mm<sup>2</sup>, celková plocha, z níž byly mikrocévy spočítány, byla 1,94 mm<sup>2</sup>. Získaná hodnota byla přepočtena na 1 mm<sup>2</sup>. Veškeré úkony byly provedeny pomocí počítačového programu Ellipse software (výrobce ViDiTo, Košice, Slovensko).

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 MVD na OS a PFS byl stanoven pomocí Coxovy regresní analýzy relativního rizika, vztah jednotlivých skupin (např. kvartily dle MVD) na OS a PFS byl stanoven pomocí log-rank testu. Při porovnání rozdílnosti hodnot ve stanovených skupinách (např. hodnoty MVD u různých lokalizací primárních vzorků) byl použit Kruskal-Wallisův test. Multivariátní analýza byla provedena pomocí multivariátní Coxovy regresní analýzy relativního rizika procedurou „stepwise“.

## 2.4 Výsledky

Ze 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 (rozmezí 3–182 měsíců, z čehož 2 případy byly ztracené ze sledování po 3, resp. 12 měsících, kromě nich byla nejkratší doba sledování pacienta 39 měsíců). Medián celkového přežití (OS) byl 45 měsíců. Pětiletá přežití od doby diagnózy se dožilo 41,7 % pacientů. Medián doby přežití bez progresu (PFS) byl 22 měsíců.

Průměrná hodnota mikrovaskulární denzity (MVD) byla 172,71 mikrocév/mm<sup>2</sup>, medián 158,23 mikrocév/mm<sup>2</sup>, hodnoty 54,63–503,58 mikrocév/mm<sup>2</sup>. Vliv hodnot MVD na OS ani PFS prokázán nebyl ( $P = 0,1378$ , resp.  $P = 0,0628$ ). Následně byly hodnoty MVD rozčleněny na kvartily, mezi prvním až třetím kvantilem není patrný rozdíl, proto byly skupiny sloučeny do jedné (132 případů)

a porovnány vůči čtvrtému kvartilu. Medián OS byl u skupiny 1.–3. kvartilu 56 měsíců, u čtvrtého kvartilu 30 měsíců,  $P = 0,0842$ , medián PFS byl 22 resp. 18 měsíců,  $P = 0,0688$ .

Pokud rozdělíme případy do skupin podle druhu terapie, pak dle Coxovy regresní analýzy relativního rizika u 111 případů léčených neintenzivními léčebnými protokoly byla prokázána na hodnotách MVD závislost OS,  $P = 0,0419$ , ale nikoli PFS,  $P = 0,0551$ . Naproti tomu u 64 případů léčených intenzivními léčebnými protokoly nebyla prokázána závislost hodnot MVD na OS ani PFS,  $P = 0,6208$ , resp.  $P = 0,2052$ .

Byla porovnávána hodnota MVD v MCL v jednotlivých lokalizacích, vliv lokalizace vzorku na hodnoty MVD pomocí Kruskal-Wallisova testu zjištěn nebyl,  $P = 0,2949$ , podobně nebyl zjištěn rozdíl ani v porovnání hodnot MVD jednotlivých lokalizací vůči zbytku souboru.

U cytomorfologických variant nebyl prokázán vliv jednotlivých variant na MVD, a to ani u agresivních variant. Podobně nebyl zjištěn vliv jednotlivých architektonických variant na MVD.

Hodnota proliferační aktivity byla zjištěna u všech 177 případů, její průměr činí 26,7 %, medián 21,7 %. Porovnáním hodnot proliferační aktivity a MVD jejich závislost pomocí regresní analýzy prokázána nebyla (lineární regrese  $P = 0,689$ ). Následně byly vytvořeny dvě skupiny případů s hodnotami proliferační aktivity pod a nad 40 % čítající 132, resp. 45 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 (Kruskal-Wallisův test,  $P = 0,0577$ ).

Hodnota MIPI byla zjištěna u 174 případů ze souboru pacientů se známou MVD, průměrná hodnota MIPI je 6,2, medián 6,1. U tohoto souboru byla po provedení Coxovy univariátní analýzy prokázána závislost 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  $MIPI_b$   $P = 0,044$ . Prokazujeme tedy závislost hodnot MVD na hodnotách MIPI, s-MIPI i  $MIPI_b$ .

