

**MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Centrum molekulární biologie a genové terapie
Interní hematologická a onkologická klinika
Fakultní nemocnice Brno

**STANOVENÍ EXPRESE ANTIGENŮ NA NÁDOROVÝCH
BUŇKÁCH METODOU MULTIPARAMETRICKÉ
FLOWCYTOMETRIE**

Disertační práce v oboru Onkologie

Školitel:
Prof. MUDr. Michael Doubek, Ph.D.

Autor:
MVDr. Jana Chovancová

Brno, 2016

Abstrakt

Úvod. Průtoková cytometrie nachází uplatnění zejména v diagnostice a diferenciální diagnostice leukemií a lymfomů a řadí se mezi metody využívané k detekci minimální reziduální nemoci (MRD). Měření MRD umožňuje predikci účinnosti terapie a po jejím ukončení časný záchyt molekulárního relapsu. V této disertační práci je řešena problematika sledování MRD metodou průtokové cytometrie u pacientů s lymfomem z plášťových buněk (MCL), který vzniká z naivních B lymfocytů a patří mezi agresivní lymfomy se špatnou prognózou.

Cílem práce bylo navržení panelu osmibarevné analýzy pro sledování hladin MRD u pacientů s MCL, následná evaluace výsledků navrženého panelu metodou polymerázové řetězové reakce a zařazení tohoto panelu do rutinní laboratorní praxe.

Metody. Metodou průtokové cytometrie byla stanovena exprese 24 povrchových antigenů na patologických buňkách MCL a fyziologických B lymfocytech. Porovnáním zjištěné exprese byly vybrány antigeny, které umožnily vzájemně odlišit fyziologické a patologické buňky. Tyto antigeny se staly základem osmibarevného protokolu na detekci MRD. Výsledky nově navrženého protokolu byly evaluovány pomocí metody kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RQ-PCR).

Výsledky. Ačkoliv imunofenotyp MCL je velmi variabilní, na základě jeho analýzy byl sestaven senzitivní osmibarevný protokol pro detekci MRD kombinující antigeny CD3/5/19/20/23/45/62L/200 a dosahující limitu detekce 0,02 %. Výsledky navrženého protokolu byly komparovány s metodou RQ-PCR s 80% shodou na kvalitativní úrovni (MRD pozitivní/negativní) a silnou pozitivní korelací ($r_s=0,9$; $p<0,01$).

Závěr. Navržený panel osmibarevné analýzy pro detekci hladin MRD u pacientů s MCL přispěje ke zkvalitnění monitorace odpovědi na léčbu a časné diagnostiky relapsů.

Klíčová slova

Průtoková cytometrie – lymfom z plášťových buněk – minimální reziduální nemoc – imunofenotypizace – non-hodgkinské lymfomy – polymerázová řetězová reakce

Abstract

Background. Flow cytometry is applied in diagnostics and differential diagnostics of leukemias and lymphomas and ranks among approaches which allow measurement of minimal residual disease (MRD). MRD detection is an essential tool for therapy response assessment and can identify molecular relapse of the disease. This work deals with MRD detection in mantle cell lymphoma (MCL) using the flow cytometry. MCL originates from naïve mature B lymphocytes and belongs to the lymphomas with aggressive clinical courses and poor prognosis. The aim of this study was to create eight-color flow cytometric protocol which enables MRD monitoring in MCL and further evaluate and implement the novel protocol into routine laboratory praxis.

Methods. Using flow cytometry, the expression of 24 surface antigens on MCL cells and normal B lymphocytes was measured and the results was compared to establish markers that can distinguish neoplastic cells from normal B cell population. The novel eight color protocol was compared to sensitive method of real-time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR).

Results. Although MCL presents high immunophenotypic variability, the combination of antigens CD3/5/19/20/23/62L/200 enables MRD detection in MCL with limit of detection up to 0.02%. The results measured by this novel eight-color protocol was compared to RQ-PCR approach with 80% of concordance considering the qualitative level of measurement. Moreover, there was found strong positive correlation in the results ($r_s=0.9$, $p<0.01$).

Conclusions. The eight-color protocol for MRD detection in MCL will improve the therapy response assessment and the diagnostics of molecular relapses.

Key words

Flow cytometry – mantle cell lymphoma – minimal residual disease – immunophenotyping – non-Hodgkin lymphomas – polymerase chain reaction

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně pod vedením
prof. MUDr. Michaela Doubka, Ph.D. s využitím zdrojů uvedených v soupisu literatury.

.....
Jana Chovancová

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Michaelu Doubkovi, Ph.D. za odborné vedení disertační práce, cenné rady a lidský přístup během celého studia. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Andrei Marečkové za spolupráci a celému kolektivu Laboratoře průtokové cytometrie za vytvoření přátelské a inspirativní pracovní atmosféry. V neposlední řadě děkuji za podporu rodině a přátelům.

OBSAH

1	Úvod do problematiky	8
1.1	Non-Hodgkinské maligní lymfomy	8
1.1.1	Vývoj a funkce B lymfocytů	8
1.1.2	B buněčné lymfomy	11
1.1.2.1	Vznik a původ B buněčných lymfomů.....	11
1.1.2.2	Rizikové faktory	13
1.2	Lymfom z plášťových buněk	14
1.2.1	Epidemiologie a stručná charakteristika MCL	14
1.2.2	Morfologie MCL	14
1.2.3	Imunofenotyp MCL	15
1.2.4	Cytogenetická a molekulární charakteristika MCL	15
1.2.5	Prognostické markery MCL	17
1.2.6	Terapie MCL	18
1.3	Minimální reziduální nemoc	19
1.3.1	Metody detekce MRD	20
1.3.1.1	Polymerázová řetězová reakce	20
1.3.1.2	Průtoková cytometrie	21
2	Cíle	22
3	Materiál a metodika zpracování	23
3.1	Charakteristika souboru pacientů.....	23
3.2	Analýza metodou průtokové cytometrie	24
3.2.1	Navržení panelu osmibarevné analýzy pro sledování hladiny MRD u pacientů s MCL	24
3.2.2	Sledování hladin MRD pomocí 8-FCM panelu MCL MRD	25
3.3	Analýza metodou RQ-PCR.....	27
3.4	Statistická analýza.....	27
4	Výsledky	29
4.1	Komparace imunofenotypu buněk MCL a zdravých B lymfocytů.....	29
4.2	Stanovení kombinace antigenů vhodné pro detekci MCL MRD.....	31
4.3	Stanovení senzitivity navrhovaného panelu pro detekci MRD u MCL.....	33
4.4	Detekce hladiny MCL MRD pomocí 8-FCM protokolu	36
4.5	Komparace metod 8-FCM a RQ-PCR	37
4.6	Komparace hladiny MCL buněk u párových vzorků PK a KD měřených metodou 8-FCM	40
5	Diskuze	42

6	Závěr	47
7	Seznam použité literatury	48
8	Seznam zkratk.....	58
9	Seznam obrázků.....	60
10	Seznam tabulek.....	61
11	Seznam příloh	62
12	Seznam odborných publikací autorky	63
12.1	Publikace v časopisech s impakt faktorem.....	63
12.2	Aktivní účast na zahraničních a tuzemských konferencích	63
13	Souhrn poznatků disertační práce.....	66
14	Přílohy	67
14.1	Příl. 1: Prvoautorská publikace v časopise Cytometry part B: Clinical Cytometry	67
14.2	Příl. 2: Ukázka analýzy 8-FCM panelu MCL MRD	77

1 Úvod do problematiky

Vývoj nádorového onemocnění je mnohastupňový proces, během kterého dochází k mutacím genomu zdravé buňky vedoucí k její maligní transformaci. Podmínkou této transformace je aktivace onkogenů a inaktivace tumor-supresorových genů zajišťující proliferaci buněk a jejich přežívání. Vyvolané nekontrolované dělení má za následek hromadění dalších genetických mutací a selekci vlastností, které jsou pro nádorové buňky výhodnější a umožňují jejich klonální expanzi.

1.1 Non-Hodgkinské maligní lymfomy

Maligní lymfomy se řadí mezi nádory lymfatické tkáně vycházející z B a T lymfocytů. Primárně postihují lymfatické uzliny a v mnoha případech i mimouzlinové lymfatické tkáně. Lymfomy jsou děleny do dvou skupin: Hodgkinův lymfom (HL) a non-Hodgkinské lymfomy (NHL). Pro HL je typický výskyt maligních Reedové-Sternbergových buněk a Hodgkinových buněk, které vznikají maligní transformací postgerminálních B lymfocytů.¹ Ostatní typy lymfomů se řadí do rozsáhlé kategorie NHL², v níž převažují z 95 % B buněčné lymfomy³ vznikající klonální expanzí imaturovaných nebo maturovaných B lymfocytů v různém stádiu diferenciaci.

1.1.1 Vývoj a funkce B lymfocytů

B lymfocyty představují základní buňky specifické humorální imunity, jejichž hlavní funkcí je produkce protilátek zaměřených proti mikroorganismům nebo jejich toxinům. B lymfocyty byly v podstatě popsány zároveň s T lymfocyty, a to v 60. letech minulého století, kdy byl předložen návrh o funkčním propojení buněk v ptačí Fabriciově burze, které jsou odpovědné za produkci protilátek, s buňkami v thymu, jež nesou zodpovědnost za buněčnou imunitu.^{4,5} Vývoj a funkce B lymfocytů byla od té doby velmi intenzivně studována.

B lymfocyty vznikají z hematopoetických kmenových buněk (HSC), které se nacházejí v kostní dřeni. Spojitost mezi buňkami majícími svůj původ v kostní dřeni a humorální imunitní odpovědí byla poprvé demonstrována koncem 60. let minulého století na myších transplantačních modelech.^{6,7} HSC se nejdříve diferencují do hematopoetických multipotentních progenitorů (MPP) a dále pak do společných lymfoidních progenitorů

(CLP). CLP disponují schopností pokračovat ve vývoji do T, B nebo NK buněk, ale již nejsou způsobilé vyvíjet se do myeloidní linie.⁸ CLP se mohou dále diferencovat do progenitorových pro-B buněk, a zahájit tak vývoj zdravých B lymfocytů. U progenitorových pro-B buněk začíná přeskupování genů pro těžký řetězec imunoglobulinů (IgH), což obnáší rekombinaci V, D a J genových segmentů.

Druhým vývojovým stádiem jsou prekurzorové pre-B buňky, které exprimují IgH jak v cytoplazmě, tak později i na svém povrchu; spolu s prozatímním lehkým řetězcem (IgL) a dimerem signalizačních proteinů CD79a a CD79b vytváří receptor pre-BCR.⁹

Na úrovni B prekurzorů jsou rozeznávány dva specifické markery: CD34 a terminální deoxynukleotidyl transferáza (TdT). TdT plní důležitou funkci během rekombinantního procesu tím, že vkládá N segment mezi V, D a J region. Na konci tohoto procesu se vypíná,¹⁰ a proto je TdT významným diagnostickým znakem. Tato je detekována u většiny akutních lymfoblastických leukemií (ALL)¹¹ a dále u některých akutním myeloidních leukemií (AML), u nichž se podílí na stanovení stupně zralosti, a slouží tedy jako prognostický marker.¹²

V tomto stádiu dochází i k přeskupení genů pro dva IgL. Vlivem cytokinů IL-3 a IL-7 vznikají nezralé B lymfocyty, které na svém povrchu exprimují kompletní IgM. Přesto tyto lymfocyty nedisponují schopností zahájit imunitní odpověď a osud B lymfocytů v této fázi je nejistý. Velká část je přímo v kostní dřeni eliminována a jen malé množství nezralých B lymfocytů (IgM⁺) opouští jako transientní buňky kostní dřeň a přechází do sekundárních lymfatických tkání, kde se mění na IgM⁺, IgD⁺ zralé B buňky a jako naivní maturované B buňky se přidávají k ostatním cirkulujícím B lymfocytům.¹³ V periferních lymfatických orgánech jsou připraveny rozpoznávat a vázat antigen.

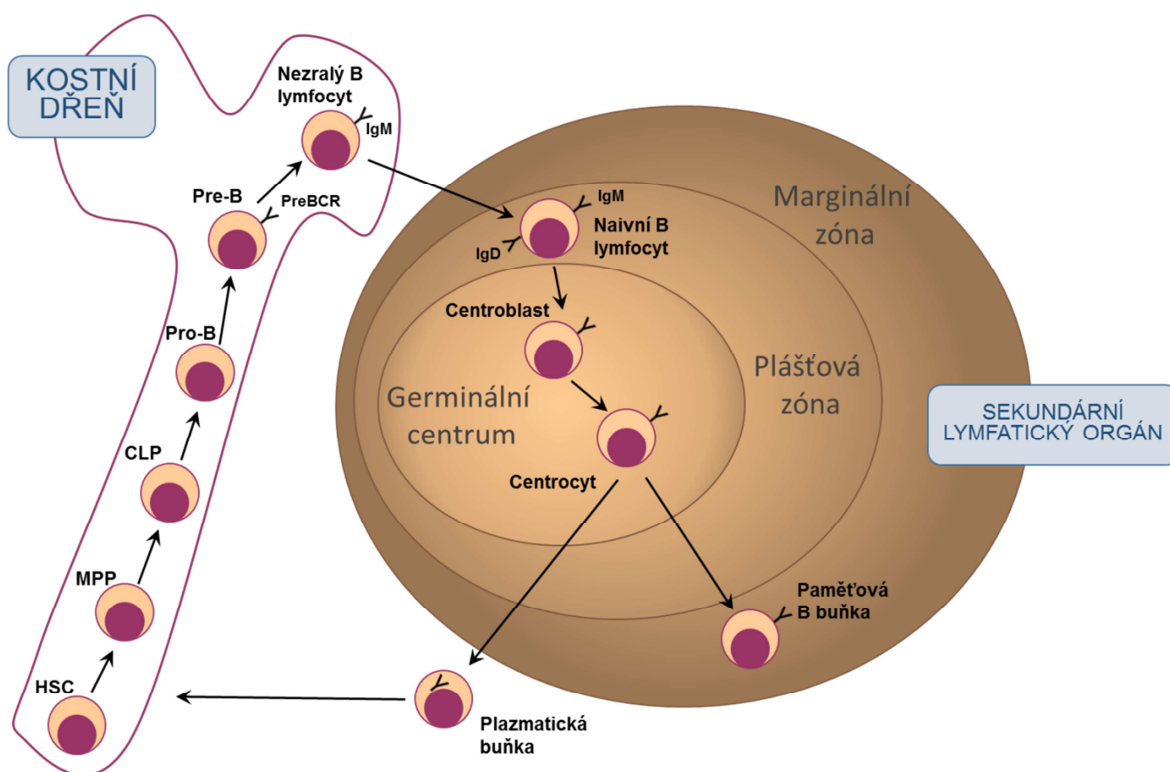
Maturované naivní B buňky exprimují antigen CD5 a cirkulují v periferní krvi a v periferních lymfatických orgánech, kde osidlují primární B buněčné folikuly a folikuly plášťové zóny.^{14,15} Naivní B lymfocyty mohou být stimulovány dvěma typy antigenů, a to antigeny nezávislými a závislými na T lymfocytech, což vede k dvojímu typu B diferenciaci. Reakcí na T lymfocytech nezávislé stimulaci je proliferace B buněk a jejich přeměna na krátce žijící plazmatické buňky, jež produkují nízkoafinitní IgM. Pokud dochází ke kostimulaci B lymfocytů T buňkami, přecházejí B lymfocyty do centra primárního B buněčného folikulu, kde se spojují s folikulárními dendritickými buňkami (FDCs), proliferují a diferencují do centroblastů a centrocytů, aby vytvořily germinální centrum (GC).^{16,17}

V GC jsou rozlišitelné 2 zóny – tmavá zóna obsahující centroblasty a světlá zóna složená převážně z centrocytů. B lymfocyty v germinálním centru exprimují malá množství povrchových Ig receptorů a na rozdíl od naivních B buněk, paměťových buněk a plazmatických buněk, exprimují antigen CD10 a transkripční faktor BCL-6.¹⁸ Dalším důležitým rysem B lymfocytů v GC je vypnutá exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2, čímž se stávají citlivější k apoptotické smrti. K prevenci apoptózy slouží vyživovací a proliferační signály vycházející z FDC a T lymfocytů.¹⁹

B lymfocyty v GC procházejí dvěma odlišnými genetickými procesy: somatickou hypermutací a izotypovým přesmykem. K somatické hypermutaci dochází v genových segmentech kódujících variabilní část imunoglobulinů (IgV), čímž se přetváří vazebné místo pro antigen tak, aby došlo ke zvýšení afinity povrchových Ig receptorů.²⁰ Vzhledem k tomu, že se částečně jedná o nahodilý proces, tyto mutace mohou vést naopak i ke snížení afinity na antigen. Takové buňky se nejsou schopny navázat na FDC antigeny, a tedy nejsou schopny přijímat vyživovací signály. Kvůli nízké afinitě k FDC antigenům podléhá v GC až 90 % B lymfocytů apoptóze.^{19,21}

Během izotypového přesmyku se mění typ těžkého řetězce; dochází ke změně původního IgM a IgD na IgG, IgA nebo méně obvykle na IgE. Část populace B lymfocytů z GC a paměťové buňky nesou BCL-6 a CD95 genové mutace.^{22,23} Centrocyty, které přežívají, dozrávají v GC v dlouho žijící plazmatické buňky nebo paměťové buňky.¹⁰ Paměťové buňky exprimují antigen CD27, silně IgM ale slabě IgD.²⁴⁻²⁶ Plazmatické buňky vzniklé v GC a dlouho žijící plazmatické buňky přecházejí do krve a usazují se v kostní dřeni; silně exprimují adhezivní molekuly CD138 a CD38 na rozdíl od B buněčných markerů CD19 a CD20, které zcela postrádají.²⁷

Po stimulaci antigenem jsou naivní B lymfocyty aktivovány a mohou se dále vyvíjet třemi různými směry: (1) klonální expanzí a selekcí v GC, (2) klonální diferenciací mimo GC a nebo (3) se stávají anergními. V konečné fázi B lymfocyty diferencují buď do paměťových buněk nebo do plazmatických buněk produkujících protilátky. Schéma diferenciací B lymfocytů je znázorněno na obr.1.



Obr. 1: Diferenciace B lymfocytů

Vysvětlivky: CLP, společný lymfoidní progenitor; HSC, hematopoetická kmenová buňka; MPP, multipotentní progenitorová buňka.

1.1.2 B buněčné lymfomy

Z pohledu WHO klasifikace bylo popsáno více než dvacet typů B buněčných lymfomů odvozených od zralých B lymfocytů.² Mezi nejčastěji se vyskytující typy patří folikulární lymfom (FL), difúzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL), chronická lymfocytární leukémie/malobuněčný lymfocytický lymfom (CLL/SLL), extranodální lymfomy marginální zóny asociované s mukózní tkání (MALT lymfomy), lymfom z plášťových buněk (MCL), lymfom marginální zóny (MZL) a Burkittův lymfom (BL).

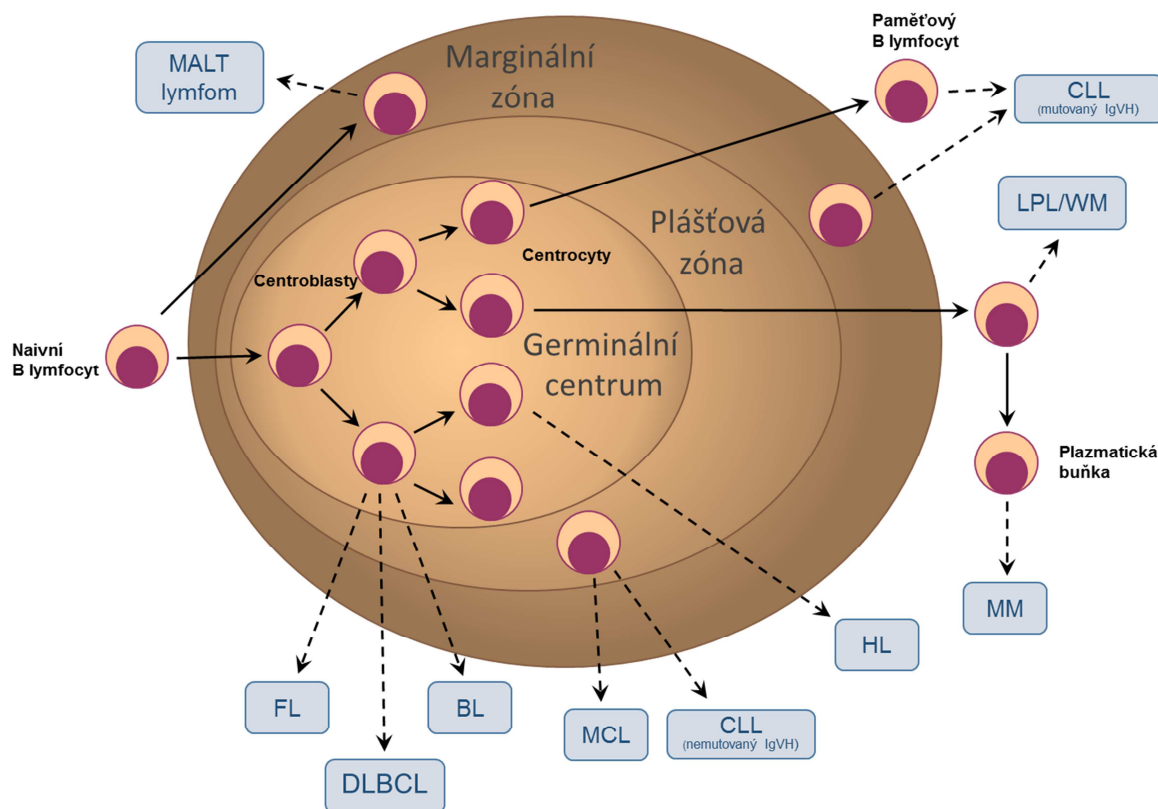
NHL se řadí na páté místo nejčastěji se vyskytujících zhoubných nádorů na západní polokouli. V České republice činí incidence NHL přibližně 11 pacientů na 100 000 obyvatel.²⁸

1.1.2.1 Vznik a původ B buněčných lymfomů

B buněčné lymfomy mohou vycházet z kteréhokoli vývojového stádia B lymfocytů (obr. 2), proto také často sdílejí stejné charakteristické znaky se svými zdravými protějšky. Pro každý vývojový stupeň bývá typický určitý imunofenotyp a genetický profil.²⁹ O faktu, že většina B lymfomů vzniká v GC, svědčí jejich mutovaný status v oblasti genu pro těžké řetězce

imunoglobulinů (IgVH). Jedná se především o FL, BL a DLBCL, jež společně tvoří přibližně 80 % všech NHL.^{30,31} Na základě analýzy genové exprese bylo zjištěno, že BL pochází z B lymfocytů tmavé zóny GC,^{32,33} čemuž odpovídá nejen mutovaný status IgVH, ale i exprese markerů CD10 a BCL-6. Podobné znaky jsou nalézány i u FL,^{2, 34, 35} pro který je dále typická translokace t(14;18). K této dochází během VDJ rekombinace v kostní dřeni, což by svědčilo o vývoji FL z naivních B lymfocytů.³⁶ Popisovaný nález je vysvětlován dvoustupňovým zásahem ve vývoji FL, kdy vznik translokace je první událostí, ale až následné mutace umožňují progresi neoplazie. Studium genové exprese DLBCL poukazuje na to, že se jedná o velmi heterogenní skupinu s řadou subtypů. DLBCL se může vyvinout de novo nebo jako následek transformačních změn jiného typu lymfomu, nejčastěji FL nebo CLL. Existuje podskupina DLBCL, která nevykazuje znaky vývoje v GC, ale odpovídá původu aktivovaných B lymfocytům.^{34,37}

Do opačné skupiny lymfomů, u kterých je prezentován nemutovaný IgVH status, se řadí majoritní část MCL a podskupina CLL. Tyto buňky odpovídají naivním B lymfocytům³⁸ nebo je lze charakterizovat jako buňky, které se v GC nesetkaly s antigenem. U diagnózy CLL se jedná o zásadní informaci, neboť pacienti s nemutovaným IgVH mají horší prognózu ve srovnání s pacienty s mutovaným IgVH.³⁹



Obr. 2: Původ B buněčných lymfomů (upraveno)³

Vysvětlivky: BL, Burkittův lymfom; CLL, chronická lymfocytární leukemie; DLBCL, difuzní velkobuněčný B lymfom; FL, folikulární lymfom; HL, Hodgkinův lymfom; LPL, lymfoplasmocytární lymfom; MCL, lymfom z plášťových buněk; MM, mnohočetný myelom; WM, Waldenströмова makroglobulinémie.

