

Možnosti diagnostiky CD5-pozitivních B-lymfoproliferací

David Starostka, Peter Mikula

Oddělení klinické hematologie, Nemocnice s poliklinikou Havířov, p. o.

CD5+ B-lymfoproliferace představují významnou skupinu definovaných diagnostických jednotek v rámci WHO klasifikace zralých B-lymfoidních neoplazií. Antigen CD5 je na fyziologických B-lymfocytech exprimován pouze minoritně, a proto je jeho patologická přítomnost důležitým diferenciálně diagnostickým rysem. Laboratorní diagnostika CD5+ B-lymfoproliferací je multidisciplinární a zahrnuje metody morfologické (cytologie a histologie), metody stanovení imunofenotypu (imunohistochemie a průtoková cytometrie) a metody cytogenetiky a molekulární cytogenetiky. Na základě morfotypu, imunofenotypu a genetického profilu lze mezi CD5+ B-lymfoproliferacemi vyčlenit jednotky s vysokou expresí CD5 u většiny případů (chronická lymfocytární leukemie, lymfom z malých lymfocytů a lymfom z plášťových buněk), jednotky s expresí CD5 u významné menšinové části případů (B-prolymfocytární leukemie, splenický lymfom z marginální zóny) a jednotky s raritní expresí CD5 (ostatní typy lymfomu z marginální zóny, difúzní velkobuněčný B-lymfom, folikulární lymfom, lymfoplazmocytní lymfom a Burkittův lymfom).

Klíčová slova: CD5, B-lymfoproliferace, cytologie, histologie, imunofenotyp, cytogenetika.

The possibilities of the diagnostics of the CD5-positive B-lymphoproliferative disorders

CD5+ B-lymphoproliferative disorders represent a significant group of the defined diagnostic entities within the framework of the WHO classification of mature B-cell neoplasms. The pathological presence of CD5 antigen is an important diagnostic feature because of the minor expression of CD5 on normal B-lymphocytes. The laboratory diagnostics of the CD5+ B-lymphoproliferative disorders is multidisciplinary and it comprises the morphological methods (cytology, histology), the methods of immunophenotyping (immunohistochemistry, flow cytometry) and the cytogenetic and molecular cytogenetic methods. Based on the morphological features, the immunophenotype and the genetic profile, three groups of the CD5+ B-lymphoproliferative diseases can be recognized: the entities with the bright CD5 expression in a major part of cases (chronic lymphocytic leukaemia, small lymphocytic lymphoma, mantle cell lymphoma), the entities with the CD5 expression in a significant minor part of cases (B-prolymphocytic leukaemia, splenic marginal zone lymphoma) and the entities with rare CD5 expression (other types of marginal zone lymphomas, diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma, lymphoplasmacytic lymphoma, Burkitt lymphoma).

Key words: CD5, B-lymphoproliferative disorder, cytology, histology, immunophenotype, cytogenetics.

Onkologie 2014; 8(3): 102–106

Úvod

Za fyziologických okolností je antigen CD5 exprimován na povrchu většiny T-lymfocytů, u B-lymfocytů je jeho výskyt omezen na povrchovou expresi u minoritního B-lymfocytárního subsetu, tzv. B-1 buněk lymfatických uzlin, sleziny, pleurální a peritoneální dutiny. Tato minoritní B-lymfocytární subpopulace se vyznačuje omezenou diverzitou (polyspecificitou) B-buněčného receptoru (BCR), predominantní sekrecí imunoglobulinu M a potenciální autoreaktivitou. CD5 je ligandem CD72, účastní se v modulaci signálu z BCR a je mediátorem interakce mezi jednotlivými B-lymfocyty a T-lymfocyty (1). V rámci WHO klasifikace zralých B-lymfocytárních neoplazií (B-lymfoproliferací) jsou vyčleněny definované diagnostické entity s vysoce charakteristickou expresí znaku CD5.

Laboratorní metody diferenciální diagnostiky

CD5+ B-lymfoproliferací

Diferenciální diagnostika CD5+ B-lymfoproliferací se opírá o tři multidisciplinární dia-

gnostické pilíře: morfologický obraz, imunofenotypový profil a genetickou charakteristiku.