U 133 pacientů byla zjištěna v době diagnózy infiltrace kostní dřeně MCL, u 40 pacientů nikoli. Hodnota MVD je výrazně vyšší u případů s infiltrací kostní dřeně (medián MVD 180,8 vs. 122,8 mikrocév/mm<sup>2</sup>. Současně PFS je významně vyšší u případů bez infiltrace kostní dřeně (medián PFS 41 vs. 20 měsíců, P = 0,0443). Hodnoty MIPI se také výrazně mezi oběma skupinami liší (P = 0,0012).

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

## 2.5 Diskuze

Mikrovaskulární denzita (MVD) popisuje míru novotvorby cév. Prognostický vliv hodnot MVD byl popsán jak u solidních nádorů, např. prsu [Uzzan et al. 2004], 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]. Práce věnovaná popisu MVD u MCL však zatím 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 je u 19 případů MCL průměrná hodnota MVD 33,3 mikrocév/mm<sup>2</sup> [Tzankov et al. 2007], v případě Ridella je u 9 případů MCL průměrná

hodnota MVD 71,1 mikrocévy na  $\text{mm}^2$  [Ridell et al. 2001], v našem souboru byla zjištěna průměrná hodnota 172,71 mikrocév/ $\text{mm}^2$ . Výrazně nižší hodnota u Tzankova je způsobena odlišným způsobem počítání, započítává totiž pouze struktury pozitivní s CD34 s lumen [Tzankov et al. 2007]. V našem případě i u Ridella lumen k započtení nebylo podmínkou, stačily pouze jednotlivé buňky pozitivní s CD34. Přesný důvod rozdílu hodnot MVD mezi oběma studii však není jasný, i když se nabízí vysvětlení. Riddel ve své práci uvádí, že „vágně pozitivní“ elementy započítávány nebyly, zatímco v naší práci byly počítány všechny pozitivní elementy bez ohledu na intenzitu této pozitivity [Ridell et al. 2001]. V naší práci je také spočtena největší, a tedy nejreprezentativnější, 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]).

Vliv hodnot MVD na OS ani PFS pomocí Coxovy analýzy proporcionálních rizik prokázán nebyl ( $P = 0,1378$ , resp.  $0,0628$ ). Ani v případě, 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  $206,6 \text{ mikrocév}/\text{mm}^2$ ) proti zbývajícím třem kvartilům (MVD do  $206,6 \text{ mikrocév}/\text{mm}^2$ ). Medián OS byl u 1.–3. kvartilu hodnot MVD 56 měsíců, u čtvrtého kvartilu 30 měsíců,  $P = 0,0842$ , medián PFS byl 22 resp. 18 měsíců,  $P = 0,0688$ . Prognostický vliv MVD byl prokázán pouze u podskupiny pacientů léčených konvenční terapií, a to na OS ( $P = 0,0419$ ) a nikoli PFS ( $P = 0,0551$ ), nebyl však prokázán u případů léčených intenzivní terapií, 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]. U folikulárního lymfomu byly publikovány dvě studie s opačnými výsledky, dle jedné z nich jsou vyšší hodnoty MVD jako negativní prognostický faktor [Taskinen et al. 2010], ale dle druhé mají tyto případy naopak lepší prognózu [Koster et al. 2005]. Protože naše práce je první studií věnovanou MVD v MCL, porovnatelná data nejsou k dispozici.

Nepřítomnost infiltrace kostní dřeně v době diagnózy je pozitivní prognostický faktor na PFS (medián PFS 41 a 20 měsíců,  $P = 0,0443$ ),