1.1.2.2 Rizikové faktory

V současnosti je popisována řada rizikových faktorů, které mohou vést ke vzniku lymfomů. Nejsilnější vazby byly nalezeny ve vztahu k imunodeficiencím a autoimunitním onemocněním. Podstatné imunodeficiencie zahrnují iatrogenní imunosuprese a infekce virem lidské imunitní nedostatečnosti (HIV). U pacientů infikovaných virem HIV je prokázána signifikantně vyšší incidence BL a DLBCL.⁴⁰⁻⁴² Některé lymfomy jsou spojeny s konkrétními virovými infekcemi jakými jsou Epstein-Barrové virus (EBV) a virus hepatitidy typu C (HCV).⁴³⁻⁴⁶ Podobné spojitosti platí i pro bakteriální onemocnění – riziko vzniku MALT lymfomů žaludku je šestnásobně vyšší u pacientů s protilátkami proti *Helicobacter pylori* v porovnání s neinfikovanými jedinci.⁴⁷ Nádorové buňky přitom nestimuluje k proliferaci samotný mikroorganismus, ale ke stimulaci dochází prostřednictvím *Helicobacter pylori* specifických T lymfocytů a jimi produkovanými cytokiny.⁴⁸

1.2 Lymfom z pláštěvých buněk

1.2.1 Epidemiologie a stručná charakteristika MCL

MCL se řadí mezi méně časté lymfomy, představuje přibližně 3-10 % všech NHL.^{2,49} Postihuje převážně starší populaci; medián věku při diagnóze je 68-70 let. Incidence MCL je v Evropě a Severní Americe přibližně 0,5 případu na 100 000 obyvatel ročně. Muži bývají zasaženi až 2,3-2,5krát častěji než ženy.⁵⁰ Jedná se o vysoce agresivní lymfom s velmi špatnou prognózou; medián celkového přežití je 3-5 let.^{51,52}

Na konci 90. let minulého století byla identifikována skupina pacientů s MCL s indolentním klinickým průběhem. Klinický stav těchto pacientů mnohdy nevyžaduje chemoterapeutickou intervenci a délka přežití je i více jak 10 let.⁵³⁻⁵⁶ Ačkoliv byla tato podskupina rozpoznána před více jak patnácti lety, stále nejsou známy spolehlivé markery, díky kterým by bylo možné predikovat indolentní formu MCL.^{56,57}

1.2.2 Morfologie MCL

Z morfologického hlediska se rozlišuje pět variant MCL. Nejčastěji se vyskytuje klasická varianta, která je tvořena homogenní populací malých až středně velkých lymfocytů s nepravidelnou jadernou konturou, disperzním chromatinem, nevýrazným jadérkem i cytoplazmou.⁵⁸ Dalšími variantami jsou blastoidní, pleomorfní, malobuněčnou a marginal zone-like,^{49,53} u kterých může být správné stanovení diagnózy komplikované. Blastoidní varianta je tvořena většími buňkami, které připomínají lymfoblasty. Chromatin je disperzní a mitotická aktivita lymfocytů vysoká.⁵⁹ Pro pleimorfní variantu je typická heterogenní populace buněk o různé velikosti i tvaru se světlou cytoplazmou, nepravidelnou jadernou konturou a prominujícím jadérkem.⁵⁸ Pleimorfní i blastoidní varianta jsou z klinického hlediska velmi agresivní, často reprezentují progresi onemocnění; výskyt de novo bývá vzácnější.⁶⁰ Malobuněčná varianta složená z malých kulatých lymfocytů, jejichž chromatin je shluklý a hutný, připomíná CLL/SLL. Marginal zone-like varianta, jak již napovídá její název, imituje MZL nebo také monocytoidní B buňky. Pro lymfocyty je typická světlá cytoplazma.^{49,53}

1.2.3 Imunofenotyp MCL

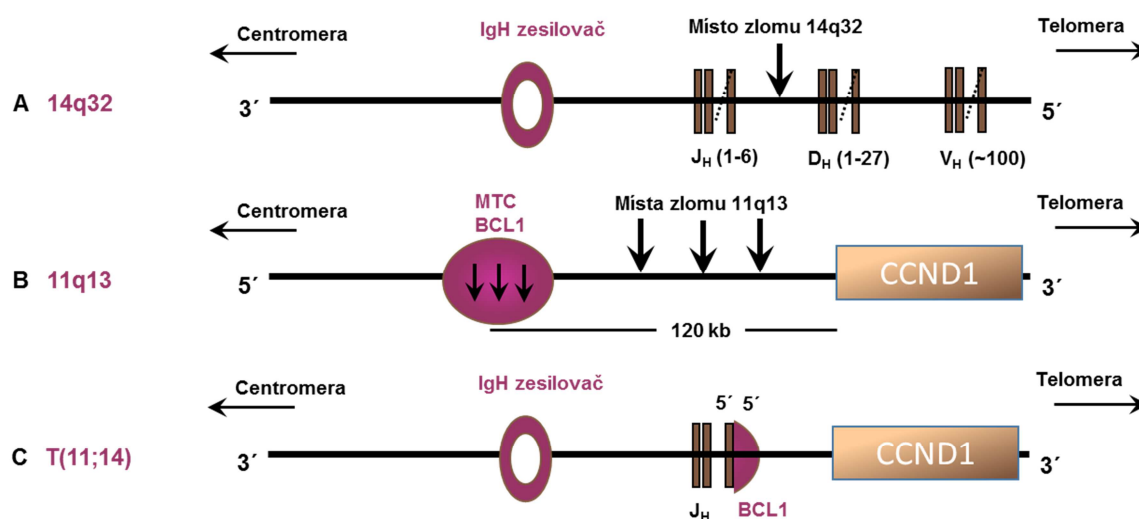
Buňky MCL exprimují na svém povrchu znaky zralých naivních B lymfocytů jako CD19, CD20, CD22, CD24, CD79b a FMC-7, dále IgM a/nebo IgD povrchové Ig.^{53,58} Daleko častěji je detekován lambda nežli kappa Ig lehký řetězec.⁶¹ Pro buňky MCL je typická přítomnost antigenu CD5, který se fyziologicky nachází na T lymfocytech. Dalším znakem společným pro MCL a T lymfocyty je antigen CD43.⁶² Oproti tomu CD23 bývá ve většině případů zcela negativní.⁶³⁻⁶⁵ Antigen CD23 je nízkoafinitní Fc receptor pro IgE a zároveň marker aktivovaných B lymfocytů,⁶⁶ jenž je kromě B buněk exprimován na monocytech a eozinofilech.⁶⁷ Ačkoliv negativita CD23 má důležitý význam pro stanovení diagnózy, byla popsána podskupina MCL, která antigen CD23 exprimuje.^{68,69} V současné době není zcela prostudováno, jestli tato fenotypová varianta má klinický nebo biologický význam; bývá připisována blastoidní variantě MCL,⁷⁰ podobně jako pozitivní exprese antigenu CD10.⁷¹⁻⁷³ CD10 je membránová metaloendopeptidáza, jež je exprimována na lymfoidní progenitorech a buňkách derivovaných z germinálního centra. Tato skutečnost vedla k úvahám, jestli buňky, na jejichž povrchu se CD10 exprimuje, nemají odlišný původ, a to právě v germinálním centru. Ovšem analýzy somatické mutace IgVH tuto skutečnost nepotvrdily.^{73,74}

Stanovení diagnózy bývá vzhledem k variabilnímu fenotypu složité, zejména odlišení MCL od CLL, jejichž společným znakem je populace s koexpresí CD5 a CD19. Významným markerem pro odlišení obou neoplazií je CD200, který je hyperexprimován na buňkách CLL, na rozdíl od MCL, kde bývá zcela negativní.⁷⁵ Jedná se o membránový glykoprotein, který náleží do superrodiny imunoglobulinů.⁷⁶ Fyziologicky se vyskytuje na B lymfocytech, na části T lymfocytů a dendritických buňkách.⁷⁷

1.2.4 Cytogenetická a molekulární charakteristika MCL

Pro MCL je typická reciproká chromozomální translokace t(11;14)(q13;q32) mezi genem CCND1 (BCL1), jenž kóduje cyklin D1 a nachází se na 11. chromozomu, a genem pro IgH na 14. chromozomu (obr. 3). Tato translokace je odpovědná za deregulaci CCND1 genu, což vede ke zvýšené nekontrolovatelné expresi cyklinu D1.^{78,79} Ten se uplatňuje během regulace buněčného cyklu; konkrétně je zodpovědný za přechod buněk z G1 do S fáze pomocí aktivace cyklin-dependentích kináz CDK4 a CDK6. Deregulace exprese cyklinu D1 se vyskytuje u většiny MCL a považuje se za primární molekulární onkogenetickou změnu

v patogenezi MCL. U zdravých B lymfocytů není cyklin D1 detekován na rozdíl od cyklinů D2 a/nebo D3.^{80,81} Detekce translokace t(11;14) a zvýšení hladiny cyklinu D1 jsou nedílnou součástí diagnostiky a diferenciální diagnostiky pro odlišení od lymfomů s podobným imunofenotypem a morfologií. I přesto není translokace t(11;14) pro MCL specifická, nalézána je také u mnohočetného myelomu (MM).^{82,83} Komplikace při stanovení diagnózy mohou nastat u cyklin D1 negativních případů, u kterých není přítomna chromozomální aberace t(11;14), ale i přesto sdílejí s konvenčním MCL shodnou morfoloii, imunofenotyp, profil genové exprese i klinickou manifestaci.^{84,85} U většiny cyklin D1 negativních případů dochází ke zvýšené expresi cyklinu D2 a D3. Deregulace cyklinu D2 může být důsledkem translokace t(2;12)(p12;p13), kdy se gen pro cyklin D2 spojuje s genem pro lehký řetězec Ig kappa.⁸⁶



Obr. 3: Schématické znázornění translokace t(11;14)(q13;q32) (upraveno)⁴⁹

A Zárodečný gen pro IgH na chromozomu 14. Místo zlomu se nachází mezi segmenty D a J, ke zlomu dochází během VDJ rekombinace. **B** Oblast BCL1 chromozomu 11. 30-50 % míst zlomu se nachází v tzv. hlavním translokačním klastru (MTC), k 10-20 % zlomů dochází mimo MTC blíže ke genu CCND1. **C** Translokace t(11;14)(q13;q32). Gen CCND1 se dostává pod kontrolu IgH zesilovače.

Vysvětlivky: BCL1, B cell lymphoma 1; MTC, hlavní translokační klastr; IgH, těžký imunoglobulinový řetězec

1.2.5 Prognostické markery MCL

MCL je biologicky i klinicky heterogenní lymfom, u kterého je velmi přínosné stanovení odhadu prognózy, a volba vhodného terapeutického režimu respektujícího individuální charakter onemocnění.

Z morfologického hlediska je prognosticky důležitá diagnostika blastoidní a pleomorfní varianty MCL, pro které je charakteristický velmi agresivní průběh.⁸⁷ V roce 2008 byl zformulován mezinárodní prognostický index pro MCL (MIPI),⁸⁸ který je prvním indexem specificky navrženým pro pacienty s MCL a nahradil do té doby používaný mezinárodní prognostický index (IPI), původně vytvořený pro DLBCL.⁸⁹ Nevýhodou IPI byla nepřesná diskriminace především pacientů s nízkým rizikem. MIPI dělí pacienty do tří kategorií s nízkým, středním a vysokým rizikem na základě věku v době diagnózy, zhodnocení celkové fyzické aktivity škálou ECOG 0-5, kde 0 = plně bez omezení a 5 = smrt pacienta, hladiny laktátdehydrogenázy (LDH) v séru a počtu leukocytů. Dále je do MIPI, jako důležitý biologický marker, zařazena buněčná proliferace, pro jejíž analýzu se tradičně využívá index Ki-67⁸⁸ vyjadřující procentuální zastoupení imunohistochemicky KI-67 pozitivních patologických buněk. Index Ki-67, jakožto míra proliferace, koreluje s hladinou exprese cyklinu D1 i dalších regulátorů buněčného cyklu.⁹⁰

Při stanovování prognózy existuje zřejmá snaha hledat a kombinovat klasické prognostické faktory s novými faktory biologickými. Podobně jako u CLL i u MCL se nachází IgVH jak v nemutované tak i mutované podobě. Nemutovaná neboli zárodečná konfigurace IgVH je typická pro naivní B lymfocyty, které zůstávají v plášťové zóně a nepřecházejí do GC, na rozdíl od mutovaného IgVH, jehož přítomnost indikuje setkání B lymfocytu s antigenem. Somatické hypermutace IgVH jsou nalézány až u 20 % MCL, což poukazuje na subset MCL buněk, které prošly GC.⁹¹ Výskyt somatických hypermutací IgVH je spojován s případy MCL, u kterých byla zaznamenána lepší prognóza.^{92,93}

Až u 90 až 95 % případů s diagnózou MCL bývá detekována vysoká hladina transkripčního faktoru SOX-11. SOX-11 se přirozeně exprimuje v průběhu fetálního vývoje, kde plní důležité funkce během organogeneze.⁹⁴ Z pohledu diagnostiky je přínosné, že SOX-11 pozitivní případy zahrnují i ty, u kterých není prokázána vysoká hladina cyklinu D1.^{95,96} Pro zbylých 5-10 % SOX-11 negativních případů, platí podobné závěry jako pro mutovaný IgVH; někteří autoři pojí absenci exprese SOX-11 s indolentní formou MCL a navrhují zařadit SOX-11 mezi prognostické markery.^{97,98} Označení SOX-11 jako prognostického

markeru je však sporné, protože jiné studie význam SOX-11 v predikci klinického průběhu vylučují.⁵⁷

1.2.6 Terapie MCL

V současné době neexistuje léčebný režim, který by měl plně kurativní efekt. Jako nejúčinnější je považována kombinace vysokých dávek cytosin-arabinosidu a anti-CD20 monoklonální protilátky rituximabu s následnou autologní transplantací krvetvorných buněk (ASCT).⁹⁹⁻¹⁰¹ Úvodní indukční fáze, která předchází podání vysokodávkové chemoterapie a ASCT, slouží k navození kompletní remise onemocnění. K tomuto účelu se používají standardizované imunochemoterapeutické režimy, mezi něž se řadí např. Nordický protokol, jenž v indukční fázi alteruje tři cykly R-MaxiCHOP (rituximab v kombinaci s cyklofosfamidem, doxorubicinem, vinkristinem a prednisonem) se třemi cykly R-HD-Ara-C (rituximab v kombinaci s vysokodávkovaným cytarabinem).¹⁰¹ Jiný z režimů alteruje R-hyper-CVAD (kombinace rituximabu, hyperfrakcionovaného cyklofosfamidu, vinkristinu, doxorubicinu a dexamethasonu) s R-HD-MTX-Ara-C (kombinace rituximabu s vysokodávkovaným methotrexátem a cytarabinem).¹⁰² Léčebná odpověď (parciální nebo kompletní remise onemocnění) je v další fázi konsolidována vysokodávkovou chemoterapií a ASCT.¹⁰³

Významný přínos pro pacienty vnesla integrace monoklonální protilátky rituximabu do terapeutických režimů. Její použití během indukční fáze v posledních 10 letech zásadně zlepšilo prognózu pacientů s MCL.^{100,104,105} Další pozitivní efekt byl prokázán při jejím podávání v tzv. udržovací fázi léčby, kdy významně prodlužuje bezpříznakové období pacientů.¹⁰⁶

Vysokodávkovou imunochemoterapeutickou léčbu lze vzhledem k její toxicitě aplikovat pouze mladším pacientům, u kterých to dovoluje jejich zdravotní stav. U starších pacientů či pacientů s komorbiditami se léčba omezuje na středně intenzivní režimy, kde se opět využívá efektu rituximabu specificky cíleným na leukemické buňky. Rituximab je podáván v kombinaci s alkylačními látkami a antracykliny (R-CHOP) nebo v kombinaci s cytostatikem bendamustinem (R-bendamustin).¹⁰⁷ Podobně jako u vysoce intenzivních režimů i zde byl prokázán pozitivní přínos udržovací terapie rituximabem. Při kombinaci s R-CHOP dosahují pacienti 4letého celkového přežití v 87 %.¹⁰⁸

U mladých pacientů s relapsem onemocnění je možnou alternativou allogenní transplantace krvetvorných buněk (alloSCT).^{106,109} Extrémně špatnou prognózu mají pacienti, u kterých

došlo během relapsu MCL k transformaci do blastoidní varianty. Jako slibný lék pro relabovaný nebo refrakterní MCL se jeví inhibitor ibrutinib. Jedná se o inhibitor Brutonovy kinázy uplatňující se v BCR signalizaci.¹¹⁰ Dlouhodobou remisi dokáže u části pacientů navodit imunomodulační látka lenalidomid.¹¹¹ Recentní klinické studie se věnují převážně analýze účinnosti režimů kombinujících nově zaváděné léky. Slibné výsledky prokázala u pacientů s relabovaným MCL kombinace bendamustinu a rituximabu společně s inhibitorem proteinkinázy mTOR temsirolimem (BERT).¹¹² Efektivní se ukazuje i biologická léčba lenalidomidem v kombinaci s rituximabem.¹¹³

Ačkoliv u většiny pacientů je pozorován agresivní průběh nemoci vyžadující terapeutickou intervenci, u některých pacientů je popisována indolentní forma onemocnění, která nevyžaduje terapeutický zásah i po dobu několika let. Možnost sledování průběhu onemocnění bez zahájení terapie (tzv. „watch and wait“ strategie) by byla přínosná především u starších pacientů, nicméně zatím není znám spolehlivý marker umožňující potvrzení indolentní varianty a rozpoznání většiny těchto případů je založeno na retrospektivním stanovení diagnózy.⁵⁶

1.3 Minimální reziduální nemoc

Pojem minimální reziduální nemoc (MRD) je nejčastěji užíván v hematologické problematice, kde je definován jako malé množství buněk, které se v organismu vyskytuje v průběhu terapie, nebo na jejím konci, a není možno jej detekovat běžnými cytologickými metodami.¹¹⁴ V takovém případě se hovoří o kompletní klinické remisi, ačkoliv v těle pacienta se může vyskytovat až 10^{10} patologických buněk, jež často vedou k relapsu onemocnění.¹¹⁵ Poprvé byla MRD sledována u pacientů s akutními leukémiemi, a to již v 70. let minulého století.¹¹⁶ V současné době je monitorování MRD u pacientů s ALL nebo AML nedílnou součástí léčebných protokolů poskytující důležité prognostické informace. Významným prognostickým faktorem je časná odpověď na léčbu, čili co nejpřesnější stanovení hladiny reziduálních leukemických buněk po zahájení terapie. Tato data umožňují stratifikovat pacienty do skupin podle míry rizika vzniku relapsu a začlenit je do vhodných léčebných protokolů. Tak bývá zajištěna intenzivnější terapie pro pacienty s vysokým rizikem relapsu a naopak méně intenzivní léčba pro pacienty, kde je pravděpodobnost vzniku relapsu nízká. Nasazení méně intenzivní terapie výrazně snižuje riziko vzniku sekundárních malignit, které mohou být důsledkem toxické léčby.^{117,118}

Dalším prognosticky významným ukazatelem, při kterém se uplatňuje sledování hladiny MRD, je detekce molekulárního relapsu onemocnění. Pacienti dosahující po léčbě molekulární remise onemocnění mají lepší prognózu v porovnání s pacienty, u kterých je nadále detekována MRD.¹¹⁹ Pokud u pacienta nedochází ke klinické manifestaci onemocnění, ale je u něj zachycena MRD pozitivita, ačkoliv byl dříve MRD negativní, jedná se o molekulární relaps onemocnění. Takový stav je indikací pro podání preemptivní léčby, protože u téměř všech případů vede molekulární relaps k relapsu klinickému. U B lymfoproliferací je preemptivní léčba založená na imunoterapii rituximabem.¹²⁰

1.3.1 Metody detekce MRD

Leukemické buňky vykazují unikátní genetické znaky, kterými se odlišují od svých normálních protějšků. Princip sledování MRD spočívá v identifikaci takových markerů, které umožní detekci reziduálních leukemických buněk s vysokou specifitou a senzitivitou, a to na úrovni DNA, RNA nebo proteinu.

1.3.1.1 Polymerázová řetězová reakce

Původně byly využívány kvalitativní a semikvantitativní metody založené na klasické polymerázové řetězové reakci (PCR).¹²¹ Rozvoj kvantitativních molekulárních metod přinesl zpřesnění limitované informace o pouhé přítomnosti či nepřítomnosti patologického klonu, a umožnil tak sledovat kinetiku nemoci. Mezi nejčastěji využívané kvantitativní metody detekce MRD se řadí kvantitativní PCR v reálném čase (RQ-PCR a RT-RQ-PCR) a průtoková cytometrie (FCM).¹²²

RQ-PCR analýza u hematologických malignit, jež vycházejí z B nebo T lymfocytů, využívá specifických přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory (TCR) pomocí pacient-specifických primerů.¹²³ U MCL a FL je RQ-PCR analýza zlatým standardem a v současné době nejcitlivější metodou. Kromě detekce přestavby IgVH je další alternativou záchyt translokací typických pro dané onemocnění. U MCL je molekulárním cílem pro RQ-PCR translokace t(11;14), u FL se jedná o translokaci t(14;18).¹²⁴ Stejné principy platí i pro detekci MRD u pacientů s ALL.¹²⁵ U AML je detekce MRD molekulárními metodami vzhledem k odlišné imunologické charakteristice složitější.¹²⁶ Pozornost je soustředěna na geny, jejichž exprese je u AML v porovnání s normálními buňkami vyšší, a mohou tedy sloužit jako molekulární cíle pro RQ-PCR. Recentní výzkumy se zaměřují zejména na

využití transkripčního faktoru WT1, jehož zvýšená exprese na úrovni mRNA je popisována u 80-90 % případů s diagnózou AML.¹²⁷

1.3.1.2 Průtoková cytometrie

Sledování hladiny MRD u akutních leukemií pomocí FCM je založeno na analýze širokého spektra antigenů během vstupního vyšetření a následném výběru vhodné kombinace imunofenotypu sdruženého s leukemií (LAIP), který se odlišuje od zdravých leukocytů. Rozdíly mohou být v intenzitě exprese některých antigenů. Patologická populace buď daný znak hyperexprimuje, nebo naopak daný znak není vůbec detekován. Dále se u patologických buněk konkrétní buněčné linie mohou vyskytovat znaky jiných buněčných linií. Například exprese lymfoidních markerů CD2, CD3, CD5, CD19 nebo CD56 na myeloidních blastech.¹²⁸ Senzitivita detekce MRD panelu se liší v závislosti na vyšetřovaném imunofenotypu – pohybuje se v rozmezí 0,1 až 0,01 % ze všech jaderných buněk.^{129,130}

Zatímco detekce MRD u akutních leukemií vyžaduje použití specifických panelů pro každého pacienta, jiné hematologické malignity umožňují z pohledu FCM zvolit více univerzální přístup. V roce 1997 byl publikován mezinárodně standardizovaný protokol detekce MRD u CLL pomocí čtyřbarevné FCM. Tato velmi citlivá metoda umožňuje dosáhnout limitu detekce 10^{-4} a úzce koreluje s výsledky alelově specifické PCR v reálném čase (RQ-ASO IgH-PCR), kde vykazuje 95% shodu. Je aplikovatelná pro veškeré typy vzorků a terapeutických režimů.¹³¹ Tento protokol byl později upraven i pro šestibarevnou FCM.¹³² Pro diagnózu HCL je dostupný osmibarevný panel FMC, který dosahuje citlivosti 10^{-4} a jehož výsledky jsou srovnatelné s metodou PCR.¹³³

Ačkoliv při porovnání s PCR metodami vykazuje FCM nižší citlivost, výhody metody spočívají ve velmi rychlém zpracování vzorku a jeho vyhodnocení. Výsledek bývá k dispozici řádově v hodinách po dodání vyšetřovaného materiálu laboratoři.

2 Cíle

V disertační práci je řešena analýza imunofenotypu neoplastických buněk u pacientů s MCL metodou multiparametrické průtokové cytometrie.

Cíle práce byly následující:

1. Navrhnout panel osmibarevné analýzy pro sledování hladiny minimální reziduální nemoci u pacientů s lymfomem z pláštěvých buněk a zavést toto vyšetření do rutinní laboratorní praxe
2. Evaluovat výsledky navrženého osmibarevého panelu pomocí metod molekulární biologie

3 Materiál a metodika zpracování

3.1 Charakteristika souboru pacientů

Pro výzkumné účely byli pacienti rozděleni do dvou souborů, a to souboru I a souboru II.

Charakteristika souboru I: Tento soubor byl použit na navržení panelu osmibarevné analýzy průtokové cytometrie pro detekci hladin MRD u pacientů s MCL (8-FCM panel MCL MRD). Zahrnuje 2 skupiny pacientů:

- První skupina byla tvořena 30 pacienty s nově diagnostikovanou leukemizovanou formou MCL z Interní hematologické a onkologické kliniky (IHOK) Fakultní nemocnice (FN) Brno.
- Druhá skupina byla vytvořena 28 zdravými kontrolami skládajícími se z dobrovolníků a pacientů, kteří byli vyšetřováni kvůli jinému hematologickému onemocnění a nevykazovali žádné známky B lymfoproliferace.

Charakteristika pacientů souboru I je uvedena v tab. 1. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas v souladu s Etickou komisí FN Brno. Experimenty probíhaly v souladu s Helsinskou deklarací.

Tab. 1: Charakteristika souboru pacientů použitého pro navržení 8-FCM panelu MCL MRD (soubor I)

Pacienti, n	30	
Muži:ženy	17:13	
Medián věku (rozmezí)	68 let	(45-91 let)
Modifikované Matutesovo skóre¹³⁴		
Skóre 1, n	7	(23 %)
Skóre 2, n	19	(63 %)
Skóre 3, n	4	(13 %)
Vzorky		
PK, n	30	
Zdravé kontroly, n	28	
Muži:ženy	13:15	
Medián věku (rozmezí)	41	(28-81 let)
Vzorky		
PK, n	20	
KD, n	5	
LU, n	3	

Vysvětlivky: 8-FCM, osmibarevná průtoková cytometrie; KD, kostní dřeň; LU, lymfatická uzlina; MCL, lymfom z pláštěvých buněk; MRD, minimální reziduální nemoc; n, počet; PK, periferní krev.

Charakteristika souboru II: Tento soubor zahrnoval skupinu 109 pacientů s diagnózou MCL léčených na IHOK FN Brno. U tohoto souboru byla monitorována hladina MRD metodou RQ-PCR a/nebo 8-FCM panelem MCL MRD. Charakteristika pacientů souboru II shrnuje tab. 2.

Tab. 2: Charakteristika souboru pacientů s MCL s monitorovanou hladinou MRD (soubor II)

Pacienti, n	109	
Muži:ženy	66:43	
Medián věku při diagnóze (rozmezí)	65 let	(25-83 let)
muži	64 let	(25-83 let)
ženy	66 let	(48-83 let)
Klinické stádium během stanovení diagnózy		
Stádium I, n	1	(1 %)
Stádium II, n	6	(6 %)
Stádium III, n	4	(4 %)
Stádium IV, n	97	(89 %)
Léčebná stratifikace pacientů		
ASCT, n	30	(28 %)
AlloSCT, n	3	(3 %)
Bez Tx, n	76	(70 %)
t(11;14)	94	(86 %)
Vzorky, n	584	
PK, n	430	(74 %)
KD, n	154	(26 %)

Vysvětlivky: AlloSCT, alogenní transplantace krvetvorných buněk; ASCT, autologní transplantace krvetvorných buněk; KD, kostní dřeň; MCL, lymfom z pláštěvých buněk; MRD, minimální reziduální nemoc; n, počet; PK, periferní krev; Tx, transplantace.