1. Stanovení morfologického obrazu – morfologické metody

U **cytologie** jsou vyšetřováním materiálem nátěry periferní krve a kostní dřeň, otiskové preparáty lymfatických uzlin nebo preparáty tělesných tekutin (punktát či mozkomíšní mok) zpracované cytocentrifugací, které jsou následně barveny panoptickým barvením podle Pappenheima (barviva May-Grünwald, Giemsa-Romanowski) a vyšetřovány ve světlém mikroskopu. Stanovuje se početní zastoupení patologických lymfocytů; hodnocené morfologické prvky při 1 000násobném zvětšení zahrnují: velikost buněk, poměr cytoplazmy a jádra, tvar a lokalizace jádra, charakter jaderného chromatinu, přítomnost nukleolů, barvitelnost cytoplazmy, přítomnost intracytoplazmatických vakuol, granulí nebo inkluzí.

Histologické vyšetření se realizuje u biop-
tických vzorků po jejich fixaci a zpracování do podoby tenkých tkáňových řezů z parafino-

vých bločků. Základním histologickým barvením je hematoxylin-eozin, morfologické hodnocení světelnou mikroskopií je obdobné jako v případě cytologie, navíc využívá informací o detailní mikroarchitektonice postižené tkáně.

2. Stanovení imunofenotypu – metoda průtokové cytometrie a imunohistochemie

Průtoková cytometrie umožňuje rychlou kvalitativní a kvantitativní analýzu optických a fluorescenčních vlastností obrovského množství elementů v buněčných suspenzích. Vyšetřováním materiálem je periferní krev, kostní dřeň, punktát, mozkomíšní mok nebo buněčná suspenze získaná dezintegrací celistvé tkáně. Principem metody je vizualizace vazby konjugátu monoklonální protilátky a fluorochromu na specifickou membránovou (povrchovou) nebo intracelulární strukturu (metoda přímé fluorescence). Na základě rozptýleného a fluorescenčního světla vznikajícího po dopadu laserového paprsku na průtokovou kyvetu s analyzovanými elementy se na příslušných detektorech získávají informace o velikosti, vnitřní struktuře

Tabulka 1. Přehled nejdůležitějších diferenciálně diagnostických B-markerů

Marker	Struktura	Funkce
CD5	Transmembránový glykoprotein, 67 kDa	CD72 ligand
CD10	Integrální membránový protein, 100 kDa	Neutrální endopeptidáza
CD11c	Transmembránový glykoprotein, 150 kDa	Integrin – α X podjednotka
CD19	Membránový glykoprotein, 95 kDa	Regulace, aktivace a diferenciacie B-lymfocyty
CD20	Membránový protein, izoformy 33–37 kDa	Regulace, aktivace a diferenciacie B-lymfocyty
CD21	Transmembránový glykoprotein, 145 kDa	C3d receptor, EBV receptor, aktivace a proliferace B-lymfocyty
CD22	Transmembránový glykoprotein, izoformy 130 a 140 kDa	Aktivace a diferenciacie B-lymfocyty, ztráta po aktivaci B-lymfocyty před stadiem plazmocyty
CD23	Transmembránový glykoprotein, 45 kDa, asociace s MHC II. třídy	Nízkoafinitní receptor pro IgE
CD25	Glykoprotein, 55 kDa	Receptor pro IL-2
CD38	Integrální membránový glykoprotein, 45 kDa	Enzym (NAD-glykohydroláza, ADP-ribozylcykláza, cyklická ADP-ribózo-hydroláza)
CD40	Glykozylovaný fosfoprotein, 44–48 kDa	Receptor pro TNF
CD79a/CD79b	Glykoprotein, 33–45 kDa, asociace se Smlg	Struktura BCR komplexu
CD103	Dvouřetězcový heterodimer, 25 a 150 kDa	Integrin – α E podjednotka
CD138	Transmembránový heparan-sulfát-proteoglykan (Syndecan-1)	Adhezivní molekula
FMC7	Glykoprotein 105 kDa	Regulace, aktivace a diferenciacie B-lymfocyty
ZAP-70	TCR-zeta asociovaný protein, 70 kDa	Proteinová tyrozinkináza

(granularitě) a intenzitě fluorescence buněk, které jsou digitalizovány a graficky znázorněny. Využití škály fluorochromů s diferencovaným emisním spektrem umožňuje provádět současnou multiparametrovou analýzu exprese znaků při vazbě řady monoklonálních protilátek na jedinou buňku (2, 3). Imunofenotypizace průtokovou cytometrií s dostatečně širokým diagnostickým panelem umožňuje u řady B-lymfoproliferací přesnou kategorizaci v rámci WHO klasifikace, a to zejména ve spojení s cytologickým vyšetřením. Analýza exprese lehkých řetězců imunoglobulinů přispívá klíčovým způsobem k přímému stanovení monoklonality v B-linii průkazem dominance (restrikce) lehkého imunoglobulinového řetězce kappa nebo lambda. Přehled důležitých diferenciálně diagnostických markerů podává tabulka 1. Doporučený panel pro imunofenotypizaci lymfoproliferativních onemocnění podle Evropské skupiny pro imunologickou klasifikaci leukemií (EGIL) zahrnuje v případě B-lymfoproliferací nejméně: základní B-lymfoidní markery – CD19, CD20, CD22, CD23, CD103, FMC7, CD5, CD10, lehké řetězce kappa/lambda, CD25, CD38, CD79b, dodatečné B-lymfoidní markery – CD123, CD138, HLA-DR, CD11c, CD24, CD43, CD81, IgG/A/M/D, CD81, bcl-2, ZAP-70 (2, 4, 5).