i přes rozdíl mediánů OS obou skupin (66 vs. 41 měsíců) vliv není prokazatelný,  $P = 0,0833$ . Dříve publikované výsledky jsou rozporuplné, Pittaluga zjišťuje lepší přežití u pacientů bez přítomnosti infiltrace kostní dřene [Pittaluga et al. 1996], naopak Argatoff jej neprokazuje [Argatoff et al. 1997]. Případy bez infiltrace kostní dřene mají významně nižší hodnoty MVD (medián MVD 122,8 mikrocév/mm<sup>2</sup> a 180,8 mikrocév/mm<sup>2</sup>,  $P=0,0001$ ). Toto zjištění nasvědčuje tomu, že případy s vyšší MVD se chovají agresivněji, avšak příčina tohoto chování není jasná. Taktéž případy s infiltrací kostní dřene mají významně vyšší hodnoty MIPI, což platí i pro varianty MIPI<sub>b</sub> a s-MIPI. Překvapivé je, že není přítomna také korelace s proliferační aktivitou, naopak medián je u 40 případů bez infiltrace kostní dřene 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<sub>b</sub> a s-MIPI významný rozdíl. S ohledem na fakt, že MIPI indexy jsou významným prognostickým faktorem přežití pacientů, nepřímou ukazuje tento výsledek na negativní prognostický vliv vysokých hodnot MVD u MCL. Vyšší hodnoty MVD také korelují s jednotlivými komponentami, z nichž se MIPI vypočítává, jmenovitě se jedná o vyšší leukocytózu, hladinu LDH a horší stádium dle ECOG, oproti tomu u věku nad a pod 60 let rozdíl není významný. Významný rozdíl je u skupin pacientů do 54 let (32 případů, medián MVD 173 mikrocév/mm<sup>2</sup>), zatímco u pacientů od 55 let výše je 147,6 mikrocév/mm<sup>2</sup>,  $P = 0,003$ .

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].

Nebyl prokázán vztah mezi hodnotami MVD a cytomorfoloogickými variantami (agresivní vs. 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 zřejmé, že nejvýznamnějšími prognostickými faktory u lymfomu z pláštěvých buněk je proliferační aktivita a MIPI index, u nichž byl prokázán vliv na OS i PFS. Výsledky jiných multivariátních analýz jsou rozporuplné, protože multivariátní analýzou byl vliv MIPI 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, Rätty et al. 2002, Schaffel et al. 2010] i nepotvrzen [Schrader et al. 2004, Tiemann et al. 2005].

## 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 dřene. Jednalo se o první rozsáhlejší studii věnovanou mikrovaskulární denzitě v MCL. V našem souboru bylo zjištěno, že:

- Prognostický vliv MVD na OS ani PFS prokázán nebyl. Pouze u pacientů léčených konvenční (neintenzivní) terapií byl prokázán vliv hodnot MVD na celkové přežití.
- Významně vyšší hodnota MVD je u případů, u nichž byla zjištěna infiltrace lymfomem z pláštěvých buněk v kostní dřeni.
- Byla prokázána závislost hodnot MVD na MIPI, včetně variant MIPI<sub>b</sub> 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 faktor pro lymfom z plášťových buněk. Podle výsledků multivariátní analýzy jsou nejvýznamnějšími prognostickými faktory proliferační aktivita a mezinárodní prognostický index pro lymfom z plášťových buněk MIPI.



## Použitá literatura

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- IOACHIM, Harry L. a L. Jeffrey MEDEIROS. Mantle cell lymphoma. In *Ioachim's lymph node pathology, 4th edition*. Editor. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008, 407–422. ISBN 978-0-7817-7596-0.
- 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.
- 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., 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- SCHRADER, C., P. MEUSERS, G. BRITTINGER et al. Topoisomerase II $\alpha$  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.
- 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.
- 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 (France): IARC Press, 2008, 229–232. ISBN 978-92-832-2431-0.
- 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*. 2010, **46**(13), 2506–2512. ISSN 0959-8049.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