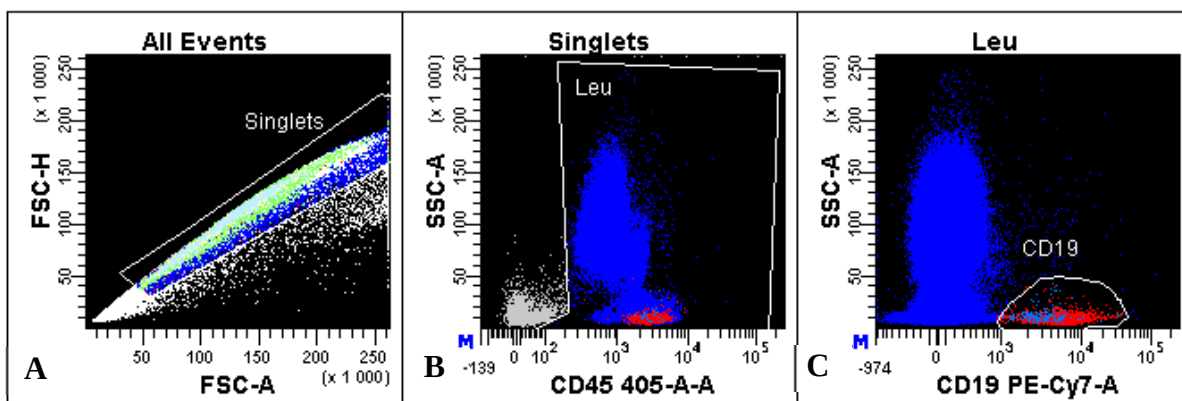
3.2 Analýza metodou průtokové cytometrie

Metodika zpracování metodou průtokové cytometrie byla složena ze dvou kompletních laboratorních postupů skládající se z navržení panelu a následného sledování hladin MRD.

3.2.1 Navržení panelu osmibarevné analýzy pro sledování hladiny MRD u pacientů s MCL

Vzorky ze souboru I odebrané do zkumavek s EDTA byly analyzovány metodou průtokové cytometrie. Celkem bylo na buňkách MCL a normálních B lymfocytech vyšetřeno následujících 24 povrchových antigenů: CD5, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD35, CD38, CD43, CD45, CD62L, CD79b,

CD183, CD184, CD196, CD197 a CD200. Antigeny byly vybrány na základě jejich využití v diagnostice a diferenciální diagnostice B lymfoproliferací, dále byly vybrány některé chemokinové receptory a adhezivní molekuly. Použité monoklonální protilátky jsou podrobně popsány v příložené publikaci (příl. 1, tab. 1). Během přípravy proběhla 15minutová inkubace monoklonálních protilátek se 100 μ l vzorku v temnu při pokojové teplotě, po které byly lyzovány erytrocyty za použití roztoku FACS Lyse (Becton Dickinson, NJ, USA) dle instrukcí výrobce. Vzorky byly následně okoupany ve fosfátovém pufru (PBS). Analýza byla provedena na průtokovém cytometru FACSCantoII se softwarem FACSDiva Software v6.1.3 (Becton Dickinson, NJ, USA). Na populaci B lymfocytů, identifikované na základě antigenů CD45, CD19 a parametru boční rozptyl (SSC) (obr.4), bylo po předchozím odstranění debrisu a doubletů sledováno procentuální zastoupení exprese vybraných znaků společně s jejich průměrnou intenzitou fluorescence (MFI). Hranice positivity sledovaných antigenů byla stanovena pomocí srovnání jejich exprese na T lymfocytech a buňkách MCL.



Obr. 4: Identifikace B lymfocytů průtokovou cytometrií

A Eliminace doubletů a debrisu z analýzy (gate Singlets) **B** Identifikace leukocytů (CD45⁺) ze singletů **C** Identifikace B lymfocytů (CD19⁺) z leukocytů

Vysvětlivky: Leu, leukocyty.

3.2.2 Sledování hladin MRD pomocí 8-FCM panelu MCL MRD

Na základě analýzy souboru I, jejíž metodika je uvedena v kap. 3.2.1 a výsledky v kap. 4.1-4.3 byl navržen 8-FCM panel MCL MRD, pomocí kterého byly monitorovány hladiny MRD u pacientů s MCL léčených na IHOK FN Brno. Vzorky periferní krve (PK) a kostní dřeně (KD) odebrané do zkumavek s EDTA byly inkubovány s koktailem monoklonálních

protilátek používaného v 8-FCM panelu MCL MRD – podrobná charakteristika monoklonálních protilátek je uvedena v tab. 3. Postup zpracování vyšetřovaného materiálu byl totožný s postupem uvedeným v kap. 3.2.1. Analýza byla opět provedena na průtokovém cytometru FACSCantoII se softwarem FACSDiva Software v6.1.3 (Becton Dickinson, NJ, USA). Gateovací strategie je popsána v kap. 4.2. Aby byl dosažen limit detekce 0,02 %, bylo vždy nahráno minimálně 250 tisíc leukocytů, nebo minimálně 50 buněk v gateu MRD. Pokud nebylo možné z připraveného vzorku nahrát požadované množství leukocytů, byla nachystána duplicitní zkumavka, která byla dohrána k již existujícím datům. Kromě počtu nahrených buněk v gateu MRD byl vyhodnocen i vzhled analyzované populace – buňky MCL vytvářejí kompaktní klastr. Podmínky akvizice jsou definovány v tab. 4. Hladiny MRD byly sledovány u jednotlivých pacientů v průběhu indukční fáze a po jejím ukončení, v rámci follow-upu a udržovací terapie v 1-12měsíčních intervalech.

Tab. 3: Seznam použitých monoklonálních protilátek v 8-FCM panelu MCL MRD

Protilátka	Fluorochrom	Klon	Výrobce
anti-CD3	eFluor450	UCHT1	eBioscience (San Diego, CA, USA)
anti-CD5	PerCP-Cy5.5	L17F12	eBioscience (San Diego, CA, USA)
anti-CD19	PE-Cy7	J3-119	Immunotech (Marseille, France)
anti-CD20	FITC	HI47	Invitrogen (Frederick, MD, USA)
anti-CD23	PE	EBVCS-5	BioLegend (San Diego, CA, USA)
anti-CD45	V500	HI30	BD Bioscience (San Jose, CA, USA)
anti-CD62L	APC-eFluor780	DREG-56	eBioscience (San Diego, CA, USA)
anti-CD200	APC	OX104	eBioscience (San Diego, CA, USA)

Vysvětlivky: APC, allophycocyanin; APC-eFluor780, allophycocyanin v tandemu s organickou barvou excitovatelnou červeným laserem; eFluor450, organická barva excitovatelná fialovým laserem; FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin; PE-Cy5, phycoerythrin-cyanin 5; PE-Cy7, phycoerythrin-cyanin 7; PerCP-Cy5.5, peridinin-chlorophyl-proteincomplex-cyanin 5.5; V500, organická barva excitovatelná fialovým laserem.

Tab. 4: Podmínky akvizice pro 8-FCM panel MCL MRD

Gate LEU (počet buněk)	Gate MRD (počet buněk)	Opatření	Vyhodnocení	
			Buňky v gatě MRD tvoří kompaktní klastr	Buňky v gatě MRD netvoří kompaktní klastr (jsou nerovnoměrně rozprostřeny)
250 000	≥50	-	MRD pozitivní	MRD negativní
<250 000	≥50	-	MRD pozitivní	MRD negativní
<250 000 ale >100 000	≥ 20 ale ≤ 50	Přinahrát duplicitní zkumavku	MRD pozitivní	MRD negativní
<100 000	<20	-	Nelze dosáhnout limitu detekce, vzorek je buněčně chudý	

Vysvětlivky: LEU, leukocyty; MRD, minimální reziduální nemoc.

3.3 Analýza metodou RQ-PCR

Detekci hladiny MRD u pacientů s MCL metodou RQ-PCR provádí na našem pracovišti rutinně Mgr. Andrea Marečková. MRD je sledována na vzorcích DNA u PK a KD buď detekcí specifické chromozomální translokace bcl-1/IgH nebo přes klonální přestavbu IgH genu. Ve sledovaném souboru bylo u 36 % pacientů místo zlomu na chromozomu 11 soustředěno v oblasti MTC. V těchto případech bylo postupováno podle dříve publikované metodiky.¹³⁵ U 41 % pacientů, kde byla místa zlomu rozptýlena, byla použita metoda multiplexní long-range PCR k detekci míst zlomů ležících mimo MTC oblast a navržení pacient-specifických detekčních sad pro sledování MRD. U 23 % pacientů byla ke sledování MRD použita detekce klonální přestavby IgH genu. Výsledky byly vyjádřeny jako procentuální zastoupení počtu kopií sledované přestavby z 1 milionu buněk.

3.4 Statistická analýza

Pro porovnání procentuálního zastoupení exprese vybraných CD antigenů na normálních B lymfocytech a buněk MCL byl použit Mann-Whitneyův U test. Další porovnání intenzity exprese mezi oběma skupinami bylo provedeno pomocí Kolmogorovova-Smirnovova (K-S) testu a stanovení hodnoty D.¹³⁶ Hodnota D udává stupeň separace intenzity exprese jednotlivých antigenů mezi normálními B lymfocyty a buňkami MCL. Hodnota 0 vyjadřuje

úplný překryv exprese, hodnota 1 největší možnou separaci. Korelační analýzy byly provedeny pomocí Spearmanova korelačního testu; pro posouzení shody molekulární metody a metody průtokové cytometrie byla využita statistika Cohenovo kappa.

Statistická analýza byla provedena v programech IBM SPSS Statistics (IBM, Armonk, NY, USA), GraphPad Prism (GraphPadd Sofrware, La Jolla, CA, USA) a MS Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA).

4 Výsledky

4.1 Komparace imunofenotypu buněk MCL a zdravých B lymfocytů

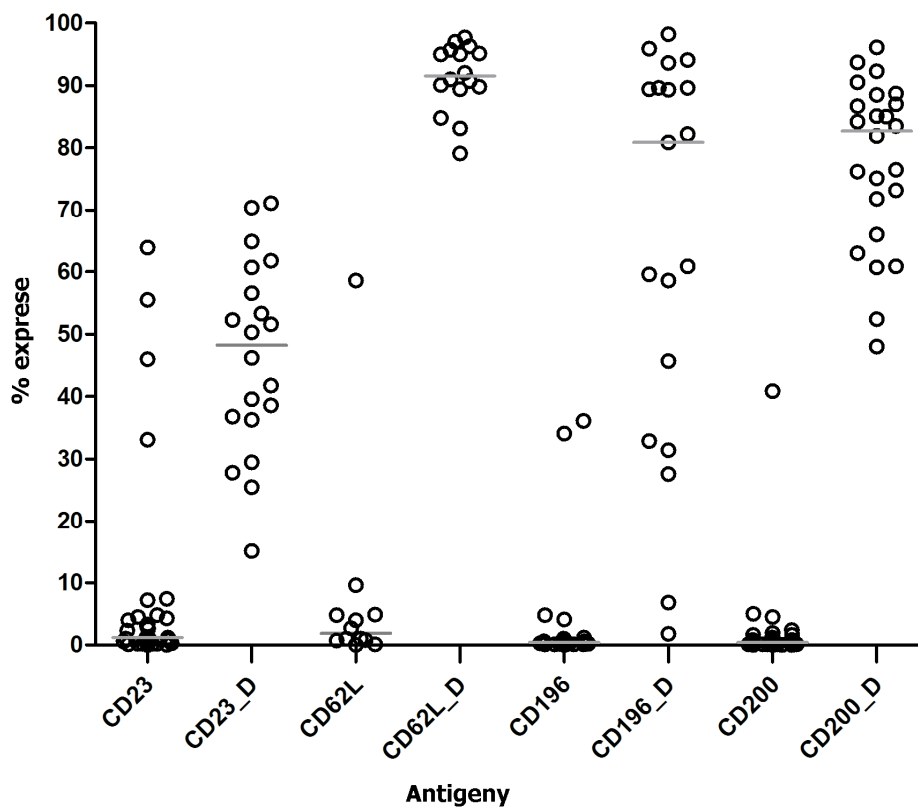
Vyšetřením souboru více jak 20 antigenů byl stanoven imunofenotyp buněk MCL. Zvolená hranice positivity pro všechny antigeny byla 20 %. Znaky CD20, CD21, CD22, CD24, CD27, CD35 a CD79b, typicky exprimované na B lymfocytech, byly pozitivní u více než 70 % vzorků. Všechny vyšetřované vzorky byly CD29 a CD184 pozitivní, a naopak CD28 a CD183 negativní. Jen u dvou různých vzorků byla nalezena pozitivita antigenu CD200 nebo CD62L. Chemokinový receptor CD197 byl pozitivní u více jak 85 % vzorků, na rozdíl od chemokinového receptoru CD196, jehož absence exprese byla prokázána u více jak 90 % vzorků. Negativitu vykazoval u více jak 90 % vzorků antigen CD25. Antigen CD23, obecně využívaný v diagnostice MCL, byl pozitivní u čtyř pacientů. Další čtyři pacienti byli CD10 pozitivní. Podrobná statistika vyšetřovaných CD znaků je uvedena v tab. 5.

Tab. 5: Zastoupení vyšetřovaných CD antigenů na buňkách MCL u vzorků PK

Antigen	% pozitivních vzorků	Medián MFI	Rozmezí MFI
CD10	13.3	270.0	(-1)-1121
CD20	96.7	5846.0	97-14898
CD21	72.4	1607.0	346-4168
CD22	96.7	3052.0	1867-8042
CD23	13.3 (6.6% dim)	230.0	(-96)-1684
CD24	86.6	1847.0	(-64)-5008
CD25	8.7	407.0	72-1003
CD26	13.3	843.0	139-8451
CD27	92.6	2036.0	605-4686
CD28	0.0	32.0	28-86
CD29	100.0	1666.0	323-2437
CD35	86.7	613.0	194-1515
CD38	72.4	357.5	(-268)-10899
CD43	36.6 (33.3% dim)	227.0	(-191)-1531
CD62L	3.3	570.0	44-1907
CD79b	91.3	2863.0	406-15338
CD183	0.0	79.5	(-317)-316
CD184	100.0	5143.0	1321-9899
CD196	7.4	263.0	40-735
CD197	85.2	1232.0	215-5490
CD200	3.3	105.0	(-235)-720

Při komparaci procentuálního zastoupení vybraných CD antigenů na maligních buňkách a zdravých B lymfocytech byly nalezeny statisticky signifikantní rozdíly u čtyř CD znaků, a to u CD23, CD62L, CD196 a CD200. Expres těchto antigenů byla na buňkách MCL

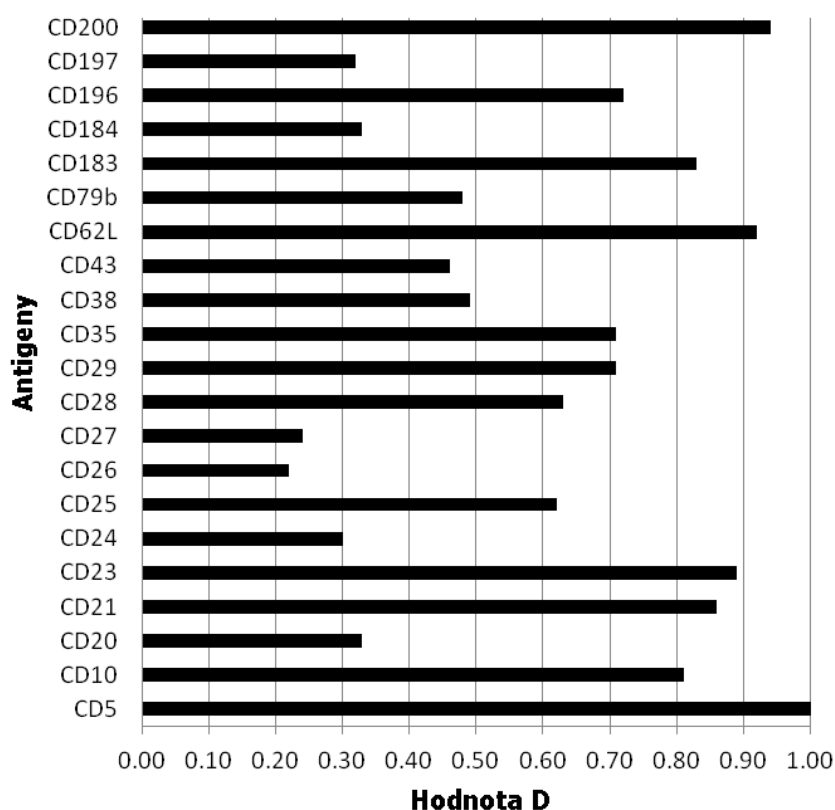
v porovnání se zdravými kontrolami signifikantně nižší ($p < 0,001$). Grafické znázornění je uvedeno na obr. 4.



Obr. 5: Procentuální zastoupení vybraných antigenů na buňkách MCL a zdravých kontrolách

Vysvětlivky: Antigeny doplněné písmenem D označují normální B lymfocyty, antigeny bez doplnění vyjadřují MCL buňky.

V dalším kroku byly porovnány hodnoty MFI u obou vyšetřovaných skupin vzorků pomocí K-S testu a byla stanovena hodnota D. Exprese všech analyzovaných antigenů vykazovala u obou skupin určitou míru překryvu. Výjimkou byl antigen CD5, u kterého byly do studie zařazeny pouze $CD5^+$ pacienti s MCL, byla nalezena 100% separace exprese u srovnávaných vzorků. Nejlepší separace ($D > 0,88$) byla zjištěna u antigenů CD23, CD62L a CD200. Hodnoty D pro celý soubor vyšetřovaných znaků jsou uvedeny na obr. 5.



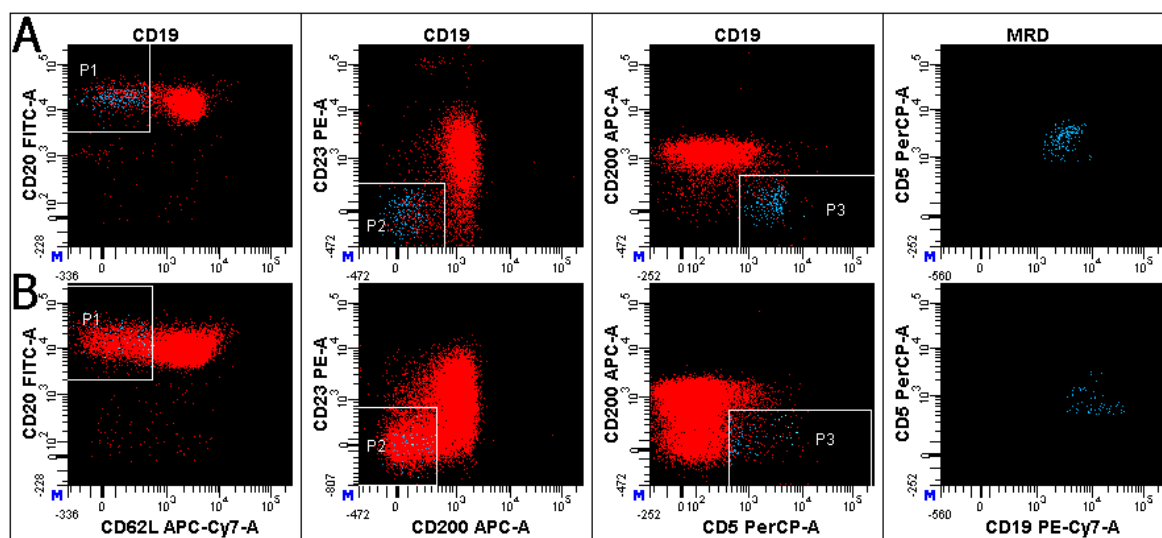
Obr. 6: Kolmogorovův-Smirnovův statistický test – hodnoty D

Hodnoty D vyjadřují stupeň separace v expresi jednotlivých CD znaků mezi buňkami MCL a normálními B lymfocyty (0 – úplný překryv; 1 – úplná separace).

4.2 Stanovení kombinace antigenů vhodné pro detekci MCL MRD

Vzhledem ke značné variabilitě imunofenotypu MCL nebylo možné definovat samostatný antigen, který by umožnil rozlišení zdravých B lymfocytů od maligních buněk. Z těchto důvodů byla vybrána kombinace antigenů CD5/23/62L/200, u nichž byly použitím K-S testu zjištěny nejvýraznější rozdíly v expresi u maligních a zdravých B lymfocytů. K výše zmíněným antigenům byly přidány B lymfocytární znaky CD19 a CD20, panleukocytární znak CD45 a T lymfocytární znak CD3. Na sedmi vzorcích PK s diagnózou MCL byly nastaveny gaty P1 (dot plot CD20 versus CD62L), P2 (dot plot CD23 versus CD200) a P3 (dot plot CD200 versus CD5), které obsahovaly více jak 95 % buněk MCL. Tyto gaty byly následně aplikovány na sedm vzorků PK od zdravých kontrol. Stejný postup byl zvolen i pro pět vzorků KD s diagnózou MCL a pět vzorků KD od zdravých kontrol. Dále byla gaty P1-P3 aplikovány na tři MCL negativní vzorky lymfatických uzlin. Ze získaných dat bylo vypočítáno procentuální zastoupení buněk s typickým imunofenotypem MCL ($CD5^+19^+20^+23^+62L^+200^-$) (příl. 1, tab. 3). Jak ve vzorcích PK tak KD byla identifikována

populace B lymfocytů s nízkou expresí znaků CD23 a CD200, která by při stanovování hladiny MRD mohla vést hlavně k falešně pozitivním výsledkům; analýza vzorků od zdravých kontrol potvrdila nutnost zařadit do vyšetření antigen CD20, pomocí kterého jsou definovány zralé B lymfocyty. Antigen CD3 byl použit pro eliminaci kontaminujících T lymfocytů z analýzy. Ačkoliv byly v gatech P1, P2 nebo P3 nalezeny normální B lymfocyty, tyto buňky netvořili kompaktní klastry, tudíž by vzorky nemohly být označeny za pozitivní. Grafické porovnání MRD pozitivního a negativního vzorku je znázorněno na obr. 7.

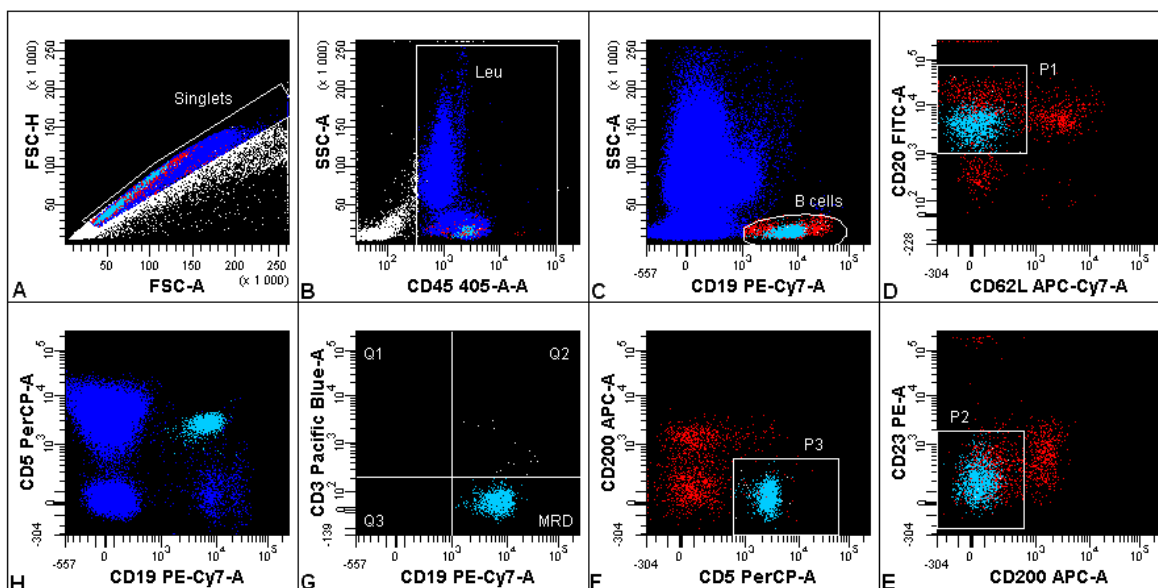


Obr. 7: Grafické porovnání MRD pozitivního a negativního výsledku analyzovaného pomocí 8-FCM panelu MCL MRD

A MRD pozitivní vzorek – populace MCL (modrá populace) tvoří kompaktní klastr; **B** MRD negativní vzorek – populace fenotypu MCL (modrá populace) netvoří kompaktní klastr, buňky jsou roztroušeny

Vysvětlivky: 8-FCM, osmibarevná průtoková cytometrie; MCL, lymfom z pláštěvé zóny; MRD, minimální reziduální nemoc.

Kompletní navrhovaný 8-FCM panel MCL MRD je uveden v tab. 2 a také v příložené publikaci (příl. 1, tab. 4). Gateovací strategie 8-FCM panelu MCL MRD je znázorněna na obr. 8.