Imunohistochemie představuje imunofenotypizaci v tkáňových řezech. Detekce specifických antigenních determinant probíhá na stejném základním principu jako u průtokové cytometrie – vizualizace vazby antigenu a protilátky. Přímá metoda vhodná pro vysoce

koncentrované antigeny lokalizuje antigen vazbou primární protilátky konjugované s fluoresceinem, enzymem nebo kovem. Nepřímá metoda (dvojstupňová nebo trojstupňová) využívá vazby konjugované sekundární protilátky proti Fc fragmentu protilátky primární, je citlivější a vhodná k průkazu níže exprimovaných markerů (6).

3. Stanovení genetického profilu – cytogenetické a molekulárně cytogenetické metody

Cytogenetické vyšetření se nejčastěji provádí ve vzorcích kostní dřeně. Odebraný materiál je kultivován s různými kultivačními médii (nejčastěji RPMI), následuje zástava buněčného cyklu v metafázi, přidání hypotonického roztoku a fixace buněk. Pro stanovení karyotypu se nejčastěji využívá metoda G-pruhování založená na působení trypsinu a barvení barvivem Giemsa-Romanowski, hodnocení probíhá pomocí světelného mikroskopu, standardně se hodnotí 30 mitóz (3).

Molekulárně cytogenetické metody umožňují precizní a senzitivní identifikaci patologických genetických změn na různých principech (3, 7, 8).

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) umožňuje pomocí fluorescenčního mikroskopu vizualizovat sekvence nukleových kyselin v mikroskopických preparátech obsahujících morfologicky zachovalé chromozomy, jádra či tkáňové řezy komplementární vazbou fluorochromem značené hybridizační sondy (krátkého úseku DNA) k cílové sekvenci DNA. Hybridizační sondy se podle místa

vazby rozdělují na centromerické, celochromozomové a genově specifické. Metoda se využívá zejména k detekci translokací, delecí a amplifikací.

Mnohobarevná FISH (mFISH) využívá hybridizaci celochromozomových sond značených kombinací spektrálně odlišných fluorochromů detekovaných s využitím sady úzkopásmových optických filtrů eliminujících spektrální překryv. Výsledkem počítačového zpracování je zobrazení metafáze, kde každý chromozom je odlišen určitou barvou. Metoda slouží zejména k detekci složitých přestaveb (kryptické translokace, inverze) a komplexních změn karyotypu. **Spektrální karyotypování (SKY)** umožňuje stejně jako mFISH současnou vizualizaci všech lidských chromozomů v odlišných barvách s využitím rozdílně značených celochromozomových sond. Zobrazení celého karyotypu vzniká jako výsledek analýzy emisního spektra po současné excitaci všech fluorochromů. Využití je stejné jako u mFISH. **Komparativní genomová hybridizace (CGH)** analyzuje chromozomové změny v celém genomu během jedné hybridizační reakce, při které je testovaná genomová DNA označená modifikovanými nukleotidy použita jako hybridizační sonda s normálními metafázními chromozomy. Simultánně probíhá hybridizace kontrolní DNA z buněk s normálním karyotypem, testovaná a kontrolní DNA jsou označeny spektrálně diferencovanými fluorochromy. Metoda je vhodná k celogenomovému screeningu nebalancovaných přestaveb (ztráta nebo zmnožení genetického materiálu). Zdokonalení metody CGH představuje technika **array-CGH**, která využívá místo metafázních chromozomů krátké cílové sekvence DNA vázané na speciálně upraveném povrchu (tzv. DNA-čip). **Polymerázová řetězová reakce (PCR)** je mimořádně senzitivní metoda umožňující exponenciální amplifikaci genového úseku ohraničeného dvojicí krátkých oligonukleotidových sekvencí (tzv. primerů). Metoda se využívá v celé řadě modifikací, v případě CD5+ B-lymfoproliferací slouží zejména k analýze přestavby genu pro těžký imunoglobulinový řetězec (IGH) a stanovení mutačního stavu v jeho variabilní části (IgVH).