## Přehled publikační činnosti během doktorského studia (2008–2016)

### *Původní články:*

- Hayes M., Peckova K., Martinek P., Hora M., Kalusova K., Straka L., Daum O., Kokoskova B., Rotterova P., Pivovarčikova K., Branzovsky J., Dubova M., **Vesela P.**, Michal M., Hes O.: Molecular-genetic analysis is essential for accurate classification of renal carcinoma resembling Xp11.2 translocation carcinoma. *Virchows Archiv.* 2015, 466, 313–322. (IF = 2,651)
- Peckova K., Grossmann P., Bulimbasic S., Sperga M., Perez Montiel D., Daum O., Rotterova P., Kokoskova B., **Vesela P.**, Pivovarcikova K., Bauleth K., Branzovsky J., Dubova M., Hora M., Michal M., Hes O.: Renal cell carcinoma with leiomyomatous stroma-further immunohistochemical and molecular genetic characteristics of unusual entity. *Annals of Diagnostic Pathology.* 2014, 18, 291–296. (IF = 1,117)
- Peckova K., Vanecek T., Martinek P., Spagnolo D., Kuroda N., Brunelli M., Vranic S., Djuricic S., Rotterova P., Daum O., Kokoskova B., **Vesela P.**, Pivovarcikova K., Bauleth K., Dubova M., Kalusova K., Hora M., Michal M., Hes O.: Aggressive and nonaggressive translocation t(6;11) renal cell carcinoma: comparative study of 6 cases and review of the literature. *Annals of Diagnostic Pathology.* 2014, 18, 351–357. (IF = 1,117)
- Salek D., **Vesela P.**, Boudova L., Janikova A., Klener P., Vokurka S., Jankovska M., Pytlík R., Belada D., Pirnos J., Moulis M., Kodet R., Michal M., Janousova E., Muzik J., Mayer J., Trněný M.: 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. *Leukemia & Lymphoma.* 2014, 55, 802–810. (IF = 2,891)

Skenderi F., Ulamec M., Vranic S., Bilalovic N., Peckova K., Rotterova P., Kokoskova B., Trpkov K., **Vesela P.**, Hora M., Kalusova K., Sperga M., Perez Montiel D., Alvarado Cabrero I., Bulimbasic S., Branzovsky J., Michal M., Hes O.: Cystic renal oncocytoma and tubulocystic renal cell carcinoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2016, 24(2), 112–119. (IF = 2,012)

**Veselá P.**, Tonar Z., Šálek D., Vokurka S., Trněný M., Kodet R., Moulis M., Kašparová P., Vernerová Z., Velenská Z., Stříteský J., Michal M., Boudová L.: 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, 587–597. (IF = 2,651)

### ***Přehledové články:***

Šálek D., Janíková A., **Veselá P.**, Mayer J.: Nové perspektivy v patogenezi a diagnostice lymfomu z plášťových buněk (mantle cell lymfomu). *Onkologie*. 2013, 7, 121–126.

**Veselá P.**, Tonar Z., Boudová L.: Mikrovaskulární denzita v lymfomech - hodnocení a klinický význam. *Česko-slovenská patologie*. 2015, 51, 94–98.

### ***Přednášky na odborných setkáních přednesené MUDr. Veselou:***

Postgraduální lékařské dny, Plzeň, 11.2.2016: **Veselá P.**, Boudová L., Šedivec V., Kuntscherová J., Karas M., Jindra P., Mukenšnabl P., Michal M.: Double stain imunohistochemie a její praktické užití při diagnostice raritního kompozitního lymfomu.

Večery spolku lékařů - Večer Šiklova ústavu patologické anatomie, Plzeň, 29.6.2011: **Veselá P.**, Tonar Z., Šálek D., Vokurka S., Vášová I., Kodet R., Moulis M., Křen L., Mačák J., Vernerová Z., Kašparová P., Stříteský J., Trněný M., Mukenšnabl P., Michal M., Fakan F., Boudová L.: Mikrovaskulární denzita u mantle cell lymfomu.

Večery spolku lékařů - Večer Šiklova ústavu patologické anatomie,  
Plzeň, 29.6.2011: **Veselá P.**, Michal M., Mukenšnabl P., Tupý R.:  
Multifokální fibroskleróza - kazustika.

Večery spolku lékařů - Večer Šiklova ústavu patologické anatomie,  
Plzeň, 12.5.2010: **Veselá P.**, Boudová L., Šálek D., Vášová I.,  
Vokurka S., Kodet R., Moulis M., Křen L., Mačák J., Vernerová Z.,  
Kašparová P., Stříteský J., Fakan F., Trněný M., Mukenšnabl P.,  
Michal M.: Histopatologické znaky jako prognostický faktor  
lymfomu z buněk pláště (mantle cell lymphoma)

Postgraduální lékařské dny, Plzeň, 11.2.2010: **Veselá P.**, Boudová L.,  
Šálek D., Vášová I., Kodet R., Moulis M., Křen L., Mačák J.,  
Vernerová Z., Kašparová P., Stříteský J., Fakan F., Trněný M.,  
Mukenšnabl P., Michal M.: Prognostické faktory lymfomu  
z plášťových buněk (mantle cell lymphoma). Retrospektivní  
analýza 235 případů Kooperativní lymfomové skupiny.