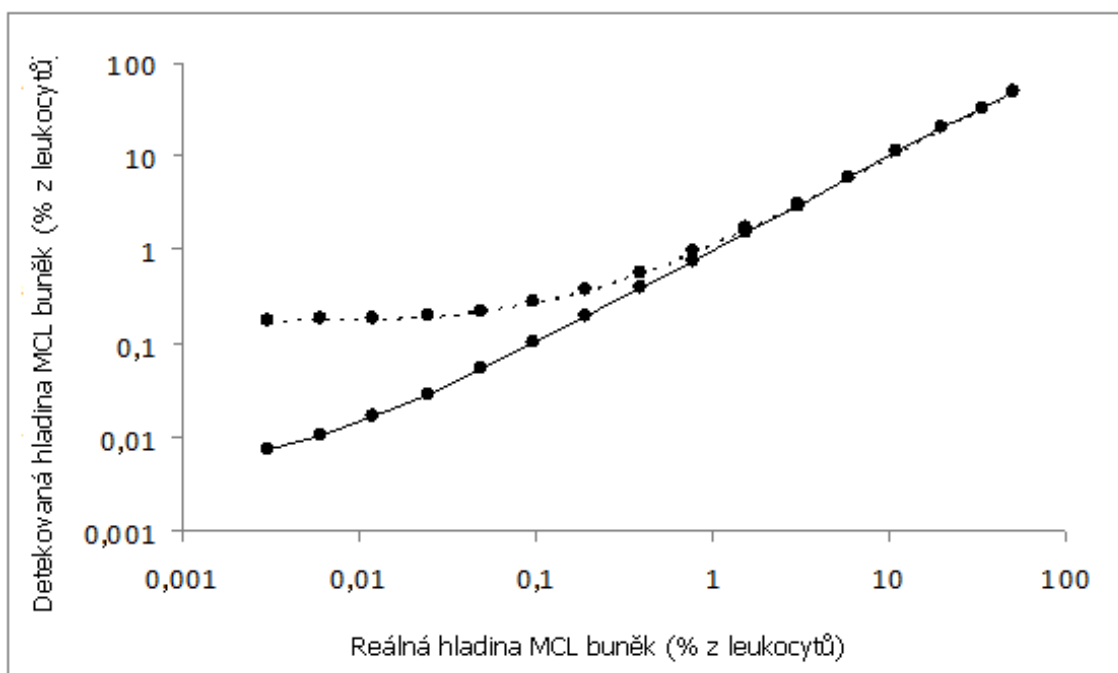
Obr. 8: Gateovací strategie použitá v 8-FCM panelu MCL MRD

A Odstranění doubletů a debrisu z analýzy; **B** Identifikace leukocytů (CD45 versus SSC) z gatů „Singlets“; **C** Identifikace B lymfocytů z leukocytů (CD19 versus SSC); **D** Gate P1 (buňky $CD20^{+}62L^{-}$ z B lymfocytů); **E** Gate P2 (buňky $CD23^{-}200^{-}$ z B lymfocytů); **F** Gate P3 (buňky $CD200^{+}5^{+}$ z B lymfocytů); **G** Odstranění kontaminujících $CD3^{+}$ buněk z průniku gatí P1, P2 a P3; hladina MRD (kvadrant MRD) je 0,58 % z leukocytů; **H** MRD populace (světle modrá) v kontextu všech lymfocytů.

Vysvětlivky: 8-FCM, osmibarevná průtoková cytometrie; MCL, lymfom z pláštěvé zóny; MRD, minimální reziduální nemoc; SSC, boční rozptyl.

4.3 Stanovení senzitivity navrhovaného panelu pro detekci MRD u MCL

Ke stanovení senzitivity navrhovaného 8-FCM panelu MCL MRD bylo použito virtuální sériové ředění. Diluční křivky byly sestaveny na základě dat získaných z virtuální diluční řady, k čemuž byl použit FCSExpress Software (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA), který umožňuje propojení dat z více FCS souborů a jejich následnou analýzu. Různé počty buněk, simulující dvojnásobnou ředící řadu od 1:1 po 1:16 384, s typickým MCL imunofenotypem od tří pacientů byly kombinovány se souborem dat zdravé PK a byla použita dvojí gateovací strategie: (1) 3-barevná analýza (3-FCM) kombinující antigeny CD5/19/45 a (2) 8-FCM panel MCL MRD. U 3-FCM bylo vypočítáno procentuální zastoupení populace buněk koexprimujících znaky CD5 a CD19 z populace leukocytů. U 8-FCM panelu MCL MRD bylo z populace leukocytů vypočítáno procentuální zastoupení buněk s typickým imunofenotypem MCL $CD5^{+}19^{+}20^{+}23^{-}62L^{-}200^{-}$. Výsledky obou měření byly porovnány s reálným zastoupením buněk MCL ve vzorku. Výsledky diluční studie jsou shrnuty v tab. 4; diluční křivky jsou zobrazeny na obr. 9.



Obr. 9: Reprezentativní diluční křivky znázorňující senzitivitu 3-FCM versus 8-FCM panelu MCL MRD

Diluční studie ukazuje zvyšující se senzitivitu 8-FCM panelu MCL MRD v porovnání s 3-FCM (CD5/19/45) ve vzorcích PK. Graf vyjadřuje procentuální zastoupení MCL buněk detekovaných pomocí 3-FCM (tečkovaná čára) a pomocí 8-FCM panelu MCL MRD (plná čára) proti reálné hladině MCL buněk v měřeném vzorku.

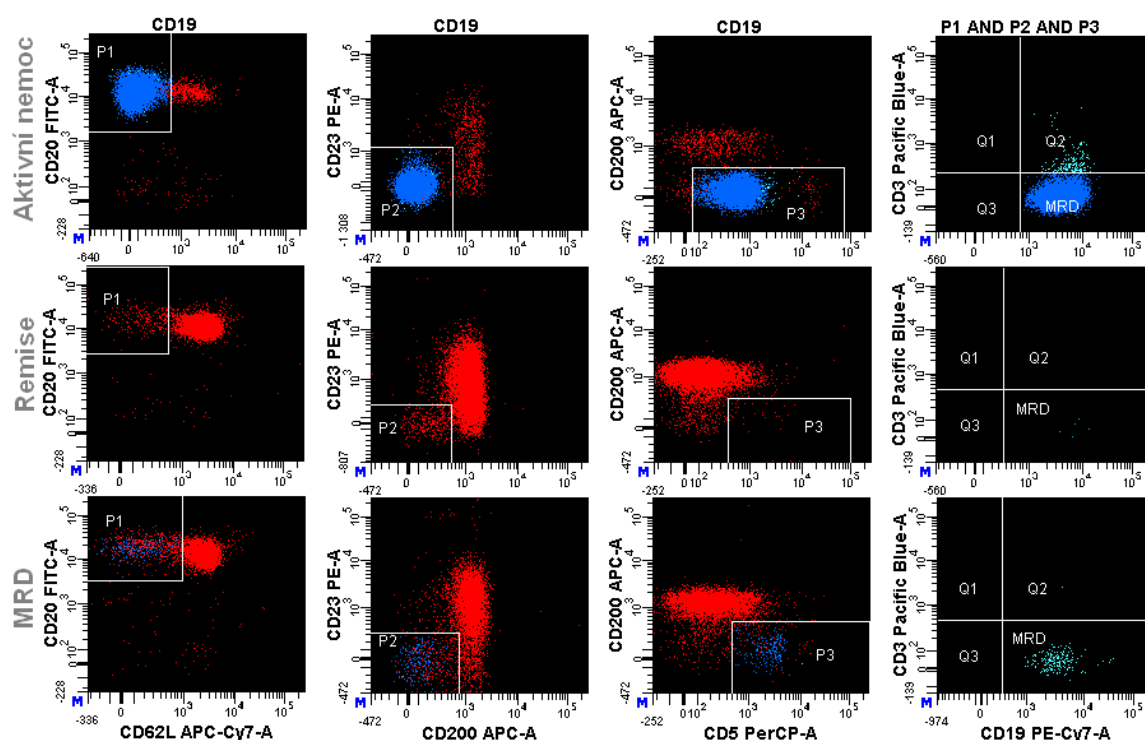
Vysvětlivky: 3-FCM, tříbarevná průtoková cytometrie (CD5/19/45); 8-FCM, osmibarevná průtoková cytometrie, MCL, lymfom z plášťových buněk; MRD, minimální reziduální nemoc; PK, periferní krev.

Z naměřených dat je patrné, že detekce 8-FCM panelem MCL MRD je o téměř 2 řády citlivější. Vyčíslení buněk MCL pouhým vyjádřením zastoupení $CD5^{+}19^{+}$ populace se stává více nepřesným zejména při výskytu malého množství patologických buněk vzhledem k normálnímu výskytu $CD5^{+}$ B lymfocytů ve vzorcích, což dokazuje i měření procentuálního zastoupení $CD5^{+}19^{+}$ buněk ve zdravých kontrolách (příl. 1, tab. 3). Ve vzorcích PK bylo detekováno až 4,8 % a ve vzorcích KD až 3,3 % těchto buněk (měřeno z leukocytů). Pro dosažení limitu detekce 0,02 % je třeba analyzovat minimálně 250 tisíc leukocytů nebo minimálně 50 buněk populace MRD. Navrhovaná gateovací strategie pro panel MCL MRD je zobrazena na obr. 8. Ačkoliv se v gatech P1, P2 a P3 vyskytují i normální B lymfocyty (obr. 7), tyto buňky na rozdíl od buněk MCL netvoří kompaktní klastry, tudíž nesplňují podmínky pro patologickou populaci. Porovnání aktivního MCL, MCL v remisi a MRD je zobrazeno na obr. 10.

Tab. 6: Nejnižší procentuální zastoupení buněk MCL ve vzoru identifikující pozitivní výsledek MRD

	3-FCM	8-FCM
Detekce buněk MCL	CD5 ⁺ 19 ⁺	CD5 ⁺ 19 ⁺ 20 ⁺ 23 ⁻ 62L ⁻ 200 ⁻
Medián % z leu (rozmezí)	0,2 (0,2 - 1,4)	0,008 (0,004 - 0,017)

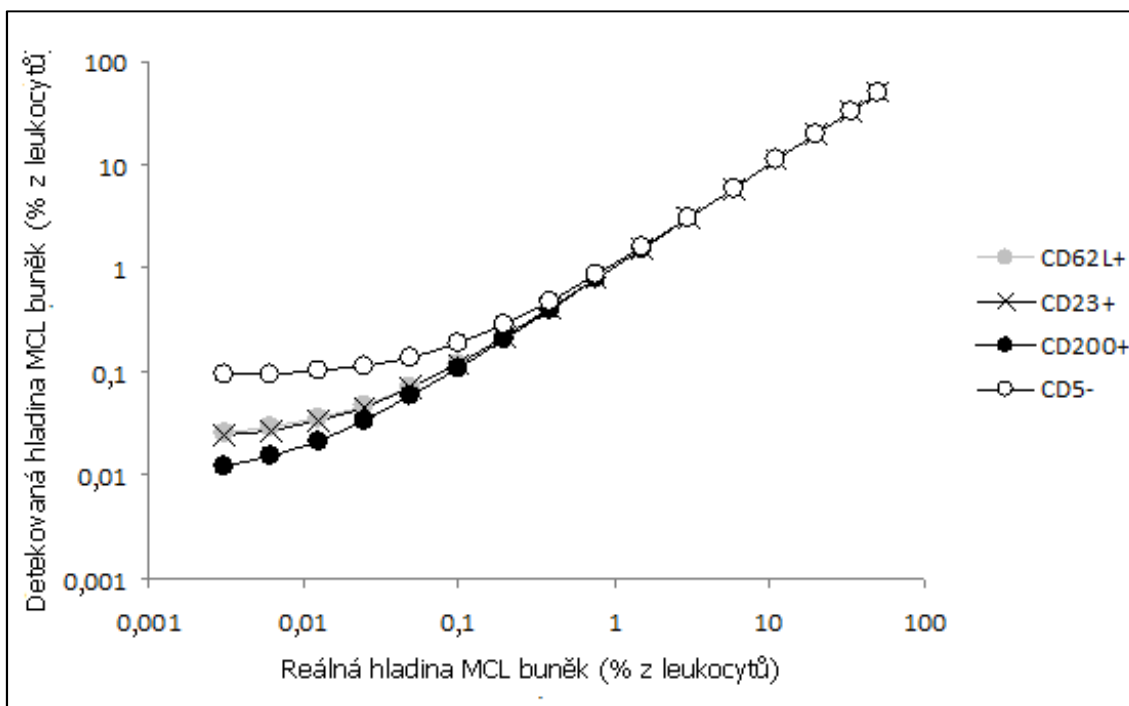
Vysvětlivky: leu, leukocyty; MCL, lymfom z pláštěvé zóny; 3-FCM, tříbarevná průtoková cytometrie; 8-FCM, osmibarevná průtoková cytometrie



Obr. 10: Porovnání aktivní nemoci, remise a MRD detekovaných pomocí 8-FCM panelu MCL MRD

Vysvětlivky: 8-FCM, osmibarevná průtoková cytometrie; MCL, lymfom z pláštěvé zóny; MRD, minimální reziduální nemoc.

Limitujícím faktorem pro univerzální použití 8-FCM panelu MCL MRD je variabilita imunofenotypu lymfomu. Ke stanovení senzitivity panelu pro atypické imunofenotypy, tedy u vzorků, u kterých byla detekována vysoká exprese antigenu CD23, CD62L nebo CD200 nebo nízká exprese antigenu CD5, bylo postupováno stejným způsobem jako u vzorků s typickým imunofenotypem. Diluční křivky jsou znázorněny na obr. 11.



Obr. 11: Reprezentativní diluční křivky znázorňující senzitivitu 8-FCM panelu MCL MRD u pacientů s atypickým fenotypem.

Vysvětlivky: 3-FCM, tříbarevná průtoková cytometrie (CD5/19/45); 8-FCM, osmibarevná průtoková cytometrie, MCL, lymfom z plášťových buněk; MRD, minimální reziduální nemoc; PK, periferní krev.

Z naměřených dat je patrné, že citlivost vyšetření pro variabilní imunofenotyp je, až na případy CD5⁻, srovnatelná s typickým imunofenotypem MCL. 8-FCM panel MCL MRD sice pro případy s imunofenotypem CD5⁻ vykazuje o řád nižší citlivost, ale v porovnání s 3-FCM analýzou je stále citlivější.

4.4 Detekce hladiny MCL MRD pomocí 8-FCM protokolu

Hladina MCL MRD byla sledována u 99 pacientů – celkem bylo vyšetřeno 525 vzorků (129 vzorků PK, 396 vzorků KD). Atypický fenotyp MCL byl identifikován u 8 pacientů (8 %). Nejvíce těchto případů (5 pacientů) byla CD5 negativní. Atypická pozitivní exprese znaku CD23, CD62L a CD200 byla přítomna vždy pouze u jednoho pacienta. Navíc znak CD200 byl v daném případě hyperexprimován, což nebránilo odlišení buněk MCL od normálních B lymfocytů, protože pro normální B lymfocyty je charakteristická dimová exprese CD200. Hladina MRD pod limitem detekce (< 0,02 % buněk MCL z leukocytů) byla naměřena u 419 (80 %) vzorků (321 PK, 98 KD). Pozitivní MRD bylo naměřeno u 106 (20 %) vzorků (75 PK, 31 KD): u 26 vzorků byla hladina MRD mezi 0,02-0,09 %, u 37 vzorků mezi 0,1-

0,9%, u 29 vzorků mezi 1,0-9,9 % a u 14 vzorků nad 10,0 % (vše vyjádřeno jako % buněk MCL z leukocytů).

4.5 Komparace metod 8-FCM a RQ-PCR

Pro vyhodnocení klinického významu 8-FCM panelu MCL MRD při stagingu nemoci bylo porovnáno 34 vstupních diagnostických vzorků (18 vzorků PK a 16 vzorků KD) od 28 pacientů, a to metodou RQ-PCR a 8-FCM. Při komparaci obou metod byla nalezena více jak 97% shoda. Celkem u 31 vzorků (91,2 %) byla detekována přítomnost buněk MCL při měření oběma metodami, zatímco u 2 vzorků (5,9 %) nebyla ani jednou metodou zjištěna infiltrace lymfomem. Pouze 1 vzorek byl pomocí 8-FCM vyhodnocen jako negativní, ačkoliv metodou RQ-PCR byla detekována přítomnost buněk MCL (tab. 7), i když pouze v nízkém procentu (0,051 %). Medián hladiny infiltrace u pozitivních vzorků měřených metodou 8-FCM byl 24,9 % z leukocytů (rozmezí 0,06-82,6). U pozitivních vzorků nad hladinou kvantifikovatelnosti metodou RQ-PCR byl medián 11,3 % (rozmezí 0,05-100,0); 2 vzorky byly vyhodnoceny jako pozitivní, ovšem pod hladinou kvantifikovatelnosti. Hladina infiltrace metodou 8-FCM u těchto 2 vzorků byla 0,06 % a 82,6 % z leukocytů.

Tab. 7: Komparace výsledků vstupních diagnostických vyšetření měřených pomocí 8-FCM versus RQ-PCR

		8-FCM	
		pozitivní (%)	negativní (%)
RQ-PCR	pozitivní (%)	31 (91,2)	1 (2,9)
	negativní (%)	0 (0,0)	2 (5,9)
Celkem (n)		34	

Vysvětlivky: 8-FCM, osmibarevná průtoková cytometrie; n, počet; RQ-PCR, kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Dále byla provedena komparace obou metod u výsledků MRD. Do analýzy byly zahrnuty vzorky, u nichž byly pomocí 8-FCM protokolu MCL MRD detekovány hladiny MRD pod 5 % z leukocytů. Celkem bylo vyšetřeno 411 vzorků (300 vzorků PK a 111 vzorků KD) od 75 pacientů.

Při komparaci metod 8-FCM a RQ-PCR byla zjištěna shoda ve výsledcích u více jak 80 % vzorků (Cohenovo kappa 0,5; $p < 0,05$): celkem 65 % vzorků bylo MRD negativních a 15 % MRD pozitivních. Rozdíly ve výsledcích obou metod byly zjištěny u necelé pětiny případů.

Podle očekávání byla 8-FCM metoda méně senzitivní, tudíž přibližně 19 % vzorků bylo označeno za negativní, ačkoliv pomocí RQ-PCR u nich byla zjištěna přítomnost MRD. U 80 % z těchto případů (63 vzorků) se jednalo o extrémně nízké hladiny kopií detekovaných pomocí RQ-PCR, které nebyly přesně kvantifikovány. U zbylých 20 % (16 vzorků) se hodnoty RQ-PCR pohybovaly v rozmezí 0,002-0,380 % (medián 0,006). Pouze 3 vzorky, které byly pomocí RQ-PCR pozitivní, ale pod hladinou kvantifikovatelnosti, byly pozitivní i metodou 8-FCM s hodnotami na hranici limitu detekce (0,020 %). Negativní výsledky 8-FCM byly v 47 % případů detekovány v průběhu terapie, na konci terapie nebo v časovém úseku 1-5 měsíců od ukončení terapie. Při hlubší analýze nesouhlasných výsledků bylo zjištěno, že u více jak poloviny vzorků (54 %) nebylo možné metodou průtokové cytometrie identifikovat žádné, nebo pouze velmi nízké zastoupení B lymfocytů (0,0-0,9 % CD19⁺ buněk; měřeno z leukocytů). U 28 % případů s neshodným výsledkem byl metodou RQ-PCR odhalen molekulární relaps onemocnění. Pokud v těchto případech nebyla zahájena preemptivní terapie anti-CD20 monoklonální protilátkou rituximab, a průběh nemoci byl nadále pouze sledován bez terapeutické intervence, detekovalo následné kontrolní vyšetření během 1-5 měsíců pozitivní hladiny MRD i metodou 8-FCM. Ve 14 % případů se jednalo o klinický relaps lokalizovaného charakteru (výjimkou byl jeden pacient ve stádiu IV). Zbylé případy (11 %) tvořily vzorky, u kterých následné kontrolní vyšetření relaps onemocnění nepotvrdilo, a výsledky měřené oběma metodami byly negativní.

Ve dvou případech (0,5 % všech vzorků) byly vzorek pomocí 8-FCM označeny za pozitivní, ovšem vyšetření RQ-PCR přítomnost MRD nepotvrdilo (u obou vzorků šlo o velmi nízkou hladinu MRD, konkrétně 0,045 % z leukocytů). Jednalo se o jeden vzorek PK a jeden vzorek KD od dvou různých pacientů. U jednoho pacienta byl o 3 týdny dříve metodou RQ-PCR v PK detekován molekulární relaps a následně při kontrolním vyšetření v průběhu preemptivní léčby rituximabem byla detekována pozitivita metodou 8-FCM, ačkoliv RQ-PCR bylo negativní. Další kontrolní vyšetření 3 měsíce po ukončení léčby potvrdilo negativní MRD výsledek u obou metod. U druhého pacienta došlo po 8 měsících k relapsu onemocnění (pozitivita u obou metod). Souhrn výsledků komparace 8-FCM a RQ-PCR metod uvádí tab. 8 a obr. 12.

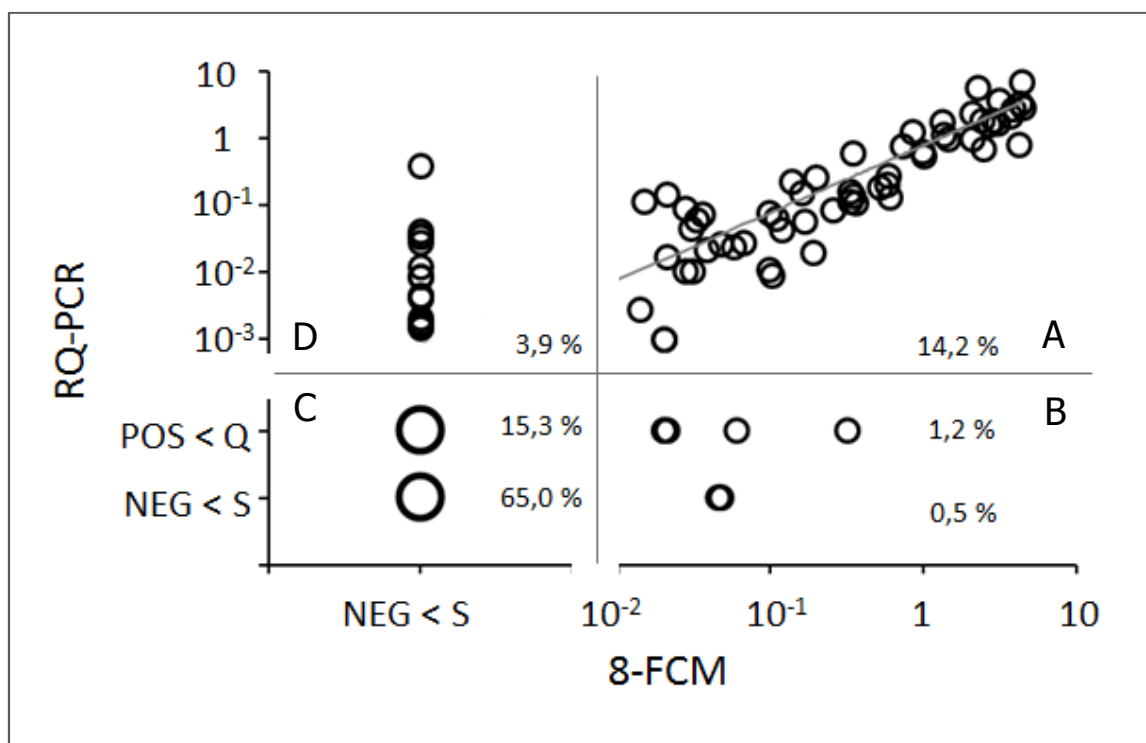
Tab. 8: Komparace výsledků hladiny MRD měřených pomocí 8-FCM versus RQ-PCR

		8-FCM	
		MRD pozitivní (%)	MRD negativní (%)
RQ-PCR	MRD pozitivní (%)	63 (15,3)	79 (19,2)
	MRD negativní (%)	2 (0,5)	267 (65,0)
Celkem (n)		411	

Vysvětlivky: 8-FCM, osmibarevná průtoková cytometrie; MRD, minimální reziduální nemoc; n, počet; RQ-PCR, kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

U 74 vzorků s kvatifikovatelným pozitivním výsledkem MRD pomocí RQ-PCR a pozitivním nebo negativním výsledkem MRD pomocí 8-FCM byla nalezena silná korelace ($r_s = 0,89$; $p < 0,01$). Metoda RQ-PCR je ovšem více citlivá v případech, kdy je detekována pouze velmi nízká hladina positivity.

Z analyzovaných dat vyplývá, že terapeutické protokoly obsahující rituximab, jakožto anti-CD20 monoklonální protilátku, vedou k hluboké depleci benigních i maligních B lymfocytů, což se jeví jako limitující faktor použití 8-FCM panelu MCL MRD. Analýza MRD je ve většině případů možná až po ukončení terapie a následné obnově hladiny B lymfocytů.



Obr. 12: Komparace výsledků detekce MRD mezi 8-FCM a RQ-PCR metodou.