Charakteristika jednotlivých CD5-pozitivních B-lymfoproliferací

1. Diagnostické jednotky s vysokou expresí CD5 u většiny případů

Chronická lymfocytární leukemie (CLL)

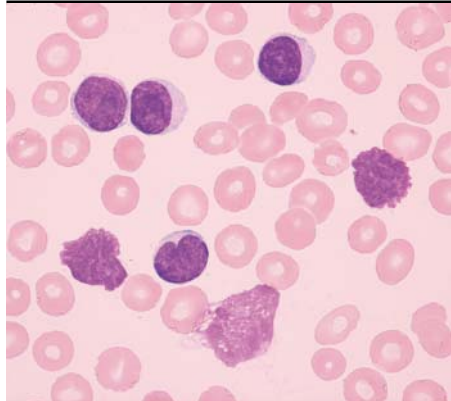
Diagnostická kritéria chronické lymfocytární leukemie dle National Cancer Institute-Sponsored Working Group (NCI-WG) jsou shrnuta v tabulce 2 (9). Pro diagnózu CLL je postačující vyšetření periferní krve.

Tabulka 2. Diagnostická kritéria CLL dle NCI-WG

- B-lymfocyty v periferní krvi nad $5 \times 10^9/l$
- Méně než 55 % atypických lymfocytů v periferní krvi při cytologickém vyšetření
- Typický imunofenotyp

Morfologie: Lymfocyty u CLL jsou monotónní, malé a zralé, jejich velikost nepřesahuje dvojnásobek velikosti erytrocytu. Lymfocyty mají kulatý či mírně oválný tvar, kulaté jádro je lokalizováno většinou lehce excentricky, jaderný chromatin je hutný, kondenzovaný, má mozaikovitou strukturu, jádérka nejsou přítomna. Světlá či lehce bazofilní cytoplazma tvoří úzký lem kolem jádra a jen vzácně obsahuje vakuoly či inkluze. Gumprechtovy stíny představují artefakt vzniklý mechanickým poškozením fragilních lymfocytů při provádění nátěru a nejsou pro CLL diagnostické. U typické CLL nepřesahuje zastoupení prolymfocytů nebo atypických lymfocytů 10 %. Atypická forma CLL se vyskytuje ve dvou variantách: u CLL/PL (CLL s prolymfocyty) je zastoupení prolymfocytů 11–55 %, v případě pleomorfní varianty vykazují polymorfní lymfocyty různé atypie jádra a cytoplazmy. Infiltrace kostní dřeně je u CLL intersticiální, nodulární, smíšená nebo difuzní. Zejména při vyšetření lymfatické uzliny mohou být patrná naznačeně nodulární (tzv. pseudofolikulární) proliferační centra s paraimunoblasty. Mitotická aktivita je nízká (10, 11, 12).

Imunofenotyp: Pan-B-antigeny (CD19, CD20, CD22, CD79) jsou slabě exprimovány stejně jako dominantní povrchové lehké řetězce κ nebo λ , slgM a IgD. Typická je pozitivita CD5, CD23, CD43 a bcl-2. Variabilní expresi mají markery CD25, CD11c, CD38 a ZAP-70 (vysoká exprese CD38 a ZAP-70 má negativní prognostický význam). Negativní je FMC7, CD10, CD103 a cyklin D1 (4, 10, 11, 13). Jako velmi užitečný se při diagnostice CLL jeví znak CD200, jeho vysoká exprese je v rámci CD5+ B-lymfoproliferací pro CLL poměrně specifická (14). Robustním nástrojem je u CLL stanovení skóre dle systému sestaveného Estellou Matutes

Obrázek 1. CLL (zralé lymfocyty, Gumprechtovy stíny), periferní krev, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1 000 $\times$ 

již v roce 1994 (tabulka 3). Většina případů CLL vykazuje skóre 4 nebo 5, pro ostatní lymfoproliferace je charakteristické skóre 0–2 (15). U atypické CLL se setkáváme s vyšší expresí CD19, CD20, CD22 a CD79b a slg vč. lehkých řetězců (4, 10, 15).