Jednotlivé vzorky jsou zastoupeny kružnicemi. Větší kružnice reprezentují skupinu vzorků. Graf je rozdělen do čtyř kvadrantů: **A** Konkordance párových pozitivních hodnot MRD; **B**

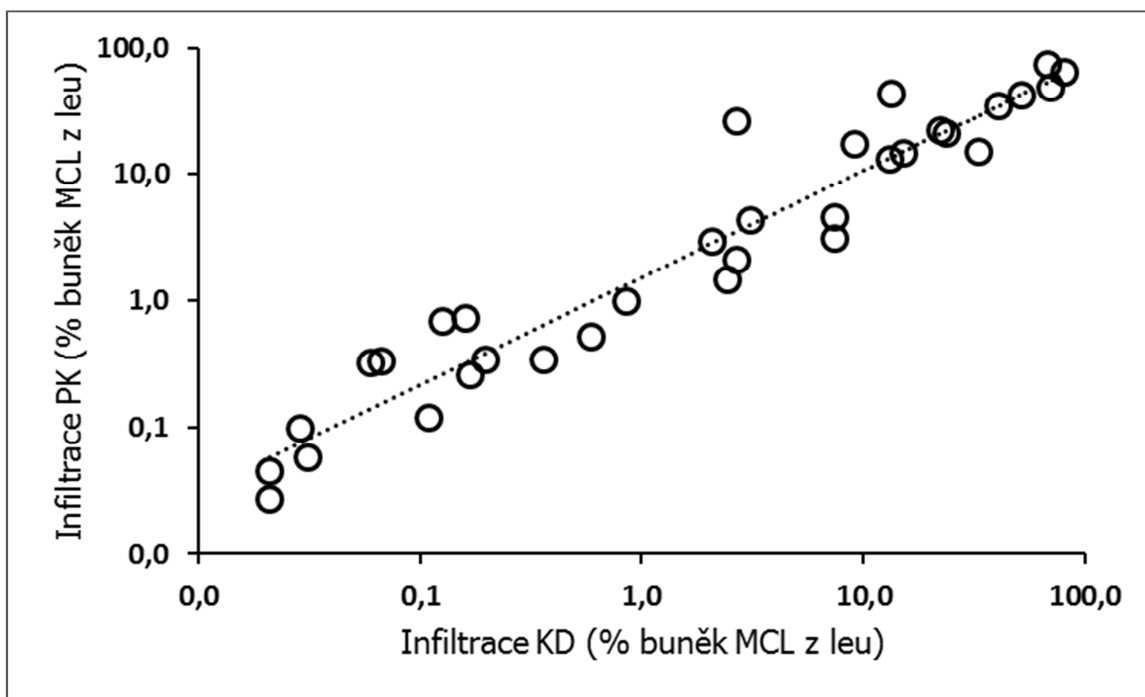
Vzorky, které byly pomocí 8-FCM označeny za pozitivní ($\geq 2 \times 10^{-2}$), ale pomocí RQ-PCR za negativní nebo pod hranicí limitu kvantifikovatelnosti (Q); **C** Vzorky, které byly označeny pomocí RQ-PCR za pozitivní pod limitem kvantifikovatelnosti, ale pomocí 8-FCM za negativní ($\leq 2 \times 10^{-2}$), a vzorky, které byly pomocí RQ-PCR i 8-FCM označeny za negativní (pod limitem detekce); **D** Vzorky, které byly pomocí 8-FCM označeny za negativní, ale pomocí RQ-PCR pozitivní nad hladinou kvantifikovatelnosti.

Vysvětlivky: 8-FCM, osmibarevná průtoková cytometrie; NEG<S, pod limitem detekce; POS<S, pod limitem kvantifikace; RQ-PCR, kvantitativní řetězová polymerázová reakce v reálném čase

4.6 Komparace hladiny MCL buněk u párových vzorků PK a KD měřených metodou 8-FCM

Pro ověření, do jaké míry je výsledek stanovení MRD ovlivněn typem vyšetřených vzorků, byly do analýzy zahrnuty párové vzorky PK a KD. Celkem bylo vyšetřeno 86 párových vzorků (15 vstupních vzorků, 71 vzorků v průběhu léčby a po léčbě) od 49 pacientů.

Pozitivita byla nalezena u 33 párových vzorků (38,4 %) na rozdíl od 2 případů, u kterých byly PK pozitivní, zatímco k nim příslušné vzorky KD byly negativní (2,3 %). Jednalo se o nízké hladiny MRD pod 0,5 % MCL buněk z leukocytů. V 51 případech (59,3 %) neprokázala analýza přítomnost buněk MCL ve vzorcích PK ani ve vzorcích KD. Pokud byly brány v úvahu pouze vstupní vzorky, byla u 14 případů (93,3 %) prokázána přítomnost buněk MCL jak u PK tak KD; v 1 případě (6,7 %) nebyla zjištěna infiltrace PK ani KD. U vzorků PK a k nim korespondujícím pozitivním vzorkům KD byla nalezena velmi silná pozitivní korelace v hladině infiltrace MCL buňkami ($r_s = 0,95$; $p < 0,0001$) (obr. 5).



Obr. 13: Komparace hladin infiltrace MCL buňkami u vzorků PK a KD

Na osách x a y je vyneseno procentuální zastoupení buněk MCL (měřeno z leukocytů), které bylo u analyzovaných párových vzorků detekováno pomocí 8-FCM panelu MCL MRD. Jednotlivé párové vzorky jsou vyjádřeny kružnicemi.

Vysvětlivky: KD, kostní dřeň; leu, leukocyty; MCL, lymfom z pláštěvých buněk; PK, periferní krev

Velmi silná korelace hladin infiltrace buňkami MCL v PK a KD naznačuje, že pro vstupní staging onemocnění a monitorování MRD u pacientů po léčbě by mohlo být dostačující vyšetření PK pomocí senzitivního 8-FCM protokolu MCL MRD.

5 Diskuze

Sledování MRD je v současnosti nedílnou součástí terapeutických protokolů hematologických malignit. Uplatňuje se při stanovení prognózy onemocnění a stratifikaci pacientů do jednotlivých terapeutických režimů.^{119,125,128} U MCL umožňuje časná detekce molekulárního relapsu zahájení preemptivní léčby, což ve většině případů vede k opětovnému navození molekulární remise, a tedy výrazně snižuje riziko klinického relapsu.¹²⁰ Zlatým standardem pro sledování MRD je u MCL¹²⁴ i dalších hematologických malignit vysoce citlivá PCR metoda, která je laboratorně i časově velmi náročná, a proto je doplňována průtokovou cytometrií.^{131,133,137} Výhody průtokové cytometrie spočívají v rychlé analýze (výsledky mohou být k dispozici v řádu hodin od dodání vzorku do laboratoře) a nízkých finančních nákladech. V porovnání s RQ-PCR je její nevýhodou nižší citlivost metody. V této disertační práci byl vytvořen osmibarevný jednozkumavkový panel průtokové cytometrie, který umožňuje detekci MRD u diagnózy MCL.

Vyšetření širokého spektra více než 20 antigenů umožnilo popsat podrobný imunofenotyp buněk MCL a identifikovat markery, jejichž míra exprese se nejvíce liší od exprese na normálních B lymfocytech. Z rozsáhlého souboru antigenů byly pomocí Kolmogorova-Smirnovova statistického testu jako nejvhodnější označeny antigeny CD5, CD23, CD62L a CD200. K přesné identifikaci B lymfocytů byly do analýzy přidány antigeny CD19 a CD20, dále panleukocytární antigen CD45 a antigen CD3, který umožňuje přesnější definování B lymfocytů na základě eliminace T lymfocytů z analýzy.

Absence exprese antigenu CD200 byla prokázána u více jak 96 % pacientů s MCL, což potvrzuje závěry předchozí studie o možnosti jeho využití v diferenciální diagnostice k odlišení MCL od CLL⁷⁵ a nově i k odlišení buněk MCL od zdravých B lymfocytů. Tím plní funkci spolehlivého markeru pro stanovení hladin MRD u MCL.

Významnou roli při diagnostice MCL hraje i antigen CD23, ačkoliv jeho exprese je do jisté míry variabilní. Výsledky této práce popisují 13 % pacientů s expresí CD23⁺ nebo CD23^{dim}, což koresponduje s dosud publikovanými studiemi,^{68,138,139} kde byla pozitivita antigenu CD23 detekována pomocí průtokové cytometrie nebo imunohistochemie v rozmezí od 21 do 45 %. I přes tyto výsledky se CD23 stále využívá jako užitečný marker v diferenciální diagnostice MCL a bližší analýza prokázala, že i u stanovení hladin MRD plní nezastupitelnou funkci.

Podobně jako antigen CD200 i u antigenu CD62L byla prokázána nízká míra variability exprese. Negativita znaku CD62L byla detekována u více jak 96 % analyzovaných pacientů s MCL, což umožnilo jeho zařazení mezi markery vhodné ke sledování hladiny MRD a potvrdilo výsledky dalších studií.^{140,141}

Dříve publikované práce^{142,143} popisují antigen CD43 jako aberantní znak u MCL i u CLL. U CLL byl antigen CD43 zařazen do standardizovaného panelu pro detekci MRD průtokovou cytometrií.¹³¹ Lai a kol.¹⁴² provedl na vzorcích zalitých v parafínu imunohistochemickou analýzu exprese antigenu CD43 u 71 pacientů s MCL a detekoval pozitivitu u 94 % případů. K podobný závěrům dospěly i další studie, ve kterých byl antigen CD43 detekován u více jak 80 % případů MCL.^{143,144} V této práci vykazovaly téměř dvě třetiny vzorků negativitu antigenu CD43. Příčiny diskrepancí mohou pramenit z použití různých metod, ačkoliv de Leon a kol.¹⁴⁴ porovnával imunohistochemické barvení B-NHL vzorků zalitých do parafínu s průtokovou cytometrií a výsledky označil za srovnatelné, nebo z analýzy různých typů tkání, kdy PK v porovnání s lymfoidní tkání může vykazovat nižší expresi CD43. Dalším faktorem ovlivňující výslednou analýzu exprese CD43 může být zvolený fluorochrom konjugovaný s monoklonální protilátkou. Pro účely této práce byl použit fluorochrom Pacific BlueTM, který se obecně řadí mezi fluorochromy s nižší relativní intenzitou.

Pro MCL buňky je podobně jako pro CLL charakteristická koexprese znaků CD5 a CD19, ovšem vzhledem k tomu, že se tato populace vyskytuje i ve zdravé PK i KD,¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ není měření samotného zastoupení CD5⁺19⁺ buněk při detekci MRD dostačující. V této práci byly zjištěny hladiny CD5 pozitivních B lymfocytů u zdravých kontrol do 5 % ze všech leukocytů v PK i KD, což je v souladu s dříve publikovanými studiemi.

Sledování hladiny MRD u MCL pomocí 8-FCM panelu výrazně komplikuje variabilita imunofenotypu, proto je podmínkou znalost vstupního imunofenotypu a u případů s atypickým imunofenotypem přizpůsobení gateovací strategie. Měření vstupního imunofenotypu před zahájením monitorování MRD je u hematologických malignit zcela rutinním přístupem,¹²⁵⁻¹²⁸ ale na rozdíl od akutních leukemií není třeba u panelu MCL MRD provádět rozsáhlou vstupní analýzu zahrnující rozbor až několika zkumavek a vyhledávat vhodnou kombinaci tzv. LAIP; ke stanovení imunofenotypu vhodného pro detekci MCL MRD stačí zařazení pouze jedné zkumavky, což výrazně usnadňuje zavedení monitorování MRD do laboratorní praxe. Znaky, které byly vybrány do panelu MCL MRD na základě jejich odlišné exprese v porovnání se zdravými B lymfocyty, vykazují u pacientů s MCL nejnižší variabilitu exprese. V souboru 30 pacientů, jejichž imunofenotyp byl porovnán s 20

zdravými kontrolami, byla atypická exprese antigenů CD62L a CD200 detekována pouze u dvou různých pacientů, tedy u 3 % pacientů. Atypická exprese antigenu CD23 byla zaznamenána u 13 % pacientů. Nízké zastoupení variabilního imunofenotypu bylo detekováno i v rámci monitorování MRD u rozsáhlého souboru 109 pacientů. Atypický imunofenotyp byl detekován celkem u 7 % pacientů: vždy 1 pacient byl CD23⁺, 62L⁺ a CD200⁺⁺, dále 5 pacientů bylo CD5⁻. Úskalí 8-FCM panelu MCL MRD spočívá v antigenu CD5, protože jeho negativita na buňkách MCL výrazně snižuje citlivost měření. Jako možné řešení by se nabízelo například přidání znaku ROR1 případně nahrazení znaku CD5 znakem ROR1. ROR1 je tyrozinkinázový receptor, jehož zvýšená exprese byla popsána u některých B lymfoproliferací včetně MCL.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Detailně je exprese ROR1 prostudována na buňkách CLL,^{148,149,151} kde procentuální zastoupení ROR1⁺ buněk pozitivně koreluje s procentuálním zastoupením populace CD5⁺19⁺ ve vzorcích a exprese ROR1 na patologických buňkách zůstává v průběhu terapie stabilní. Absence exprese ROR1 na zdravých B lymfocytech tedy nabízí jeho využití jako markeru pro sledování MRD, které by mohlo zvýšit citlivost celého protokolu pro stanovení hladiny MRD.¹⁴⁸ Limitujícím faktorem pro zavedení markeru ROR1 do panelu MRD by mohla být jeho pozitivita na B lymfocytárních prekurzorech, konkrétně na populaci CD19⁺10⁺34⁻,¹⁵² což by u vzorků kostní dřeně, mohlo být příčinou falešně pozitivních výsledků.

Kromě výběru vhodných markerů je pro analýzu MRD metodou průtokové cytometrie neméně důležitá i volba gateovací strategie. K identifikaci patologických buněk mohou sloužit různé gateovací strategie, ze kterých byla vybrána Booleova kombinace gatů jako široce využívaná metoda při detekci MRD u hematologických malignit.^{132,153} Další metodou je například aplikace analýzy, jejíž gaty byly nastaveny a uloženy podle exprese antigenů na normálních buňkách.¹⁵⁴

Cílem disertační práce bylo navrhnout univerzální protokol pro měření MRD u MCL, podobně jako je tomu u diagnózy CLL. V roce 2001 byla publikována studie, ve které byla porovnána exprese dvanácti antigenů u buněk CLL a normálních B lymfocytů¹⁵⁵ a na níž navázalo rozsáhlá studie a publikace standardizovaného čtyřbarevného Rawstronova protokolu pro detekci MRD u pacientů s CLL,¹³¹ který byl později nahrazen šestibarevným protokolem.¹³² Na našem pracovišti proběhla modifikace Rawstronova protokolu ze čtyřbarevného na osmibarevný. Tím se snížily ekonomické náklady vyšetření, protože došlo k redukci počtu vyšetřovaných zkumavek ze čtyř na dvě a zároveň bylo redukováno množství použitých monoklonálních protilátek. V neposlední řadě bylo zjištěno, že vyšetření hladin MRD osmibarevným protokolem dobře koreluje s molekulární metodou RQ-PCR.¹⁵⁶

Imunofenotypové podobnosti CLL a MCL vedly k ověřování, zda je možné stejné kombinace antigenů použít pro detekci MRD u obou diagnóz. V roce 2008 vyšla publikace analyzující čtyřbarevný panel MRD u MCL, který byl zároveň prvním panelem pro detekci MRD u MCL evaluovaným pomocí IgH-PCR metody.¹⁵⁷ Studie označila imunofenotyp CD19^{low+}5⁺⁺23^{low}22^{low} za nejčastější u MCL (tyto kombinace antigenů bylo možné aplikovat na 79 % pacientů), což se pouze částečně shoduje s výsledky této práce. V rozporu je detekovaná exprese antigenu CD22, která byla podle výsledků této práce téměř u všech pacientů s MCL pozitivní a jeho exprese se výrazně překrývala s expresí na normálních B lymfocytech. Další rozpor byl nalezen u antigenu CD5, jenž byl dle naší studie exprimován u 95 % vyšetřovaných pacientů, ale míra jeho exprese ve většině případů odpovídala T lymfocytům, případně byla v dimové oblasti. Hyperexprese CD5, která je popisována na buňkách MCL ve studii z roku 2008, byla podle našich výsledků pozorována pouze u minoritní skupiny pacientů. Shodně byla u obou studií zaznamenána nízká exprese antigenu CD23. Studie se rovněž shodují v tom, že míra exprese všech vyšetřovaných antigenů u buněk MCL se částečně překrývala s expresí na normálních B lymfocytech, a tedy že k senzitivní detekci MRD je nutné použít kombinaci více antigenů. Oproti čtyřbarevnému panelu nabízí touto disertační prací prezentovaná osmibarevná analýza o řád vyšší citlivost.

Výsledky měření 8-FCM panelu MCL MRD byly evaluovány pomocí RQ-PCR metody. Ačkoliv FCM nedosahuje senzitivity moderních PCR metod používaných k detekci MRD, již dříve bylo prokázáno, že nabízí srovnatelné výsledky s hladinami MRD nad 0,01 % u ALL,¹³⁷ CLL¹³¹ a HCL¹³³, a poskytuje tak důležité doplňkové informace. Tato disertační práce potvrzuje srovnatelné výsledky u MCL. U více jak 80 % vzorků byly zjištěny totožné výsledky na kvalitativní úrovni (MRD pozitivní/negativní) a srovnání obou metod vykazovalo dobrou míru shody. Rozdílné výsledky v obou metodách byly pozorovány u skupiny vzorků, u kterých byly nalezeny pouze velmi nízké hladiny MRD, jež nebylo možné kvantifikovat. Pouze 1 % vzorků, označené pomocí RQ-PCR za pozitivní bez možnosti kvantifikace výsledku, bylo shodně pozitivní i využitím metody 8-FCM. Diskonkordance při srovnání obou metod byla u 54 % případů pozorována u vzorků, které byly odebrány v průběhu nebo na konci terapie anti-CD20 monoklonální protilátkou rituximabem a u kterých nebylo možné detekovat žádné nebo velmi nízké (do 0,9 %) hladiny B lymfocytů. Anti-CD20 terapie se zdá být limitujícím faktorem detekce MRD pomocí průtokové cytometrie. Stejně závěry formulovaly dříve publikované studie, zabývající se problematikou MRD u MCL,^{157,158} ačkoliv bylo ve flowcytometrických panelech použito

různých kombinací antigenů. Cheminant a kol.¹⁵⁸ vychází při detekci MRD z Euroflow protokolu,¹⁵⁹ a při identifikaci MCL buněk využívá kombinace antigenů CD45, CD19, CD5, Igkappa, Iglambda, CD305 a CD11c.

Zcela odlišný přístup navrhuje publikace z roku 2012,¹⁶⁰ ve které je kromě povrchového značení využit intracelulární marker SOX11 nejen při stanovení diagnózy MCL, ale i jako potenciální marker pro monitorování MRD. V rámci dilučních experimentů bylo prokázáno, že pomocí klonu SOX11-C1 je možné identifikovat až 1 % patologických buněk z celkové populace lymfocytů. Nevýhody metody spočívají v nutnosti intracelulárního barvení vzorků, čímž je příprava oproti povrchovému barvení časově i metodicky náročnější. Samotné intracelulární barvení vzorku monoklonální protilátkou vyžaduje inkubaci přes noc, což výrazně komplikuje použití této metody v běžné laboratorní praxi.

V této disertační práci navržený 8-FCM panel MCL MRD je sestaven z jedné zkumavky obsahující kombinaci antigenů CD3/5/19/20/23/45/62L/200 a je velmi snadno aplikovatelný v rutinní diagnostické praxi. Ačkoliv panel nedosahuje citlivosti metod molekulární biologie (limit detekce je 0,02 %), při komparaci výsledků získaných pomocí 8-FCM panelu MCL MRD a RQ-PCR bylo dosaženo silné pozitivní korelace.

6 Závěr

V disertační práci je řešena problematika monitorování hladiny MRD metodou multiparametrické průtokové cytometrie. Cílem práce bylo navržení panelu osmibarevné analýzy pro sledování hladin MRD u pacientů s MCL, následná evaluace výsledků navrženého panelu s metodou molekulární biologie RQ-PCR a implementace tohoto panelu mezi rutinní laboratorní vyšetření.

Postup návrhu panelu spočíval v podrobném popsání imunofenotypu buněk MCL pomocí multiparametrické průtokové cytometrie a následném porovnání exprese vyšetřovaných antigenů na patologických a normálních B lymfocytech. Z vyšetřovaných antigenů nebyl identifikován žádný, pomocí kterého by bylo možné jednoznačně odlišit patologické a fyziologické B lymfocyty, protože exprese všech antigenů na obou porovnávaných populacích buněk se vždy alespoň částečně překrývaly. Proto byla vybrána kombinace antigenů, u kterých byl stanoven nejvyšší stupeň separace mezi patologickými a fyziologickými B lymfocyty a nejnižší variabilita exprese. Použitými antigeny byly CD5, CD23, CD62L a CD200, které tvoří základ navrženého osmibarevného protokolu. Komparace výsledků s metodou RQ-PCR ukázala dobrou shodu a silnou pozitivní korelaci. Nalezené rozdíly ve výsledcích byly zapříčiněny nižší senzitivitou metody průtokové cytometrie.

Navržený panel osmibarevné analýzy pro detekci hladin MRD u pacientů s MCL přispěje ke zkvalitnění monitorace odpovědi na léčbu a časně diagnostiky relapsů v Laboratoři průtokové cytometrie (CMGBT, IHOK, FN Brno).

7 Seznam použité literatury

1. Harris NL. Hodgkin's lymphomas: classification, diagnosis, and grading. *Semin Hematol.* 1999;36(3):220-32.
2. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood.* 2011;117(19):5019-32.
3. Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(4):251-62.
4. Cooper MD, Peterson RD, Good RA. Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken. *Nature.* 1965;205:143-146.
5. Cooper MD, Raymond DA, Peterson RD, South MA, Good RA. The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *J Exp Med.* 1966;123:75-102.
6. Miller JF, Mitchell GF. Cell to cell interaction in the immune response, I: hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med.* 1968;128:801-820.
7. Mitchell GF, Miller JF. Cell to cell interaction immune response, II: the source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med.* 1968;128:821-837.
8. Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity.* 1995;3(4):459-73.
9. LeBien TW. Fates of human B-cell precursors. *Blood.* 2000;96(1):9-23.
10. Harris NL, Stein H, Coupland SE, et al. New approaches to lymphoma diagnosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2001;194-220.
11. Sędek Ł, Bulsa J, Sonsala A, et al. The Immunophenotypes of Blast Cells in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: How Different Are They from Their Normal Counterparts? *Cytometry B Clin Cytom.* 2014;86B:329-339.
12. Schneider T, Flörcken A, Singh A, et al. Flow cytometric maturity score as a novel prognostic parameter in patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* 2015;94(8):1337-45.
13. Pillai, S. The chosen few? Positive selection and the generation of naive B lymphocytes. *Immunity.* 1999;10(5):493-502.
14. Kipps, TJ. The CD5 B cell. *Adv Immunol.* 1989; 47:117-85.
15. Inghirami G, Foitl DR, Sabichi A, Zhu BY, Knowles DM. Autoantibody-associated cross-reactive idiotype-bearing human B lymphocytes: distribution and characterization, including Ig VH gene and CD5 antigen expression. *Blood.* 1991;78(6):1503-15.
16. Liu YJ, Zhang J, Lane PJ, Chan EY, MacLennan IC. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol.* 1991;21(12):2951-62.
17. Liu, YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:275-306.
18. Pittaluga, S, Ayoubi TA, Wlodarska I, et al. BCL-6 expression in reactive lymphoid tissue and in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol.* 1996;179(2):145-50.
19. Liu, YJ, Grouard G, de Bouteillaer O, Banchereau J. Follicular dendritic cells and germinal centers. *Int Rev Cytol.* 1996;166:139-79.
20. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell.* 2000;102(5):553-563.

21. Alt FW, Yancopoulos GD, Blackwell TK, et al. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *Embo J*. 1984;3(6):1209-19.
22. Grønbaek K, Straten PT, Ralfkiaer E, et al. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood*. 1998;92(9):3018-24.
23. Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, et al. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(20):11816-21.
24. Spencer J, Finn T, Pulford KA, Mason DY, Isaacson PG. The human gut contains a novel population of B lymphocyte which resemble marginal zone cells. *Clin Exp Immunol*. 1985;62(3):607-12.
25. van den Oord JJ, de Wolf-Peeters C, Desmet VJ. Marginal zone lymphocytes in the lymph node. *Hum Pathol*. 1989;20(12):1225-7.
26. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Komiyama A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol Today*. 2000;21(5):204-6.
27. Butcher EC. Warner-Lambert/Parke-Davis Award Lecture. Cellular and molecular mechanisms that direct leukocyte traffic. *Am J Pathol*. 1990;136(1):3-11.
28. Papajík T, Trněný M, Vášová I, et al. Epidemiologie ne-hodgkinových lymfomů v České republice, Evropě a Severní Americe. *Onkologie*. 2009;3:141-146.
29. Küppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*. 2001;10;20(40):5580-94.
30. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 1999;341(20):1520-9.
31. Stevenson FK, Sahota SS, Ottensmeier CH, Zhu D, Forconi F, Hamblin TJ. The occurrence and significance of V gene mutations in B cell-derived human malignancy. *Adv Cancer Res*. 2001;83:81-116.
32. Dave SS, Fu K, Wright GW, et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med*. 2006;354(23):2431-42.
33. Vitoria GD, Dominguez-Sola D, Holmes AB, Deroubaix S, Dalla-Favera R, Nussenzweig MC. Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood*. 2012;120(11):2240-8.
34. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(12):920-32.
35. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(1):22-33.
36. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*. 1985;229(4720):1390-3.
37. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.
38. Dighiero G, Binet JL. Does the CLL B lymphocyte correspond to expansion of an immature B clone or to expansion of a distinct subpopulation of B cells? *Blood Cells*. 1987;12(2):385-97.
39. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848-54.
40. Nalesnik MA, Jaffe R, Starzl TE, et al. The pathology of posttransplant lymphoproliferative disorders occurring in the setting of cyclosporine A-prednisone immunosuppression. *Am J Pathol*. 1988;133(1):173-92.