Tabulka 3. Skórovací systém pro CLL dle Estelly Matutes (15)

	Body	
	1	0
Parametr		
Exprese CD5	pozitivita	negativita
Exprese slg	nízká	vysoká
Exprese CD79b	nízká	vysoká
Exprese CD23	pozitivita	negativita
Exprese FMC7	negativita	pozitivita

Genetika: Asi 80 % případů CLL má abnormální karyotyp. Nejčastějšími genetickými změnami u CLL jsou: delece 13. chromozomu (del 13q14), trizomie 12. chromozomu, delece 11. chromozomu (del 11q23), delece 17. chromozomu (del 17p13), delece 6. chromozomu (del 6q21). Podle stavu mutace IgVH genu se CLL dělí do dvou prognosticky rozdílných skupin, skupina s nemutovaným stavem IgVH genu má horší prognózu. Molekulárně cytogenetickým vyšetřením lze prokázat mutace genu p53 a NOTCH1 (10, 13, 16). Frekvence výskytu uvedených genetických abnormit je shrnuta v tabulce 4 (10).

Lymfom z malých lymfocytů (SLL)

Morfologický obraz, imunofenotyp a genetický profil je prakticky identický s CLL s tím

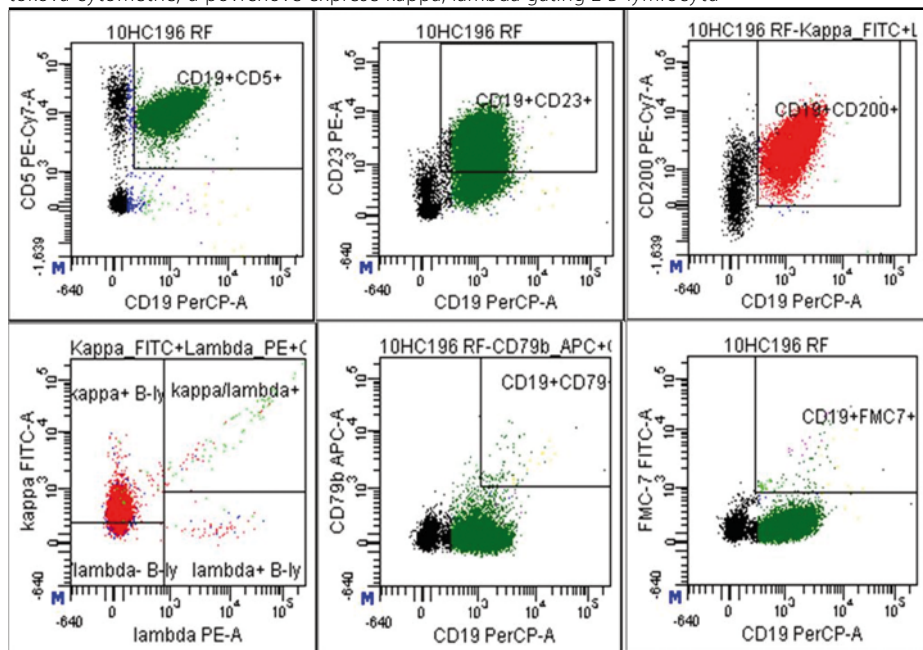
rozdílem, že jde o neleukemickou formu nemoci (není splněno arbitrární kvantitativní kritérium CLL dle NCI-WG).

Tabulka 4. Výskyt genetických aberací u CLL (10)

	Mutovaný stav IgVH	Nemutovaný stav IgVH
Aberace		
Delece 13q	65 %	48 %
Izolovaná delece 13q	50 %	26 %
Trizomie 12	15 %	19 %
Delece 11q	4 %	27 %
Delece 17p	3 %	10 %
Delece 11q nebo 17p	7 %	35 %

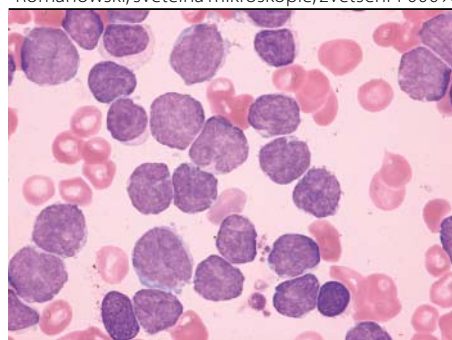
Lymfom z pláštových buněk (MCL)

Morfologie: MCL je nádor z malých až středně velkých B-lymfocytů podobných centrocytům. Morfologický obraz nemoci je značně variabilní: od malých zralých lymfocytů podobných těm u CLL přes středně velké lymfocyty s jadernými nepravidlostmi (zářezy jádra, lobulizace) až k bizarním lymfoidním elementům podobným prolymfocytům či blastům s jemnou jadernou strukturou a nukleoly u blastoidní varianty MCL. Infiltrace kostní dřeně je přítomna u 2/3 případů, typicky je smíšená nodulární a paratrabeulární, méně často intersticiální nebo difuzní. V ostatních postižených tkáních je patrný naznačeně nodulární nebo difuzní způsob infiltrace. Vzácně je nádorová léze omezena na vnitřní plášťovou zónu („in situ“ MCL) (10, 11, 17, 18). Morfologické varianty MCL popisuje tabulka 5 (10).