41. Beral V, Peterman T, Berkelman R, Jaffe H. AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*. 1991;337(8745):805-9.
42. Canioni D, Jabado N, MacIntyre E, Patey N, Emile JF, Brousse N. Lymphoproliferative disorders in children with primary immunodeficiencies: immunological status may be more predictive of the outcome than other criteria. *Histopathology*. 2001;38(2):146-59.
43. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*. 1964;1(7335):702-3.
44. Hamilton-Dutoit SJ, Raphael M, Audouin J, et al. In situ demonstration of Epstein-Barr virus small RNAs (EBER 1) in acquired immunodeficiency syndrome-related lymphomas: correlation with tumor morphology and primary site. *Blood*. 1993;82(2):619-24.
45. Dal Maso L, Franceschi S. Hepatitis C virus and risk of lymphoma and other lymphoid neoplasms: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(11):2078-85.
46. Illes A, Varoczy L, Papp G, et al. Aspects of B-cell non-Hodgkin's lymphoma development: a transition from immune-reactivity to malignancy. *Scand J Immunol*. 2009;69(5):387-400.
47. Morgner A, Bayerdorffer E, Neubauer A, Stolte M: Gastric MALT lymphoma and its relationship to Helicobacter pylori infection: Management and pathogenesis of the disease. *Micr Res Technique*. 2000;48: 349-356.
48. Hussell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J. The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to Helicobacter pylori. *Lancet*. 1993;342(8871):571-4.
49. Jares P, Campo E. Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008;142:149-65.
50. Smedby KE, Hjalgrim H. Epidemiology and etiology of mantle cell lymphoma and other non-Hodgkin lymphoma subtypes. *Semin Cancer Biol*. 2011;21(5):293-8.
51. Dreyling M, Kluin-Nelemans HC, Bea S, 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.
52. Li ZM, Zucca E, Ghielmini M. Open questions in the management of mantle cell lymphoma. *Cancer Treat Rev*. 2013;39:602-9.
53. Swerdlow SH, Williams ME. From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades. *Hum Pathol*. 2002;33(1):7-20.
54. Nodit L, Bahler DW, Jacobs SA, Locker J, Swerdlow SH. Indolent mantle cell lymphoma with nodal involvement and mutated immunoglobulin heavy chain genes. *Hum Pathol*. 2003;34:1030-4.
55. Espinet B, Sole F, Pedro C, et al. Clonal proliferation of cyclin D1- positive mantle lymphocytes in an asymptomatic patient: an early stage event in the development or an indolent form of a mantle cell lymphoma? *Hum Pathol*. 2005;36:1232-7.
56. Martin P, Chadburn A, Christos P, et al. Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009;27:1209-13.
57. Nygren L, Baumgartner Wennerholm S, Klimkowska M, Christensson B, Kimby E, Sander B. Prognostic role of SOX11 in a population-based cohort of mantle cell lymphoma. *Blood*. 2012;119:4215-23.
58. Pileri SA, Falini B. Mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2009;94(11):1488-92.
59. Ott G, Kalla J, Ott MM, et al. Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. *Blood*. 1997;89(4):1421-9.

60. Yin CC, Medeiros LJ, Cromwell CC, et al. Sequence analysis proves clonal identity in five patients with typical and blastoid mantle cell lymphoma. *Mod Pathol*. 2007;20(1):1-7.
61. Bertoni, F, Ponzoni M. The cellular origin of mantle cell lymphoma. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007. 39(10):1747-53.
62. Weisenburger DD, Armitage JO. Mantle cell lymphoma – an entity comes of age. *Blood*. 1996;87(11):4483-94.
63. Pittaluga S, Verhoef G, Criel A, et al. Prognostic significance of bone marrow trephine and peripheral blood smears in 55 patients with mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 1996;21:115-125.
64. Singleton TP, Anderson MM, Ross CW, Schnitzer B. Leukemic phase of mantle cell lymphoma, blastoid variant. *Am J Clin Pathol*. 1999;111(4):495-500.
65. Schlette E, Bueso-Ramos C, Giles F, Glassman A, Hayes K, Medeiros LJ. Mature B-cell leukemias with more than 55% prolymphocytes: a heterogeneous group that includes an unusual variant of mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2001;115:571-581.
66. Bonnefoy JY, Lecoanet-Henchoz S, Aubry JP, Gauchat JF, Graber P. CD23 and B-cell activation. *Curr Opin Immunol*. 1995;7(3):355-9.
67. Conrad DH, Ford JW, Sturgill JL, Gibb DR. CD23: an overlooked regulator of allergic disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2007; 7(5): 331-337.
68. Gong JZ, Lagoo AS, Peters D, Horvatinovich J, Benz P, Buckley PJ. Value of CD23 determination by flow cytometry in differentiating mantle cell lymphoma from chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2001;116:893-897.
69. Schlette E., Fu K., Medeiros LJ. CD23 expression in mantle cell lymphoma: clinicopathologic features of 18 cases. *Am J Clin Pathol*. 2003;120(5):760-6.
70. Shrestha R, Bhatt VR, Guru Murthy GS, Armitage JO. Clinicopathologic features and management of blastoid variant of mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(10):2759-67.
71. Camacho FI, Algara P, Rodríguez A, et al. Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood*. 2003;101(10):4042-6.
72. Dong HY, Gorczyca W, Liu Z, et al. B-cell lymphomas with coexpression of CD5 and CD10. *Am J Clin Pathol*. 2003;119:218-230.
73. Zanetto U, Dong H, Huang Y, et al. Mantle cell lymphoma with aberrant expression of CD10. *Histopathology*. 2008;53:20-29.
74. Gualco G, Weiss LM, Harrington WJ Jr, Bacchi CE. BCL6, MUM1, and CD10 expression in mantle cell lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18(2):103-8.
75. 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):1212-6.
76. McCaughan GW, Clark MJ, Barclay AN. Characterization of the human homolog of the rat MRC OX-2 membrane glycoprotein. *Immunogenetics*. 1987;25(5):329-35.
77. Wright GJ, Jones M, Puklavec MJ, Brown MH, Barclay AN. The unusual distribution of the neuronal/lymphoid cell surface CD200 (OX2) glycoprotein is conserved in humans. *Immunology*. 2001;102:173-9.
78. Bosch F, Jares P, Campo E, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood*. 1994;84:2726-32.

79. de Boer, CJ, van Krieken JH, Kluin-Nelemans HC, Kluin PM, Schuurung E. Cyclin D1 messenger RNA overexpression as a marker for mantle cell lymphoma. *Oncogene*. 1995;10(9):1833-40.
80. Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell*. 1993;73(3):487-97.
81. Teramoto N, Pokrovskaja K, Szekely L, et al. Expression of cyclin D2 and D3 in lymphoid lesions. *Int J Cancer*. 1999;81(4):543-50.
82. Rao PH, Cigudosa JC, Ning Y, et al. Multicolor spectral karyotyping identifies new recurring breakpoints and translocations in multiple myeloma. *Blood*. 1998;92(5):1743-8.
83. Fonseca R, Blood EA, Oken MM, et al. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood*. 2002;99:3735-3741.
84. Salaverria I, Zettl A, Beà S, et al. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression based proliferation signature. *J Clin Oncol*. 2007;25(10):1216-22.
85. 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):4315-21.
86. Gesk S, Klapper W, Martín-Subero JJ, et al. A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2- positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood*. 2006;108(3):1109-10.
87. 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.
88. Hoster E, Dreyling M, Klapper W, et al. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008;111(2):558-65.
89. International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1993;329:987-994.
90. 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(2):103-11.
91. Thorsélius M, Walsh S, Eriksson I, et al. Somatic hypermutation and V(H) gene usage in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2002;68(4):217-24.
92. Cogliatti SB, Bertoni F, Zimmermann DR, et al. IgVH mutations in blastoid mantle cell lymphoma characterize a subgroup with a tendency to more favourable clinical outcome. *J Pathol*. 2005;206(3):320-7.
93. Orchard J, Garand R, Davis Z, et al. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood*. 2003;101(12):4975-81.
94. Bhattaram P, Penzo-Méndez A, Sock E, et al. Organogenesis relies on SoxC transcription factors for the survival of neural and mesenchymal progenitors. *Nat Commun*. 2010;1:9.
95. Wang X, Asplund AC, Porwit A, et al. The subcellular Sox11 distribution pattern identifies subsets of mantle cell lymphoma: correlation to overall survival. *Br J Haematol*. 2008;143(2):248-252.
96. 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.

97. Fernández V, Salameró O, Espinet B, et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 2010;70(4):1408-1418.
98. Ondrejka SL, Lai R, Smith SD, Hsi ED. 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.
99. Gianni AM, Magni M, Martelli M, et al. Long-term remission in mantle cell lymphoma following high-dose sequential chemotherapy and in vivo rituximab-purged stem cell autografting (R-HDS regimen). *Blood.* 2003;102:749-755.
100. 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.
101. Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, 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.
102. Romaguera JE, Fayad LE, Feng L, 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. *Br J Haematol.* 2010;150:200-208.
103. Robinson S, Dreger P, Caballero D, et al. The EBMT/EMCL consensus project on the role of autologous and allogeneic stem cell transplantation in mantle cell lymphoma. *Leukemia.* 2015;29(2):464-73.
104. 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(9):1984-92.
105. Šálek D, Veselá P, Boudová L, et al. 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. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(4):802-10.
106. Vaughn JE, Sorrow ML, Storer BE, et al. Long-term sustained disease control in patients with mantle cell lymphoma with or without active disease after treatment with allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Cancer.* 2015;121(20):3709-16.
107. Rummel MJ, Niederle N, Maschmeyer G, et al. Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet.* 2013;381(9873):1203-10.
108. Kluin-Nelemans HC, Hoster E, Hermine O, et al. Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2012;367(6):520-31.
109. Le Gouill S, Kröger N, Dhedin N, et al. Reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for relapsed/refractory mantle cell lymphoma: a multicenter experience. *Ann Oncol.* 2012;23(10):2695-703.
110. Wang ML, Rule S, Martin P, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2013;369(6):507-16.

111. Goy A, Sinha R, Williams ME, et al. Single-agent lenalidomide in patients with mantle-cell lymphoma who relapsed or progressed after or were refractory to bortezomib: phase II MCL-001 (EMERGE) study. *J Clin Oncol*. 2013;31(29):3688-95.
112. Hess G, Keller U, Scholz CW, et al. Safety and efficacy of Temsirolimus in combination with Bendamustine and Rituximab in relapsed mantle cell and follicular lymphoma. *Leukemia*. 2015;29(8):1695-701.
113. Ruan J, Martin P, Shah B, et al. Lenalidomide plus Rituximab as Initial Treatment for Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2015;373(19):1835-44.
114. Varghese AM, Rawstron AC, Hillmen P. Eradicating minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia: should this be the goal of treatment? *Curr Hematol Malig Rep*. 2010;5(1):35-44.
115. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood*. 1995;85(6):1416-1434.
116. Gutterman JU, Mavligit G, Burgess MA, et al. Immunodiagnosis of acute leukemia: detection of residual disease. *J Natl Cancer Inst*. 1974;53(2):389-92.
117. Campana D. Should minimal residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia be standard of care? *Curr Hematol Malig Rep*. 2012;7(2):170-7.
118. Bhojwani D, Pui CH. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*. 2013;14(6):e205-17.
119. Pott C, Hoster E, Delfau-Larue MH, et al. Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. *Blood*. 2010;115(16):3215-23.
120. Andersen NS, Pedersen LB, Laurell A, et al. Pre-emptive treatment with rituximab of molecular relapse after autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(26):4365-70.
121. Goulden NJ, Knechtli CJ, Garland RJ, et al. Minimal residual disease analysis for the prediction of relapse in children with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 1998;100(1):235-44.
122. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*. 2003;17(6):1013-34.
123. Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia*. 2010;24:521-535.
124. Pott C, Brüggemann M, Ritgen M, van der Velden VH, van Dongen JJ, Kneba M. MRD detection in B-cell non-Hodgkin lymphomas using Ig gene rearrangements and chromosomal translocations as targets for real-time quantitative PCR. *Methods Mol Biol*. 2013;971:175-200.
125. Athale UH, Gibson PJ, Bradley NM, Malkin DM, Hitzler J. Minimal Residual Disease and Childhood Leukemia: Standard of Care Recommendations From the Pediatric Oncology Group of Ontario MRD Working Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(6):973-82.
126. Vidriales MB, Pérez-López E, Pegenaute C, et al. Minimal residual disease evaluation by flow cytometry is a complementary tool to cytogenetics for treatment decisions in acute myeloid leukaemia. *Leuk Res*. 2016;40:1-9.
127. Hourigan CS, Karp JE. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(8):460-71.

128. Kern W, Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2010;23(3):379-90.
129. Coustan-Smith E, Behm FG, Hurwitz CA, Rivera GK, Campana D. N-CAM (CD56) expression by CD34+ malignant myeloblasts has implications for minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1993;7(6):853-8.
130. Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry.* 1999;38(4):139-52.
131. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia.* 2007;21(5):956-64.
132. Rawstron AC, Böttcher S, Letestu R, et al. Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. *Leukemia.* 2013;27(1):142-9.
133. Garnache Ottou F, Chandesris MO, Lhermitte L, et al. Peripheral blood 8 colour flow cytometry monitoring of hairy cell leukaemia allows detection of high-risk patients. *Br J Haematol.* 2014;166(1):50-9.
134. Moreau EJ, Matutes E, Ahern RP, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* 1997;108:378-382.
135. Andersen NS, Donovan JW, Zuckerman A, Pedersen L, Geisler C, Gribben JG. Real-time polymerase chain reaction estimation of bone marrow tumor burden using clonal immunoglobulin heavy chain gene and bcl-1/JH rearrangements in mantle cell lymphoma. *Exp Hematol.* 2002;30(7):703-10.
136. Lampariello F. On the use of the Kolmogorov-Smirnov statistical test for immunofluorescence histogram comparison. *Cytometry.* 2000; 39:179-188.
137. Garand R, Beldjord K, Cavé H, et al. Flow cytometry and IG/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. *Leukemia.* 2013 Feb;27(2):370-6.
138. Gao J, Peterson L, Nelson B, Goolsby C, Chen YH. Immunophenotypic variations in mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2009;132(5):699-706.
139. Tworek JA, Singleton TP, Schnitzer B, Hsi ED, Ross CW. Flow cytometric and immunohistochemical analysis of small lymphocytic lymphoma, mantle cell lymphoma, and plasmacytoid small lymphocytic lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 1998;110(5):582-9.
140. Angelopoulou MK, Kontopidou FN, Pangalis GA. Adhesion molecules in B-chronic lymphoproliferative disorders. *Semin Hematol.* 1999 Apr;36(2):178-97.
141. Lúcio PJ, Faria MT, Pinto AM, et al. Expression of adhesion molecules in chronic B-cell lymphoproliferative disorders. *Haematologica.* 1998;83(2):104-11.
142. Lai R, Weiss LM, Chang KL, Arber DA. Frequency of CD43 expression in non-Hodgkin lymphoma. A survey of 742 cases and further characterization of rare CD43+ follicular lymphomas. *Am J Clin Pathol.* 1999;111(4):488-94.
143. Contos MJ, Kornstein MJ, Innes D, et al. The utility of CD20 and CD43 in subclassification of low-grade B-cell lymphoma on paraffin sections. *Mod Pathol.* 1992;5:631-633.
144. de Leon ED, Alkan S, Huang JC, Hsi ED. Usefulness of an immunohistochemical panel in paraffin-embedded tissues for the differentiation of B-cell non-Hodgkin's lymphomas of small lymphocytes. *Mod Pathol.* 1998;11(11):1046-51.

145. Gupta R, Jain P, Deo SVS, Sharma A. Flow cytometric analysis of CD5+B cells-A frame of reference for minimal residual disease analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2004;121:368–372.
146. Cabezudo E, Matutes E, Ramrattan M, Morilla R, Catovsky D. Analysis of residual disease in chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry. *Leukemia.* 1997;11(11):1909-14.
147. Durrieu F, Genevieve F, Arnoulet C, Brumpt C, Capiod J-C, Degenne M, Feuillard J, Garand R, Kara-Terki A, Kulhein E, et al. Normal levels of peripheral CD19(+)CD5(+) CLL-like cells: Toward a defined threshold for CLL follow-up – A GEIL-GOELAMS Study. *Cytometry Part B.* 2011;80B:346-353.
148. Uhrmacher S, Schmidt C, Erdfelder F, et al. Use of the receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) as a diagnostic tool in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leuk Res.* 2011;35(10):1360-6.
149. Daneshmanesh AH, Porwit A, Hojjat-Farsangi M, et al. Orphan receptor tyrosine kinases ROR1 and ROR2 in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma.* 2013;54(4):843-50.
150. Barna G, Mihalik R, Timár B, et al. ROR1 expression is not a unique marker of CLL. *Hematol Oncol.* 2011;29(1):17-21.
151. Baskar S, Kwong KY, Hofer T, et al. Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2008;14(2):396-404.
152. Broome HE, Rassenti LZ, Wang HY, Meyer LM, Kipps TJ. ROR1 is expressed on hematogones (non-neoplastic human B-lymphocyte precursors) and a minority of precursor-B acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2011;35(10):1390-4.
153. Kern W, Danhauser-Riedl S, Ratei R, et al. Detection of minimal residual disease in unselected patients with acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry for definition of leukemia associated immunophenotypes and determination of their frequencies in normal bone marrow. *Haematologica.* 2003;88:646-653.
154. Weir EG, Cowan K, LeBeau P, Borowitz MJ. A limited antibody panel can distinguish B-precursor acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with four color flow cytometry: Implications for residual disease detection. *Leukemia.* 1999;13:555-567.
155. Rawstron AC, Kennedy B, Evans PA, et al. Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood.* 2001;98(1):29-35.
156. Stehlíková O, Chovancová J, Tichý B, et al. Detecting minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia using 8-color flow cytometry protocol in routine hematological practice. *Int J Lab Hematol.* 2014;36(2):165-71.
157. Böttcher S, Ritgen M, Buske S, et al. Minimal residual disease detection in mantle cell lymphoma: methods and significance of four-color flow cytometry compared to consensus IGH-polymerase chain reaction at initial staging and for follow-up examinations. *Haematologica.* 2008;93(4):551-9.
158. Cheminant M, Derrieux C, Touzart A, et al. Minimal residual disease monitoring by 8-color flow cytometry in mantle cell lymphoma: an EU-MCL and LYSA study. *Haematologica.* 2016;101(3):336-45.
159. van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012;26(9):1908-75.

160. Nordström L, Andréasson U, Jerkeman M, Dictor M, Borrebaeck C, Ek S. Expanded clinical and experimental use of SOX11 - using a monoclonal antibody. *BMC Cancer*. 2012;12:269.

8 Seznam zkratek

3-FCM	tříbarevná průtoková cytometrie
8-FCM	osmibarevná průtoková cytometrie
ALL	akutní lymfoblastická leukemie
alloSCT	alogenní transplantace krvetvorných buněk (<i>allogeneic stem cell transplantation</i>)
AML	akutní myeloidní leukemie
APC	allophycocyanin
ASCT	autologní transplantace krvetvorných buněk (<i>autologous stem cell transplantation</i>)
BCL1	gen kódující cyklin D1 (<i>B cell lymphoma 1</i>)
Bcl-2	antiapoptotický protein (<i>B cell lymphoma 2</i>)
BCL-6	transkripční faktor (<i>B cell lymphoma 6 protein</i>)
BCR	B buněčný receptor (<i>B cell receptor</i>)
BERT	léčebný režim kombinující bendamustin, rituximab, temsirolim
BL	Burkittův lymfom
CCND1	gen kódující cyklin D1
CD	diferenciační znak (<i>cluster of differentiation</i>)
CDK	cyklin-dependentní kináza
CLL	chronická lymfocytární leukémie
CLP	společný lymfoidní progenitor (<i>common lymphoid progenitor</i>)
CMGBT	Centrum molekulární biologie a genové terapie
DLBCL	difúzní velkobuněčný B lymfom (<i>diffuse large B-cell lymphoma</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EBV	virus Epstein-Barrové
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EOCG	Východní kooperativní onkologická skupina (<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>)
FCM	průtoková cytometrie (<i>flow cytometry</i>)
FSC	dopředný rozptyl (<i>forward scatter channel</i>)
FDC	folikulární dendritická buňka (<i>follicular dendritic cell</i>)
FITC	fluorescein-izotiokyanát
FL	folikulární lymfom
FN	Fakultní nemocnice
GC	germinální centrum
HCV	virus hepatitidy typu C (<i>hepatitis C virus</i>)
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (<i>human immunodeficiency virus</i>)
HL	Hodgkinův lymfom
HSC	hematopoetická kmenová buňka (<i>hematopoietic stem cell</i>)
Ig	imunoglobulin
IgH	těžký imunoglobulinový řetězec (<i>immunoglobulin heavy chain</i>)
IgL	lehký imunoglobulinový řetězec (<i>immunoglobulin light chain</i>)
IgV	variabilní oblast imunoglobulinu (<i>immunoglobulin variable region</i>)
IgVH	variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu (<i>immunoglobulin heavy chain variable region</i>)
IHOK	Interní hematologická a onkologická klinika
IL	interleukin
IPI	mezinárodní prognostický index (<i>International Prognostic Index</i>)

KD	kostní dřeň
K-S	Kolmogorovův-Smirnovův
LAIP	imunofenotyp sdružený s leukémií (<i>leukemia associated aberrant immunophenotype</i>)
LDH	laktátdehydrogenáza
MALT	lymfatická tkáň sliznic (<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>)
MCL	lymfom z pláštěvých buněk (<i>matle cell lymphoma</i>)
MFI	průměrná intenzita fluorescence (<i>mean fluorescence intensity</i>)
MIPI	mezinárodní prognostický index pro lymfom z pláštěvých buněk (<i>Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index</i>)
MM	mnohočetný myelom
MPP	hematopoietický multipotentní progenitor (<i>hematopoietic multipotent progenitor</i>)
MRD	minimální reziduální nemoc (<i>minimal residual disease</i>)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MTC	hlavní translokační klastř (<i>major translocation cluster</i>)
mTOR	proteinkináza (<i>mammalian target of rapamycin</i>)
MZL	lymfom marginální zóny (<i>marginal zone lymphoma</i>)
NHL	non-Hodgkinův lymfom
PBS	fosfátový pufr (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	phycoerythrin
PE-Cy5/PE-Cy7	phycoerythrin-cyanin 5/phycoerythrin-cyanin 7
PerCP-Cy5.5	peridinin-chlorophyl-protein complex-cyanin 5.5
PK	periferní krev
R-(Maxi)CHOP	léčebný režim kombinující rituximab, cyklofosfamid, doxorubicin, vinkristin, prednison
R-HD-Ara-C	léčebný režim kombinující rituximab s vysokodávkovaným cytarabinem
R-HD-MTX-Ara-C	léčebný režim kombinující rituximab, vysokodávkovaný methotrexát, cytarabin
R-hyper-CVAD	léčebný režim kombinující rituximab, hyperfrakcionovaný cyklofosfamid, vinkristin, doxorubicin, dexamethason
RNA	ribonukleová kyselina (<i>ribonucleic acid</i>)
RQ-ASO IgH-PCR	alelově specifická PCR v reálném čase
RQ-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>)
RT-RQ-PCR	reverzní transkripce kvantitativní PCR v reálném čase (<i>reverse transcription real-time quantitative PCR</i>)
SLL	malobuněčný lymfocytický lymfom (<i>small lymphocytic lymphoma</i>)
SOX11	transkripční faktor (<i>sex-determining region Y-box 11</i>)
SSC	boční rozptyl (<i>side-scatter channel</i>)
TCR	T buněčný receptor (<i>T cell receptor</i>)
TdT	terminální deoxynukleotidyl transferáza
WHO	Světová zdravotnická organizace (<i>World Health Organisation</i>)
WT1	transkripční faktor (<i>Wilms tumor 1</i>)

9 Seznam obrázků

Obr. 1: Diferenciace B lymfocytů	11
Obr. 2: Původ B buněčných lymfomů	13
Obr. 3: Schématické znázornění translokace t(11;14)(q13;q32)	16
Obr. 4: Identifikace B lymfocytů průtokovou cytometrií.....	25
Obr. 5: Procentuální zastoupení vybraných antigenů na buňkách MCL a zdravých kontrolách	30
Obr. 6: Kolmogorovův-Smirnovův statistický test – hodnoty D.....	31
Obr. 7: Grafické porovnání MRD pozitivního a negativního výsledku analyzovaného pomocí 8-FCM panelu MCL MRD	32
Obr. 8: Gateovací strategie použité v 8-FCM panelu MCL MRD	33
Obr. 9: Reprezentativní diluční křivky znázorňující senzitivitu 3-FCM versus 8-FCM panelu MCL MRD.....	34
Obr. 10: Porovnání aktivní nemoci, remise a MRD detekovaných pomocí 8-FCM panelu MCL MRD	35
Obr. 11: Reprezentativní diluční křivky znázorňující senzitivitu 8-FCM panelu MCL MRD u pacientů s atypickým fenotypem.	36
Obr. 12: Komparace výsledků detekce MRD mezi 8-FCM a RQ-PCR metodou.....	39
Obr. 13: Komparace hladin infiltrace MCL buňkami u vzorků PK a KD.....	41

10 Seznam tabulek

Tab. 1: Charakteristika souboru pacientů použitého pro navržení 8-FCM panelu MCL MRD (soubor I)	23
Tab. 2: Charakteristika souboru pacientů s MCL s monitorovanou hladinou MRD (soubor II)	24
Tab. 3: Seznam použitých monoklonálních protilátek v 8-FCM panelu MCL MRD	26
Tab. 4: Podmínky akvizice pro 8-FCM panel MCL MRD	26
Tab. 5: Zastoupení vyšetřovaných CD antigenů na buňkách MCL u vzorků PK	29
Tab. 6: Nejnižší procentuální zastoupení buněk MCL ve vzoru identifikující pozitivní výsledek MRD	35
Tab. 7: Komparace výsledků vstupních diagnostických vyšetření měřených pomocí 8-FCM versus RQ-PCR	37
Tab. 8: Komparace výsledků hladiny MRD měřených pomocí 8-FCM versus RQ-PCR...	39

11 Seznam příloh

Příl. 1: Prvoautorská publikace v časopise Cytometry part B: Clinical Cytometry	67
Příl. 2: Ukázka analýzy 8-FCM panelu MCL MRD	77

12 Seznam odborných publikací autorky

Doktorandka je autorkou prvoautorské originální práce, která byla publikována v mezinárodním časopise *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* (IF₂₀₁₄=2,398). Dále je doktorandka spoluautorkou čtyř publikovaných prací se souhrnným IF = 10,562.