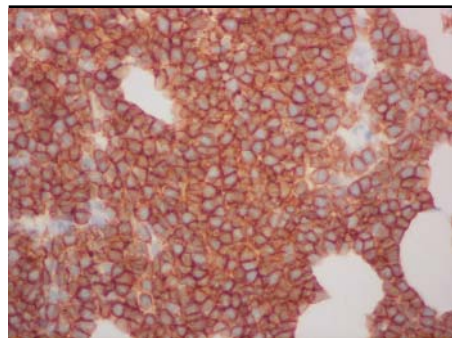
Obrázek 2. CLL, periferní krev, imunofenotyp CD19+CD5+CD23+CD200+kappa+ CD79b-FMC7-, průtoková cytometrie, u povrchové exprese kappa, lambda gating z B-lymfocytů

Tabulka 5. Morfologické varianty MCL (10)

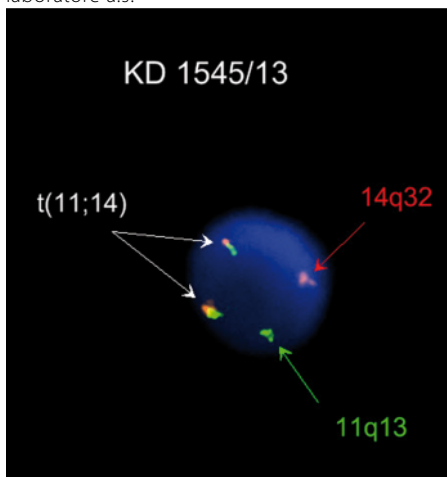
Morfologická varianta	Morfologické rysy
Malobuněčná	Malé lymfocyty s hutným jaderným chromatinem
Pleomorfní	Pleomorfní lymfocyty, časté velké lymfocyty s oválným nebo nepravidelným jádrem, časté nukleoly, bledá cytoplazma
Blastoidní	Lymfocyty připomínající lymfoblasty, jemná struktura jádra, časté nukleony, vysoká mitotická aktivita
„Marginal-zone like“	Lymfocyty s bohatou bledou cytoplazmou

Obrázek 3. Lymfom z plášťových buněk (pleomorfní varianta), kostní dřeň, barvení May-Grünwald, Giemsa-Romanowski, světelná mikroskopie, zvětšení 1 000 ×

Imunofenotyp: Většina případů vykazuje vysokou expresi pan-B-markerů CD19, CD20, CD22 a CD79, povrchových imunoglobulinů IgM, IgD, jejich lehkých řetězců (převažuje lehký řetězec λ) a znaku CD5 (obrázek 4). FMC7 je pozitivní v 50 %, pravidelně je pozitivní CD43, CD38 a bcl-2. Charakteristickým rysem je intracelulární exprese cyklinu D1. Negativní expresi mají znaky CD10, CD11c, CD23, CD25, CD103, CD200 a bcl-6. Proliferační aktivitu odráží exprese znaku Ki-67. Poměrně specifickým markerem MCL je transkripční faktor SOX11, jehož zvýšenou expresi lze prokázat imunohistochemicky nebo molekulárně geneticky (4, 10, 17, 19).

Obrázek 4. Lymfom z plášťových buněk, membránová pozitivita CD5, imunohistochemie, světelná mikroskopie, zvětšení 400 ×, publikováno se souhlasem CGB laboratoře a.s.

Genetika: Je přítomna přestavba genu pro těžký imunoglobulinový řetězec, většinou v nemutované formě. Změny karyotypu jsou obvykle komplexní. Diagnostická je translokace t(11; 14)(q13; q32) mezi geny pro IGH a cyklin D1 (CCND1) vedoucí k nadměrné expresi cyklinu D1 (obrázek 5). Časté jsou změny v oblasti 11q22–23 (40–75 %) a del 13q14 (43–51 %), ostatní aberace zahrnují změny v oblasti 3q26, 7p21, 8q24, 1p13–p31, 6q23–q27, 9p21, 13q11, 17p13 a trizomii 12. Případy pleomorfní a blastoidní varianty MCL mají často tetraploidii se zmožením genu CCND1 nebo mutací genu TP53. Vzácné případy bez translokace t(11; 14) exprimují cyklin D2 nebo D3 (10, 11, 17, 20).

Obrázek 5. Lymfom z plášťových buněk, t(11; 14), FISH (sonda Kreatech ON BCL1/IGH t(11;14)Fusion), fúzní signály translokovaných chromozomů jsou vyznačeny šipkou, publikováno se souhlasem CGB laboratoře a.s.

2. Diagnostické jednotky s expresí CD5 u významné menšinové části případů

B-prolymfocytární leukemie (B-PLL)

Jde o vzácnou neoplazii z B-prolymfocytů postihující periferní krev, kostní dřeň a slezinu.

Morfologie: V periferní krvi je typicky výrazná lymfocytóza (nezřídka více než $100 \times 10^9/l$), více než 55 % lymfocytů v periferní krvi tvoří prolymfocyty. Jedná se o středně velké lymfocyty s kulatým jádrem, méně kondenzovaným jaderným chromatinem a výrazným nukleolem, který je většinou centrálně lokalizován. V některých případech má jádro nepravidelný tvar s indentacemi. Cytoplazma je bohatá a mírně bazofilní. Morfologie prolymfocytů v kostní dřeni je často méně charakteristická než v periferní krvi. Infiltrace kostní dřene je intersticiální, nodulární nebo difúzní (10, 11).

Imunofenotyp je charakteristický silnou expresí pan-B-markerů CD19, CD20, CD22, CD79, slgM a/nebo slgD, jejich lehkých řetězců a FMC7.

Dalšími často exprimovanými znaky jsou CD24, CD43 a CD37. CD5 vykazuje pozitivitu u třetiny případů. Znak CD38 je přítomen asi u poloviny případů stejně jako ZAP-70, CD23 je pozitivní v 10–20 % (transformace CLL). Negativní jsou znaky CD10, CD11c, CD25 a CD103 (4, 10, 11).

Genetika: Je přítomna přestavba genu pro IGH, zastoupení mutovaných a nemutovaných IgVH je obdobné jako u CLL. Časté je postižení genu p53 a komplexní změny karyotypu, del 13q14 se vyskytuje ve 27 %. Případy s prokázanou t(11; 14) a častou expresí CD5 se dnes řadí k MCL s prolymfocytoidními rysy (10, 11).

Lymfom z marginální zóny (MZL)

Tento lymfom se vyskytuje ve třech formách: nodální, splenické a extranodální MALT. Je uveden v této skupině z důvodu relativně časté exprese CD5 u splenické formy (21, 22).

Morfologie: Morfologický obraz je heterogenní od lymfocytů centrocytoidního vzhledu (sporá cytoplazma, nepravidelnosti jádra) přes středně velké „monocytoidní“ lymfocyty (kulaté či ledvinovité jádro a objemnější světle bazofilní cytoplazma) až po ojedinělé centroblastoidní lymfocyty a imunoblasty. Může se vyskytnout plazmocytoidní diferenciace. U splenické formy nacházíme mírnou lymfocytózu s malými nebo středně velkými lymfocyty s vyšším nukleocytoplazmatickým poměrem. Jádro je kulaté či oválné, chromatin většinou kondenzovaný, může být patrný nukleolus. Cytoplazma je šedomodrá, v případě splenického lymfomu s vilózními lymfocyty vybíhá na pólech buňky v jemné vláskovitě výběžky. V uzlině vytváří nádor infiltrát kolem reaktivních folikulů nebo má difúzní charakter růstu. Infiltrace kostní dřene je obvykle smíšená nodulární a intrasinusoidální (10, 11, 21, 22).

Imunofenotyp není příliš specifický. Lymfom silně exprimuje B-lymfocytární znaky CD19, CD20, CD21, CD22, CD79, dále FMC7, slgM a D a často také CD11c (50 %), bcl-2 a CD35. Znak CD5 je pozitivní asi u 25 % případů splenického lymfomu z marginální zóny, jinak je jeho exprese vzácná. Negativní je CD10, CD23, CD25, CD38, CD43, CD103 a cyklin D1 (4, 10, 21, 22).

Genetika: Je přítomna přestavba genu pro IGH, převažuje mutovaná forma IgVH. Častá je del 7q, trizomie 3 a 12 a +5q. Vyskytují se translokace t(11; 18)(q21; q21), t(1; 14)(p22; q32), t(14; 18)(q32; q21), t(3; 14)(p14; q32) (10, 11, 21, 22).