12.1 Publikace v časopisech s impakt faktorem

- 1) **Chovancová J**, Bernard T, Stehlíková O, Šálek D, Janíková A, Mayer J, Doubek M. Detection of minimal residual disease in mantle cell lymphoma-establishment of novel eight-color flow cytometry approach. *Cytometry B Clin Cytom.* 2015;88(2):92-100. IF₂₀₁₄=2,398
- 2) Verner J, Trbusek M, **Chovancova J**, Jaskova Z, Moulis M, Folber F, Halouzka R, Mayer J, Pospisilova S, Doubek M. NOD/SCID IL2R γ -null mouse xenograft model of human p53-mutated chronic lymphocytic leukemia and ATM-mutated mantle cell lymphoma using permanent cell lines. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(11):3198-206. IF₂₀₁₄=2,605
- 3) Doubek M, Brychtova Y, Panovska A, Sebejova L, Stehlikova O, **Chovancova J**, Malcikova J, Smardova J, Plevova K, Volfova P, Trbusek M, Mraz M, Bakesova D, Trizuljak J, Hadrabova M, Obrtlíkova P, Karban J, Smolej L, Oltova A, Jelinkova E, Pospisilova S, Mayer J. Ofatumumab added to dexamethasone in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: Results from a phase II study. *Am J Hematol.* 2015;90(5):417-21. IF₂₀₁₄=3,798
- 4) Stehlíková O, **Chovancová J**, Tichý B, Krejčí M, Brychtová Y, Panovská A, Francová Skuhrová H, Burčková K, Borský M, Loja T, Mayer J, Pospíšilová S, Doubek M. Detecting minimal residual disease in patients with chronic lymphocytic leukemia using 8-color flow cytometry protocol in routine hematological practice. *Int J Lab Hematol.* 2014;36(2):165-71. IF₂₀₁₃=1,293
- 5) Krejci M, Doubek M, Brychtova Y, Stehlikova O, **Chovancova J**, Tichy B, Francova HS, Navratil M, Tomiska M, Horky O, Pospisilova S, Mayer J. Fludarabine with cytarabine followed by reduced-intensity conditioning and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with poor-risk chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol.* 2013;92(2):249-54. IF₂₀₁₂=2,866

12.2 Aktivní účast na zahraničních a tuzemských konferencích

Doktorandka prezentovala výsledky své práce na 8 mezinárodních a tuzemských konferencích. Jako spoluautorka je uvedena na dalších 7 abstraktech.

- 1) **Chovancova J**, Mareckova A, Osickova J, Salek D, Janikova A, Mayer J, Doubek M. Minimal residual disease detection in patients with mantle cell lymphoma: a comparative analysis of flow cytometry and RQ-PCR approach. In 30th Congress of the International Society for Advancement of Cytometry. Glasgow, 26-30 June, 2015. (poster)

- 2) **Chovancová J**, Marečková A, Osičková J, Šálek D, Janíková A, Mayer J, Doubek M. Comparison of minimal residual disease detection in patients with mantle cell lymphoma using flow cytometry versus RQ-PCR. In V4 International Conference Analytical Cytometry VIII. Olomouc, 3-5 October, 2015. (poster)
- 3) **Chovancova J**, Doubek M, Mayer J. Significant antigens for detection of minimal residual disease in patients with mantle cell lymphoma using flow cytometry approach. 28th Congress of the International Society for Advancement of Cytometry. San Diego, 19-23 May, 2013. (poster)
- 4) **Chovancová J**, Bernard T, Šálek D, Janíková A, Mayer J, Doubek M. Significant antigens for detection of minimal residual disease in patients with mantle cell lymphoma using flow cytometry approach. In V4 International Conference Analytical Cytometry VII. Mikulov, 21-24 September, 2013. (poster)
- 5) **Chovancová J**, Stehlíková O, Doubek M, Mayer J. Stanovení fenotypu CD34+ buněk z periferních štěpů kmenových buněk a kostní dřeně průtokovou cytometrií. In XVI. Česko-slovenský hematologický a transfuziologický sjezd. Brno, 5. - 8. září 2012. (poster)
- 6) **Chovancova J**, Hrabcakova V, Coupek P, Mayer J, Klabusay M. Changes in the Profile of T-cell Subpopulations in Patients after Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. In 17th Annual International Society for Cellular Therapy Meeting. Rotterdam, 18-21 May, 2011. (poster)
- 7) **Chovancová J**, Stehlíková O, Hrabčáková V, Tichý B, Francová Skuhrová H, Klabusay M, Plevová K, Krejčí M, Brychtová Y, Pospíšilová Š, Doubek M, Mayer J. Comparison of Minimal Residual Disease Detection in Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia Using Multicolor Flow Cytometry versus Quantitative Real Time PCR. In 6. konference Analytická cytometrie 2011. Praha, 8.-11. října, 2011. (přednáška)
- 8) **Chovancova J.**, Stehlikova O., Hrabcakova V., Tichy B., Francova Skuhrova H., Burckova K., Krejci M., Brychtova Y., Borsky M., Mayer J., Pospisilova S., Doubek M. Detection of Minimal Residua Disease in Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia Using Both Four-color and Eight-color Flow Cytometry and Quantitative Real Time PCR Approach. In Haematologica/Hematol J. 97 (Suppl. 1): 524, 2012. ISSN 0390-6078.
- 9) Stehlikova O, **Chovancova J**, Hrabcakova V, Tichy B, Francova Skuhrova H, Burckova K, Krejci M, Brychtova Y, Mayer J, Pospisilova S, Doubek M. Detection of Minimal Residual Disease in Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia Using Both Four-Color and Eight-Color Flow Cytometry and Quantitative Real Time PCR Approach. In 27th Congress of the International Society for Advancement of Cytometry. Leipzig, 23-27 June, 2012. (poster)
- 10) Stehlíková O, **Chovancová J**, Hrabčáková V, Skuhrová Francová H, Burčková K, Krejčí M, Brychtová Y, Tichý B, Mayer J, Doubek M. Detekce minimální zbytkové nemoci u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií průtokovou cytometrií a RQ-PCR. In XVI. Česko-slovenský hematologický a transfuziologický sjezd. Brno, 5. - 8. září, 2012.
- 11) Stehlíková O, **Chovancová J**, Bernard T, Mayer J, Doubek M. Raritní onkologické diagnózy v průtokové cytometrii. In XV. Česko-slovenská konference laboratorní hematologie. Hradec Králové, 20.-21. listopad, 2014.

- 12) Verner J, Trbušek M, **Chovancová J**, Škabrahová H, Moulis M, Folber F, Halouzka R, Mayer J, Pospíšilová Š, Doubek M. NOD/SCID gamma xenograft model of B-cell malignancies using TP53- and/or ATM-deficient cell lines. In *Haematologica/Hematol J.* 99 (Suppl. 1):312, 2014. ISSN 0390-6078.
- 13) Doubek M, Tichý B, Stehlíková O, Skuhrová Francová H, **Chovancová J**, Klabusay M, Malinová K, Krejčí M, Brychtová Y, Pospíšilová Š, Mayer J. Sledování minimální zbytkové nemoci u nemocných s chronickou lymfocytární leukemií po alogenní transplantaci kostní dřeně. In XXV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí v Transfuzi a hematologie dnes. 2011. ISSN 1213-5763.
- 14) Verner J, Mráz M, Folber F, Forejtková S, Moulis M, **Chovancová J**, Stehlíková O, Doubek J, Klabusay M, Trbušek M, Hampl A, Pospíšilová Š, Doubek M, Mayer J. NON/SCID IL2RGAMMA(-/-) xenograft model for chronic lymphocytic leukemia. In *Haematologica/Hematol. J.* 96 (Suppl. 2): 484, 2011. ISSN 0390-6078.
- 15) Verner J, Folber F, Forejtková S, Moulis M, **Chovancová J**, Stehlíková O, Doubek J, Klabusay M, Doubek M, Mayer J. NON SCID GAMMA Mouse as a Model for Chronic Lymphocytic Leukemia. In 1st International Conference on Advances in Cell and Gene Therapy and Immunotherapy: from basic research to clinical applications and 3rd Workshop on Immunotherapy. Mikulov, 23.-25. září, 2010.

13 Souhrn poznatků disertační práce

V disertační práci je řešena problematika detekce hladin MRD u diagnózy MCL metodou multiparametrické průtokové cytometrie. Na základě analýzy imunofenotypu buněk MCL a jeho porovnání s imunofenotypem normálních B lymfocytů bylo zjištěno, že exprese všech vyšetřovaných antigenů se na obou porovnávaných populacích buněk alespoň částečně překrývá. Z tohoto důvodu bylo nutné pro odlišení normálních a neoplastických B lymfocytů zvolit kombinaci antigenů, jejichž exprese je na vyšetřovaných buňkách stabilní a umožňuje přesné odlišení normálních a neoplastických B lymfocytů. Z rozsáhlého souboru 24 antigenů byla vybrána kombinace antigenů CD5, CD23, CD62L a CD200, která tvoří základ navrženého osmibarevného panelu. Tento panel pro detekci hladin MRD u pacientů s MCL dosahuje limitu detekce 2×10^{-4} . Výsledky této studie byly publikovány v časopise **Cytometry Part B: Clinical Cytometry** (IF₂₀₁₄=2,398)

Evaluace navrženého panelu, při které byly výsledky naměřené tímto panelem porovnány s výsledky získanými metodou RQ-PCR, ukázala dobrou shodu a silnou pozitivní korelaci obou metod. Nalezené rozdíly ve výsledcích byly zapříčiněny nižší senzitivitou metody průtokové cytometrie.

Navržený panel osmibarevné analýzy pro detekci hladin MRD přispěje u pacientů s MCL ke zkvalitnění sledování odpovědi na léčbu a umožní časnou diagnostiku relapsů.

.....
Podpis doktorandky

.....
Podpis školitele

14 Přílohy

14.1 Příl. 1: Prvoautorská publikace v časopise Cytometry part B: Clinical Cytometry

Original Article

Detection of Minimal Residual Disease in Mantle Cell Lymphoma—Establishment of Novel Eight-Color Flow Cytometry Approach

Jana Chovancová,^{1,2} Tomáš Bernard,¹ Olga Stehlíková,¹ David Šálek,¹
Andrea Janíková,¹ Jiří Mayer,^{1,2} and Michael Doubek^{1,2*}

¹Department of Internal Medicine-Hematology and Oncology, University Hospital, Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Background: Minimal residual disease (MRD) detection is an essential tool for therapy response assessment in a considerable number of hematologic disorders, including mantle cell lymphoma (MCL). Flow cytometry (FCM) ranks among the most effective approaches, which allows rapid sample processing and compete successfully with highly sensitive molecular methods like polymerase chain reaction. Because FCM is ordinarily applied to detect MRD in B-lineage diseases like chronic lymphocytic leukemia, a similar method could be used in MCL. We decided to test our novel eight-color FCM approach in MCL MRD detection.

Methods: Using an eight-color FCM protocol designed by us, the expression of 24 selected surface antigens in a cohort of 30 patients with newly diagnosed leukemic MCL and 20 normal controls were compared to establish markers that can reliably distinguish normal B-lymphocytes from the MCL population. The sensitivity of the designed protocol was tested using serial dilution studies.

Results: Although MCL presents high immunophenotypic variability, the combination of CD20/23/5/19/200/62L/3/45 seems to be very favorable in flow cytometric MRD measurement.

Conclusions: Our eight-color FCM protocol could easily detect MRD in MCL patients, and reaches a sensitivity of up to 2×10^{-4} . © 2014 International Clinical Cytometry Society

Key terms: mantle cell lymphoma; minimal residual disease; flow cytometry

How to cite this article: Chovancová J, Bernard T, Stehlíková O, Šálek D, Janíková A, Mayer J, and Doubek M. Detection of Minimal Residual Disease in Mantle Cell Lymphoma—Establishment of Novel Eight-Color Flow Cytometry Approach. *Cytometry Part B* 2015; 88B: 92–100.

The detection of minimal residual disease (MRD) has already been demonstrated to have an undeniable prognostic significance in several hematologic malignancies (1,2). Hence, multicolor flow cytometry (FCM) and polymerase chain reaction (PCR) are effective approaches in B-lineage neoplasm MRD detection (3–6). The most sensitive PCR methods used in mantle cell lymphoma (MCL) use MRD measurement to target either the translocation t(11,14)(q13;q32) or patient-specific clonal immunoglobulin heavy chain gene (IGH) rearrangements (7–9).

MCL represents a disseminated B-cell lymphoma, which usually shows an aggressive clinical course, accounting for 3–10% of all non-Hodgkin lymphomas (8,10). Typically, MCL comprises a pathologic CD5⁺19⁺ population expressing pan-B-cell antigens such as CD20

*Correspondence to: Michael Doubek, MD, PhD, University Hospital and Masaryk University, Jihlavská 20, 62500 Brno, Czech Republic. E-mail: mdoubek@fnbrno.cz

Grant sponsor: CEITEC; Grant number: MSMT CR CZ.1.05/1.1.00/02.0068.

Grant sponsor: SuPreMMe; Grant number: MSMT CR CZ.1.07/2.3.00/20.0045.

Grant sponsor: European Commission under the Health Theme of the 7th Framework Programme for Research and Technological Development; Grant number: GA 306242.

Grant sponsor: Internal Grant Agency, Ministry of Health, Czech Republic; Grant number: NT13493-4/2012.

Grant sponsor: Masaryk University; Grant number: MUNI/A/0830/2013.

Grant sponsor: Czech Leukemia Study Group—for Life.

Received 26 November 2013; Revised 5 November 2014; Accepted 25 November 2014

Published online 25 November 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/cyto.b.21210

and CD22. Moreover, CD10⁺CD23⁺CD43⁺CD200⁺FCM⁺ immunophenotype is characteristic for MCL B-lymphocytes (8,11). Nevertheless, prominent variations in immunophenotype have been reported, which might complicate both standard diagnostics and subsequent disease response monitoring after therapy. Positive CD10 expression often combined with absence of CD5 expression (12,13) is connected with blastoid transformation and may be associated with genetic abnormalities of BCL-6 and Bcl-6 protein expression (14). Negative CD23 expression is considered to be a reliable marker, mainly to distinguish MCL from chronic lymphocytic leukemia (CLL), where positive expression is usually detected. However, in some cases, there was no discrimination between MCL and CLL observed employing CD23 (15,16). From this point of view, CD200 seems to show a much more consistent pattern of differential expression, low in MCL but high in CLL cells (11,17).

Real-time quantitative PCR (RQ-PCR) represents the most widely applied and most sensitive MRD detection in MCL (18). Nevertheless, high expenses and time demands are the major disadvantages of this technique. For example, in patients suffering from CLL, MRD detection using multicolor FCM is widely used compared with an RQ-PCR based approach. In CLL, FCM is a routinely used method enabling rapid sample processing and almost reaching the sensitivity of RQ-PCR (6,19).

The aim of our work was to create a multicolor FCM panel similar to the standardized CLL protocol (5) that could handle an MCL MRD measurement in routine hematologic practice.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Peripheral blood (PB) (5 ml) and/or bone marrow (BM) was collected to EDTA and analyzed from 30 patients (13 women and 17 men; median age, 68.0 years; range, 45–91 years) with newly diagnosed leukemic MCL. MCL diagnosis was based on standard procedures (FCM of PB, and tissue biopsy with routine immunostaining of cyclin D1). The modified Matutes score according to Moreau (20) was calculated as well: in 7 patients the score was 1, in 19 the score was 2, and in the remaining 4 patients the score was 3. Together with the patients' samples, 20 PB samples from healthy donors (13 women and seven men; median age, 38 years; range, 28–81 years) and five BM samples and three lymph node resections from patients undergoing investigation for other hematologic disorder with no sign of MCL were also collected to use as a negative control. Informed consent was obtained from both patients and healthy donors.

Flow Cytometric Analysis

Eight-color FCM was used to analyze the expression of selected surface antigens on MCL cells and normal B-lymphocytes. Monoclonal antibodies used were as fol-

lows: CD5, CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD35, CD38, CD43, CD45, CD62L, CD79b, CD183, CD184, CD196, CD197, and CD200 (Table 1). These antigens were selected for screening based on their roles as B-cell markers, markers that are reported to be useful in MCL diagnosis, markers that are associated with other CD5⁺CD19⁺ disorders, and chemokine receptors. The threshold for antigen positivity was determined using gating of T-cells and comparison of antigen expression on T-cells and malignant cells.

In brief, 100 μ L of whole blood was stained with monoclonal antibodies for 15 min at room temperature. After red cells lysis using FACS Lyse (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), according to the manufacturer's instructions, the cells were washed once with phosphate-buffered saline. FCM analysis was performed using FACSCantoII equipped with FACSDiva Software (Becton Dickinson). From 50,000 to 300,000 leukocytes were analyzed in each tube.

In all cases, B-cells were detected applying a consecutive gating strategy (CD19 versus side scatter dot plot after identifying leukocytes in CD45 versus side scatter dot plot). The percentage of selected surface markers mentioned above was measured together with mean fluorescence intensity on pathologic cell population and normal B-lymphocytes.

Dilution Studies

To determine the sensitivity of the assessment, varying number of events from MCL cases were plotted along with B-cells from normal PB to simulate twofold dilution from 1:1 to 1:16,384 using FCSEXPRESS Software (De Novo Software, Los Angeles, CA).

Statistical Analysis

Nonparametric Mann-Whitney *U*-tests were used to compare the expression of the chosen antigens on normal and neoplastic B-lymphocytes. To allow measurement of the difference in antigen expression between neoplastic and normal cells, the Kolmogorov-Smirnov statistical test was applied (21). This calculates the degree that the provided antigens separate, presented as *D*-value (0, total overlap and 1, greatest separation). Statistical analysis was created in IBM SPSS Statistics (IBM, Armonk, NY), GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA), and MS Excel (Microsoft, Redmond, WA).

RESULTS

MCL Cell Immunophenotype

Descriptive statistics of all measured antigens are shown in Table 2. Applying a commonly used cut-off of 20%, all MCL cells were found to be positive for CD29 and CD184 and negative for CD28 and CD183. Typical B-antigens CD20, CD22, and CD79b had positive expression in more than 90% of patients. Although absence of antigen CD23 is typically used to distinguish MCL from

Table 1
Detailed List of Antibodies Employed in Mantle Cell Lymphoma Cells Immunophenotyping

Antibody	Fluorochrome	Clone	Manufacturer
anti-CD3	FITC	S4.1	Invitrogen (Frederick, MD)
anti-CD3	eFluor450	UCHT1	eBioscience (San Diego, CA)
anti-CD5	PerCP-Cy5.5	L17F12	eBioscience
anti-CD5	V450	L17F12	BD Bioscience (San Jose, CA)
anti-CD10	APC-Cy7	HI10a	BioLegend (San Diego, CA)
anti-CD19	PE-Cy7	J3-119	Immunotech (Marseille, France)
anti-CD19	APC-eFluor780	HIB19	eBioscience
anti-CD20	FITC	HI47	Invitrogen
anti-CD21	PE	HB5	eBioscience
anti-CD22	APC	RFB4	Invitrogen
anti-CD23	APC	EBVCS2	eBioscience
anti-CD24	APC-eFluor780	SN3	eBioscience
anti-CD25	APC-Cy7	M-A251	BD Bioscience
anti-CD26	APC	BA5b	Invitrogen
anti-CD27	APC	O323	eBioscience
anti-CD28	PerCP-Cy5.5	CD28.2	BD Bioscience
anti-CD29	PE	TS2/16	eBioscience
anti-CD35	FITC	J3.D3	Immunotech
anti-CD38	V450	HB7	BD Bioscience
anti-CD43	Pacific Blue	MEM-59	Exbio (Praha, Czech Republic)
Anti-CD45	V500	HI30	BD Bioscience
anti-CD62L	APC-eFluor780	DREG-56	eBioscience
anti-CD79b	FITC	CB3-1	Invitrogen
anti-CD183	PE	1C6/CXR3	BD Bioscience
anti-CD184	PE	12G5	eBioscience
anti-CD196	PE-Cy7	11A9	R&D Systems (Minneapolis, MN)
anti-CD197	PE	150503	R&D Systems
anti-CD200	APC	OX104	eBioscience

Abbreviations of fluorochromes: APC, allophycocyanin; APC-eFluor, an organic dye containing allophycocyanin; eFluor450, an organic dye excited by the violet laser; FITC, fluorescein isothiocyanate; PE, R-phycoerythrin; PE-Cy5, a tandem conjugate that combines phycoerythrin and the cyanin dye Cy5; PE-Cy7, a tandem conjugate that combines phycoerythrin and the cyanin dye Cy7; PerCP-Cy5.5, a tandem conjugate that combines peridinin chlorophyll and cyanin dye Cy5.5; V450, a coumarin dye excited by the violet laser; V500, an organic dye excited by the violet laser.

CLL, it was positive in four cases (13%). Antigens CD62L and CD200 were positive in just one case. For more details see Table 2.

Table 2
Distribution of Measured Antigens in Mantle Cell Lymphoma Cells Present in Peripheral Blood Samples

Antigen	Percent of positive cases	MFI median	MFI range
CD10	13.3	270.0	-1 to 1,121
CD20	96.7	5,846.0	97 to 14,898
CD21	72.4	1,607.0	346 to 4,168
CD22	96.7	3,052.0	1,867 to 8,042
CD23	13.3 (6.6% dim)	230.0	-96 to 1,684
CD24	86.6	1,847.0	-64 to 5,008
CD25	8.7	407.0	72 to 1,003
CD26	13.3	843.0	139 to 8,451
CD27	92.6	2,036.0	605 to 4,686
CD28	0.0	32.0	28 to 86
CD29	100.0	1,666.0	323 to 2,437
CD35	86.7	613.0	194 to 1,515
CD38	72.4	357.5	-268 to 10,899
CD43	36.6 (33.3% dim)	227.0	-191 to 1,531
CD62L	3.3	570.0	44 to 1,907
CD79b	91.3	2,863.0	406 to 15,338
CD183	0.0	79.5	-317 to 316
CD184	100.0	5,143.0	1,321 to 9,899
CD196	7.4	263.0	40 to 735
CD197	85.2	1,232.0	215 to 5,490
CD200	3.3	105.0	-235 to 720

In the next step, expression of the chosen antigens on neoplastic cells was compared with that of healthy controls. Significantly, lower expression of the antigens

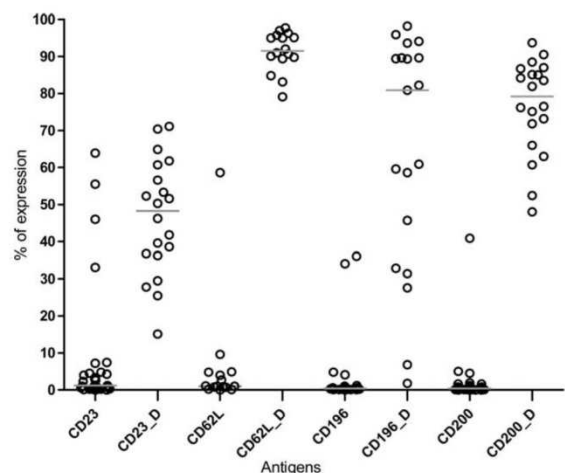


Fig. 1. CD antigens that differentiate between normal and neoplastic/mantle-cell lymphoma B-lymphocytes expressed as a percentage of positivity. Peripheral blood samples analysis. The gray lines show median. CD23_D/CD62L_D/CD196_D/CD200_D-expression of particular antigen in healthy donors.

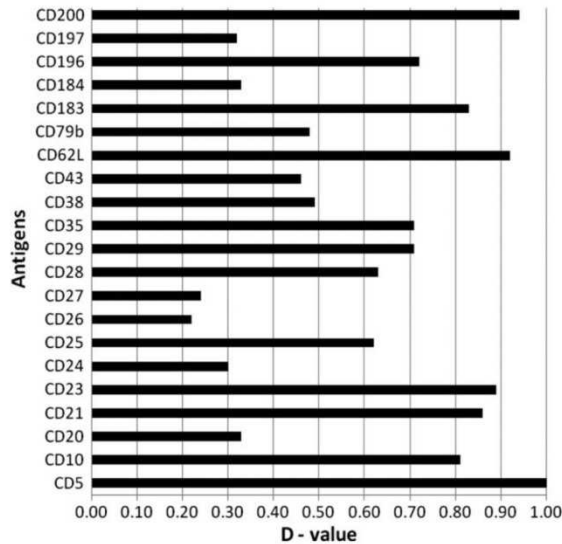


Fig. 2. Kolmogorov-Smirnov test D -values showing the degree of separation (neoplastic cells versus normal B-cells) of listed antigens (0, complete overlap and 1, complete separation). Peripheral blood samples analysis. No antigen was observed to be significantly brighter in mantle cell lymphoma than in normal B-cells, apart from CD5.

CD23, CD62L, CD196, and CD200 ($p < 0.0001$) was found on the MCL cells. The comparison of the expression level is shown in Figure 1.

Searching for Antigens That Enable Us to Distinguish MCL Cells from Healthy B-Lymphocytes

To define particular antibodies that could completely separate MCL lymphocytes from normal B-cells, the mean fluorescence intensity of the listed antibodies was measured, and the Kolmogorov-Smirnov statistical test was applied. Each antibody except CD5 ($D = 1.0$) demonstrated some degree of expression overlap between normal and pathologic cells. Nevertheless, the greatest separation was presented in CD23, CD62L, and CD200 ($D > 0.88$) (Fig. 2).