3. Diagnostické jednotky s raritní expresí CD5

Do této skupiny se řadí difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL), folikulární lymfom, lym-

foplazmocytní lymfom a Burkittův lymfom. Aberantní exprese CD5 u těchto nemocí je vzácná (10% u DLBCL, u ostatních nižší) a jejich odlišení od výše popsaných CD5+ B-lymfoproliferací nečiní větších problémů.

Závěr

Laboratorní diferenciální diagnostika CD5+ B-lymfoproliferací je komplexní, využívá morfoloické metody a imunohistochemii, průtokovou cytometrii, cytogenetické a molekulárně cytogenetické analýzy. Předpokladem precizní diagnostiky těchto onemocnění je adekvátní přístrojové vybavení příslušných laboratoří a dlouhodobá zkušenost s touto diagnostikou, která by měla být soustředěna na pracoviště s možností aktivního a týmového multidisciplinárního přístupu.

*Práce byla podpořena grantem
IGA UP–LF–2014–001.*

Literatura

- Hardy RR. B-1 B Cell Development. *J Immunol* 2006; 177: 2749–2754.
- Marinov I. Průtoková cytometrie v klinické hematologii. 2. přepracované a rozšířené vydání. Triton, Praha. 2008.
- Pospíšilová Š, Dvořáková D, Mayer J, et al. Molekulární hematologie. Galén, Praha. 2013.
- Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008; 111: 3941–3967.
- Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, Oldaker T et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72(Suppl 1): S14–22.
- Böcker W, Buchwalow IB. Immunohistochemistry: Basics and methods. Springer. 2010.
- Richard KK, Robinett S. Detection of genetic translocations in lymphoma using fluorescence in situ hybridization. *Methods Mol Biol* 2013; 999: 189–202.
- Teruya-Feldstein J. Getting the diagnosis right in NHL: role of immunohistochemistry and molecular diagnostic testing. *J Natl Compr Canc Netw* 2008; 6: 422–427.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Döhner H. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL) updating the National Cancer Institute-Working Group (NCI-WG) 1996 guidelines. *Blood* 2008; 11: 5446–5456.
- Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Fourth Edition. IARC: Lyon 2008.
- Kačírková P, Campr V, Karban J, Mikulenkova D. Hematoonkologický atlas krve a kostní dřeně. Grada Publishing, a.s. Praha. 2007.
- Inamdar KV, Bueso-Ramos CE. Pathology of chronic lymphocytic leukemia: an update. *Ann Diag Pathol* 2007; 11: 363–389.
- Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brückle E, Lichter P, et al. V (H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 1410–1416.
- Alapat D, Coviello-Malle J, Owens R, Qu P, Barlogie B, Shaughnessy JD, Lorschach RB. Diagnostic usefulness and prognostic impact of CD200 expression in lymphoid malignancies and plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol* 2012; 137(1): 93–100.
- Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994; 8: 1640–1645.
- López C, Delgado J, Costa D, Villamor N, Navarro A, Cazorla M, et al. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: analysis of correlations with IGHV mutational status, NOTCH1 mutations and clinical significance. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013; 52: 920–927.
- Dreyling M, Kluin-Nelemans HC, Bea S, Klapper W, Vogt N, Delfau-Larue MH, et al. Update on the molecular pathogenesis and clinical treatment of mantle cell lymphoma: report of the 11th annual conference of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Leuk Lymphoma* 2013; 54: 699–707.
- Richard P, Vassallo J, Valmary S, Missoury R, Delsol G, Brousset P. „In situ-like“ mantle cell lymphoma: a report of two cases. *J Clin Pathol* 2006; 59: 995–996.
- Mozos A, Royo C, Hartmann E, De Jong D, Baró C, Valera A. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 2009; 94: 1555–1562.
- Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, Piris MA, Martín-Subero JI, Nieland I et al. Mantle cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* 2005; 105: 4445–4454.
- Matutes E, Oscier D, Montalban C, Berger F, Callet-Bauchu E, Dogan A et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia* 2008; 22: 487–495.
- Baseggio L, Traverse-Glehen A, Petinaud F, Callet-Bauchu E, Berger F, Ffrench M. CD5 expression identifies a subset of splenic marginal zone lymphomas with higher lymphocytosis: a clinico-pathological, cytogenetic and molecular study of 24 cases. *Haematologica* 2010; 95: 604–612.

Článek přijat redakcí: 30. 4. 2014

Článek přijat k publikaci: 13. 5. 2014

MUDr. David Starostka

*Oddělení klinické hematologie,
Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o.
Dělnická 1132/24, 736 01 Havířov – Město
david.starostka@nsphav.cz*