Determination of Antibody Combination for MRD Detection

Because no single antigen has been found that could discriminate normal B-lymphocytes from MCL cells, antigens with the highest D value (CD5, CD23, CD62L, and CD200) were combined with the pan-B markers CD19 and CD20 to establish a panel for MRD analysis. The regions were set around neoplastic cells identified by two markers—CD5 versus CD200, CD23 versus CD200, and CD20 versus CD62L—in seven PB samples positive for MCL (the regions contained more than 95% of MCL

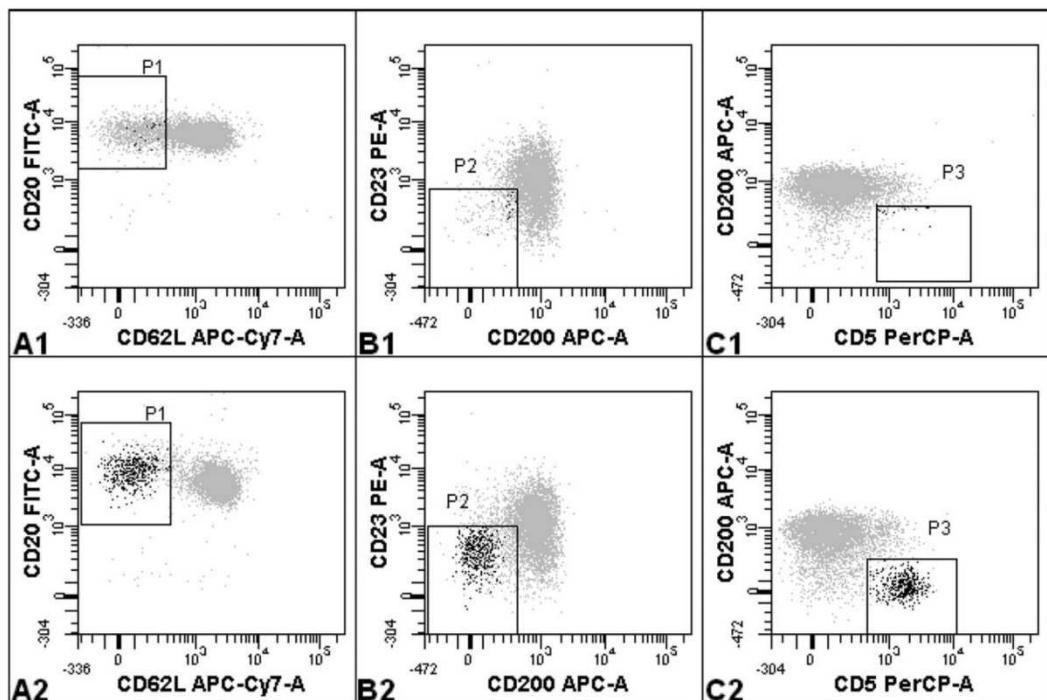


Fig. 3. Illustrative dot plots of minimal residual disease (MRD) panel antigens comparing peripheral blood from healthy control (A1–C1) and detectable MRD in MCL patient (A2–C2). Intersects of P1 and P2 and P3 gates are colored black. Note that MCL MRD shows a discrete cluster of aberrant cells (about 0.1% of total events) in contrast to healthy control, where a discrete cluster of aberrant cells does not appear (about 0.005% of total events), and this specimen would be scored as negative. All dot plots show the total of CD19⁺ B-lineage cells.

Table 3
Levels of B Lymphocytes (% from Leukocytes) in Normal Individuals Expressing Mantle-Cell Lymphoma Immunophenotype Detected by Eight-Color MRD Panel

Antigen combination	Median (range)			
	PB	BM	LN	
CD5 ⁺ 19 ⁺	0.4 (0.2–4.8)	0.6 (0.3–3.3)	5.8 (5.2–6.1)	% from leukocytes
CD5 ⁺ 19 ⁺ 20 ⁺ 23 ⁺ 62L ⁺ 200 ⁺	0.02 (0.00–0.02)	0.01 (0.01–0.02)	0.01 (0.00–0.02)	
CD5 ⁺ 200 ⁺ (gate P3 in Figure 3)	2.2 (0.9–4.5)	0.8 (0.2–1.9)	0.4 (0.3–0.5)	% from CD19 ⁺ cells
CD23 ⁺ 200 ⁺ (gate P2 in Figure 3)	22.4 (3.8–44.9)	18.6 (8.4–68.7)	11.6 (11.7–18.8)	
CD20 ⁺ 62L ⁺ (gate P1 in Figure 3)	6.3 (2.3–15.0)	14.3 (7.1–26.3)	50.9 (12.5–87.3)	
CD5 ⁺ 19 ⁺ 20 ⁺ 23 ⁺ 62L ⁺ 200 ⁺	0.3 (0.0–0.7)	0.1 (0.1–0.2)	0.03 (0.01–0.05)	

BM, bone marrow; LN, lymph node; PB, peripheral blood.

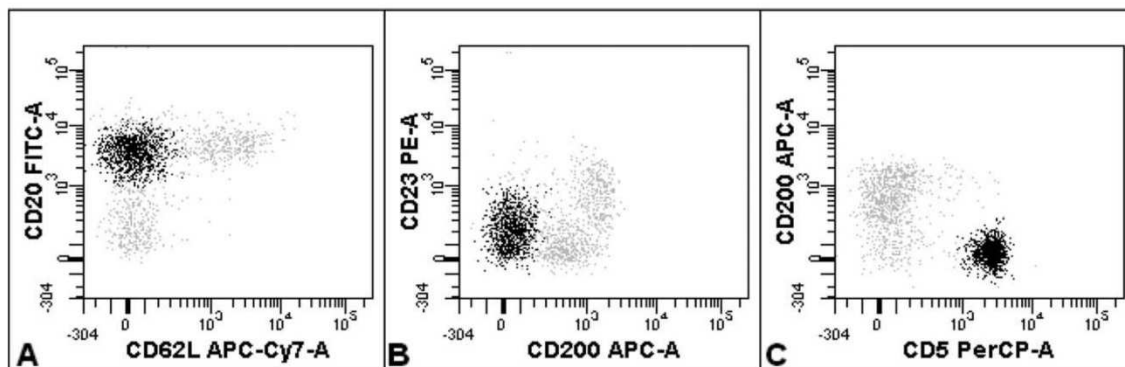


Fig. 4. Comparison of MRD panel antigens in bone marrow showing MCL cell expression (black population) and normal B-cell expression (light gray population). (A) Antigen CD20 versus CD62L; (B) Antigen CD23 versus CD200; and (C) Antigen CD200 versus CD5.

cells) and then applied to seven healthy controls (Fig. 3). In the next step, CD3 was used to ensure that no CD3⁺ cells would be included in the analysis. The percentage of cells with phenotype CD5⁺19⁺20⁺23⁺62L⁺200⁺ was calculated. The same procedure was applied for five BM samples positive for MCL and five controls. The results are shown in Table 3. The comparison of MCL cell and normal B-lymphocytes expression is illustrated in Figure 4. Moreover, the same strategy was applied to non-MCL lymph nodes to assess that our antigen combination could be used for this tissue analysis (Table 3).

The complete suggested MRD panel is presented in Table 4. Antigens CD3 and CD20 are used to exclude contamination of events that are definitely not B-lymphocytes (expressing phenotype CD3⁺20⁺).

Sensitivity of Our MRD Flow Cytometric Protocol and Its Comparison with Three-Color FCM (Dilution Study I)

To determine the sensitivity of the MRD panel, serial virtual dilution studies were performed. Previously stained and assessed MCL cells from patients with the most frequent phenotype CD5⁺/dim⁺CD19⁺CD20⁺CD23⁺CD62L⁺CD200⁺ were plotted in varying number along with B-cells from normal PB to simulate twofold dilution from 1:1 to 1:16,384 using FCSEXPRESS Software (De Novo Software). Then,

the percentage of MCL cell in the test was calculated, and two different analysis strategies were compared: commonly used CD5⁺19⁺ coexpression (three-color FCM using antigen combination CD5/19/45) and our novel eight-color MRD analysis. The results of these two approaches were compared with the actual number of MCL cells in the sample. The results are shown in Figure 5.

Because our data demonstrate up to 4.8% of CD5⁺19⁺ cells (of total leukocytes) in normal PB and 3.3% in normal blood marrow, the eight-color approach brings much more accuracy to the measurement, especially when a small number of MCL cell is analyzed.

Table 4
Proposal of Our Eight-Color Flow Cytometric Protocol Suitable for Minimal Residual Disease Detection in Mantle-Cell Lymphoma

Fluorochrome	Antigen
FITC	CD20
PE	CD23
PerCP-Cy5.5	CD5
PE-Cy7	CD19
APC	CD200
APC-eFluor 780	CD62L
eFluor 450	CD3
V500	CD45

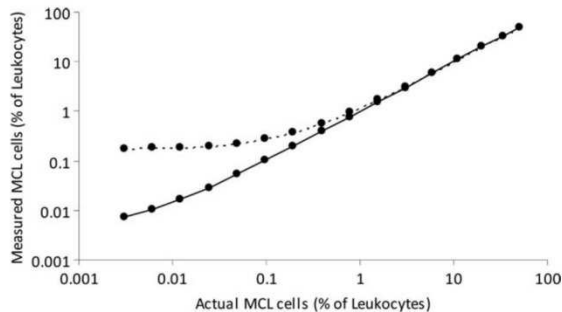


Fig. 5. Representative plot of virtual dilution study demonstrating increasing sensitivity and accuracy of eight-color minimal residual disease (MRD) protocol compared with three-color (CD5/19/45) flow cytometry in peripheral blood sample. The graphs show the percentage of mantle cell lymphoma (MCL) cells detected with three-color flow cytometry (dotted line) and MCL cells detected with eight-color flow cytometry (MRD protocol; solid line) against the percentage of actual MCL cells.

Considering $CD5^{+}/dim$ cases, the sensitivity of our eight-color panel reaches up to 2×10^{-4} (detection of 0.02% of MCL cells in normal PB). To achieve a limit of detection of 0.02%, 250,000 leukocytes with a minimum MRD population size of 50 cells must be acquired. The gating strategy of MRD measurement is demonstrated in Figure 6.

The same strategy was employed to lymph node tissue, reaching the sensitivity up to 0.25%; however, the FCM MRD panel was not primarily tested in lymph node

samples and could bring some inconsistency because of small number of samples analyzed.

Although some of the B-lymphocytes in normal donors' samples occupy suggested P1, P2, and P3 gates (Table 3), they do not seem (unlike MCL lymphocytes) to represent a discrete cluster of aberrant cells, and, therefore, the specimens would not be scored as positive (Fig. 3).

Sensitivity of Our MRD Flow Cytometric Protocol Performed in the Cases with Atypical Phenotype (Dilution Study II)

The limitation of our proposed panel remains in cases with atypical MCL phenotype with low expression levels of CD5 and/or high expression levels of CD23, CD62L, and/or CD200. For that reason, again, virtual dilution study was performed to assess whether the MRD panel is applicable for these outlier cases. MRD panel data files containing MCL cells from patients with atypical phenotypes and B-cells from normal donor were plotted along with each other employing FCSEXPRESS Software (De Novo Software). The number of MCL cells plotted varied to simulate twofold dilution from 1:1 to 1:16,384. Then, the actual and the measured level of MCL cells were calculated. The results are shown in Figure 7.

The poorest sensitivity around 0.1% is represented by $CD5^{-}$ cases, but it is still higher compared with three-color assessment. Remaining antigen outliers sensitivity is getting close to 0.02% as reported in typical MCL

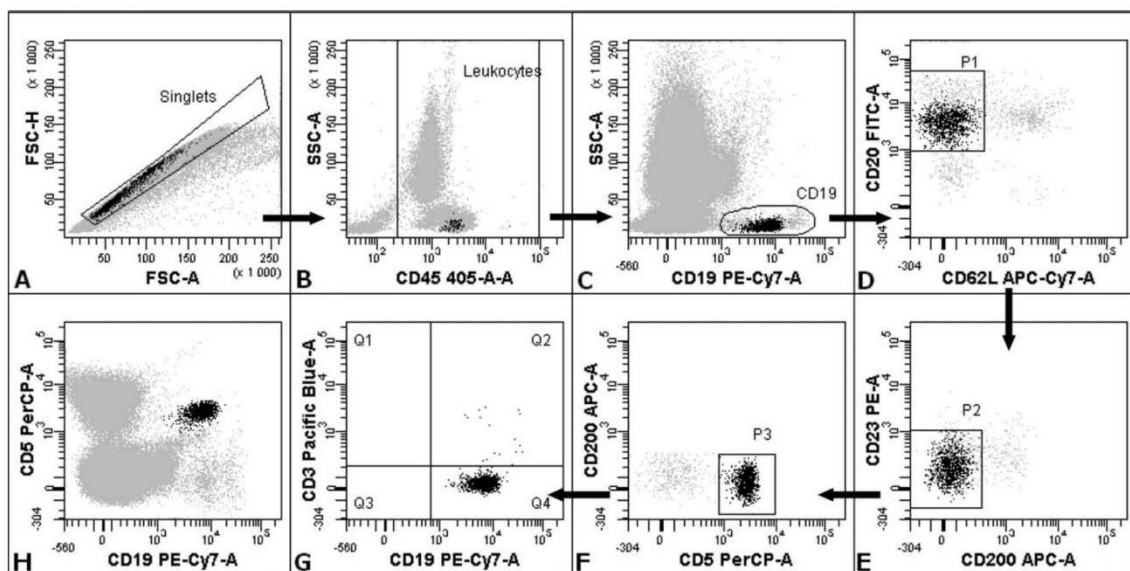


Fig. 6. Flow cytometric gating strategy of minimal residual disease (MRD) of peripheral blood sample detection in mantle cell lymphoma (MCL) based on our eight-color protocol. (A) Exclusion of doublets and debris from the analysis. (B) Gating of leukocytes (CD45 versus SSC) from singlets; (C) Gating of B-lymphocytes from leukocytes (CD19 versus SSC); (D) Gating of $CD20^{+}62L^{-}$ cells from B-lymphocytes; (E) Gating of $CD23^{-}200^{-}$ cells from P1 population; (F) Gating of $CD200^{-}5^{+}$ cells from P2 population; (G) Final exclusion of contaminating $CD3^{+}$ T-cells and $CD19^{+}$ cells from P3 gate, Q4 shows resultant MRD level; and (H) MRD cells (black population) in the context of all lymphocytes (gray population) representing 0.58% of PB leukocytes.

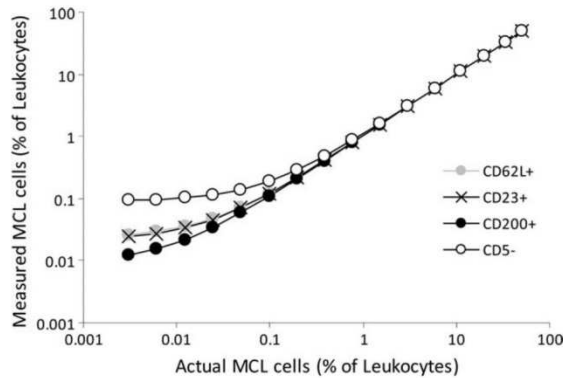


Fig. 7. Representative plot of virtual dilution study demonstrating sensitivity of eight-color minimal residual disease (MRD) protocol in patients with atypical MCL phenotype. The poorest sensitivity around 0.1% is represented by CD5⁻ cases.

phenotype. Gating of CD5⁻ cases compared with CD5^{dim} is illustrated in Figure 8.

DISCUSSION

Our study confirmed that the MCL immunophenotype varies widely. From more than 20 antigens evaluated, only CD5, CD62L, and CD200 were qualified as showing consistent differential expression to distinguish MCL cells from normal B-lymphocytes. Moreover, marker CD200 may be used as a diagnostic tool to differentiate MCL from CLL. In contrast to MCL, CLL cells show positive expression of this marker (11).

Antigen CD23 also plays an important role in MCL diagnosis. Although its expression varies quite frequently, it is still considered a useful marker for distinguishing MCL from CLL samples (16,22,23). Our results (just 13% of patients CD23⁺ or CD23^{dim}) correspond to studies already published where CD23 positivity in MCL ranged between 0% and 29% using the FCM approach (15,16). CD23 expression variability hampers the use of our eight-color panel for MCL MRD detection without analyzing MCL immunophenotype at diagnosis. According to our results, newly diagnosed MCL needs to be the subject of detailed immunophenotype evaluation, which is necessary for subsequent FCM MRD detection after therapy.

A previous study (24) describe antigen CD43 positivity as an aberrant marker in MCL, which would be helpful in MRD detection similar to the standardized MRD protocol in CLL (5). However, 63% of our samples did not match these data as they were found CD43-negative (just 4% of our samples show positive expression; the rest were CD43^{dim}). The possible reason could be in the employed fluorescent conjugate, which in our case (Pacific Blue) seems to be relatively dim. Moreover, it is also possible that MCL in PB may show dimmer expression of CD43 than previously reported cases involving lymphoid tissue.

L-selectin (CD62L) expressed on leukocytes contributes to their recruitment from the blood to the inflammatory areas (25). Recently, it seems to be a possible targeted receptor in CLL treatment (26). In our MCL analysis, CD62L is consistently negative, which is in concordance with another study (27).

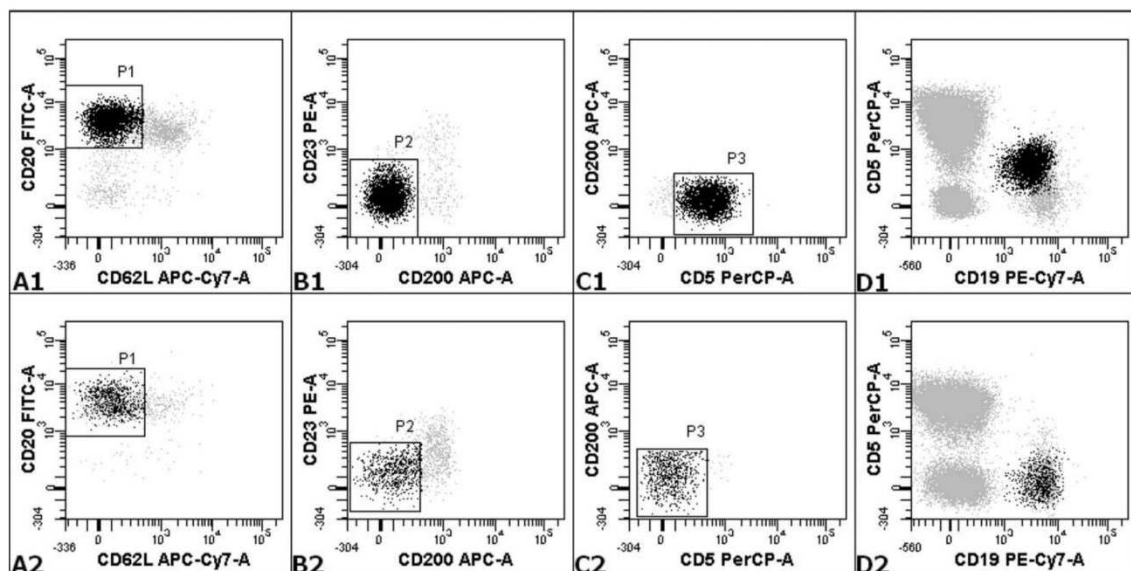


Fig. 8. Consecutive gating of MCL cells in CD5^{dim} bone marrow (A1–C1) and CD5⁻ peripheral blood samples (A2–C2). (D1, D2) MRD population (colored black) in the context of all lymphocytes.

For MCL MRD detection, the simple analysis of only CD5 and CD19 antigens is not sufficient, because there is a CD5 and CD19 positive population found commonly in normal PB (28,29).

The variability of the antigen expression in MCL complicates MRD monitoring mainly because of the initial phenotype that needs to be measured and which separates the gating strategy in atypical phenotype cases. However, MRD detection based on an initial phenotype is a routinely used strategy in many hematologic malignancies (i.e., ALL) (4), and the employment of single tube analysis can simplify the laboratory practice. Still, we report the eight-color MRD FCM protocol based on the differential expression of antigens from MCL cells compared with healthy B-lymphocytes. To identify normal and pathologic B-cell population, Boolean combination of gates was used. This analytical approach was chosen from the spectrum of well-defined methodologies of MRD detection, including, e.g., application of fixed templates of dual parameter displays generated after the previous analysis of normal cells (30). Likewise, Boolean combination of gates is as well a broadly used method for MRD detection in many hematologic malignancies (19,31).

Our assay does not reach the sensitivity of RQ-PCR, which remains a gold standard for MRD analysis in MCL (18), but could be more readily implemented in routine hematologic practice because of low costs and rapid sample processing. Nevertheless, a comparison between our MRD FCM panel and RQ-PCR results in treated patients needs to be done to prove the sensitivity and assess the real applicability of the reported MRD panel. The limitation of MRD FCM panel could be observed during the anti-CD20 therapy, where CD20 expression decreases and do not restore until therapy termination. Nevertheless, during and shortly after anti-CD20 therapy, there is deep depletion of all CD19⁺ cells, and MRD analysis is therefore not possible until the therapy is terminated.

In summary, our analysis shows the high applicability and sensitivity of multicolor FCM assay applying a unique eight-color staining combination of monoclonal antibodies to monitor the therapy response in MCL patients.

LITERATURE CITED

1. Doubek M, Palasek I, Pospisil Z, Borsky M, Klabusay M, Brychtova Y, Jurcek T, Jeziskova I, Krejci M, Dvorakova D, et al. Detection and treatment of molecular relapse in acute myeloid leukemia with RUNX1 (AML1), CBFB, or MLL gene translocations: Frequent quantitative monitoring of molecular markers in different compartments and correlation with WT1 gene expression. *Exp Hematol* 2009;37:659–672.
2. Giebel S, Stella-Holowiecka B, Krawczyk-Kulis M, Goekbuget N, Hoelzer D, Doubek M, Mayer J, Piatkowska-Jakubas B, Skotnicki AB, Dombret H, et al. Status of minimal residual disease determines outcome of autologous hematopoietic SCT in adult ALL. *Bone Marrow Transpl* 2010;45:1095–1101.
3. Boettcher S, Ritgen M, Buske S, Gesk S, Mapper W, Hoster E, Hiddemann W, Unterhalt M, Dreyling M, Siebert R, et al. Minimal residual disease detection in mantle cell lymphoma: Methods and significance of four-color flow cytometry compared to consensus IGH-polymerase chain reaction at initial staging and for follow-up examinations. *Haematologica* 2008;93:551–559.
4. Dworzak MN, Froschl G, Printz D, Mann G, Potschger U, Muhlegger N, Fritsch G, Gadner H, Austrian B-F-M. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99:1952–1958.
5. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Boettcher S, Ghia P, Zehnder JL, Lozanski G, Colomer D, Moreno C, Geuna M, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2007;21:956–964.
6. Stehlikova O, Chovancova J, Tichy B, Krejci M, Brychtova Y, Panovska A, Francova Skuhrova H, Burckova K, Borsky M, Loja T, et al. Detection of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia patients using 8 color flow cytometry protocol. *Int J Lab Hematol* 2014;36:165–171.
7. Andersen NS, Donovan JW, Borus JS, Poor CM, Neuberg D, Aster JC, Nadler LM, Freedman AS, Gribben JG. Failure of immunologic purging in mantle cell lymphoma assessed by polymerase chain reaction detection of minimal residual disease. *Blood* 1997;90:4212–4221.
8. Gao J, Peterson L, Nelson B, Goolsby C, Chen YH. Immunophenotypic variations in mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2009;132:699–706.
9. Gianni AM, Magni M, Martelli M, Di Nicola M, Carlo-Stella C, Pilotti S, Rambaldi A, Cortelazzo S, Patti C, Parvis G, et al. Long-term remission in mantle cell lymphoma following high-dose sequential chemotherapy and in vivo rituximab-purged stem cell autografting (RHDS regimen). *Blood* 2003;102:749–755.
10. Ghielmini M, Zucca E, How I treat mantle cell lymphoma. *Blood* 2009;114:1469–1476.
11. Palumbo GA, Parrinello N, Fargione G, Cardillo K, Chiarenza A, Berretta S, Conticello C, Villari L, Di Raimondo F. CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2009;33:1212–1216.
12. Liu Z, Dong HY, Gorczyca W, Tsang P, Cohen P, Stephenson CF, Berger CS, Wu CD, Weisberger J. CD5-mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2002;118:216–224.
13. Morice WG, Hodnefield JM, Kurtin PJ, Hanson CA. An unusual case of leukemic mantle cell lymphoma with a blastoid component showing loss of CD5 and aberrant expression of CD10. *Am J Clin Pathol* 2004;122:122–127.
14. Zanetto U, Dong H, Huang Y, Zhang K, Narbaitz M, Sapia S, Kostopoulos I, Liu H, Du MQ, Bacon CM. Mantle cell lymphoma with aberrant expression of CD10. *Histopathology* 2008;53:20–29.
15. Barna G, Reiniger L, Tatrai P, Kopper L, Matolcsy A. The cut-off levels of CD23 expression in the differential diagnosis of MCL and CLL. *Hematol Oncol* 2008;26:167–170.
16. Schlette E, Fu K, Medeiros LJ. CD23 expression in mantle cell lymphoma: Clinicopathologic features of 18 cases. *Am J Clin Pathol* 2003;120:760–766.
17. Sandes AF, de Lourdes Chauffaille M, Oliveira CR, Maekawa Y, Tamashiro N, Takao TT, Ritter EC, Rizzatti EG. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. *Cytometry Part B* 2014;86B:98–105.
18. Pott C, Bruggemann M, Ritgen M, van der Velden VHJ, van Dongen JJM, Kneba M. MRD detection in B-cell non-Hodgkin lymphomas using Ig gene rearrangements and chromosomal translocations as targets for real-time quantitative PCR. *Methods Mol Biol* 2013;971:175–200.
19. Rawstron AC, Boettcher S, Lestestu R, Villamor N, Fazi C, Kartsios H, de Tute RM, Shingles J, Ritgen M, Moreno C, et al. Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. *Leukemia* 2013;27:142–149.
20. Moreau EJ, Matutes E, Ahern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, Seon BK, Catovsky D. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol* 1997;108:378–382.
21. Lampariello E. On the use of the Kolmogorov-Smirnov statistical test for immunofluorescence histogram comparison. *Cytometry* 2000;39:179–188.
22. Gong JZ, Lagoo AS, Peters D, Horvatinovich J, Benz P, Buckley PJ. Value of CD23 determination by flow cytometry in differentiating mantle cell lymphoma from chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2001;116:893–897.
23. Medd PG, Clark N, Leyden K, Turner S, Strefford JA, Butler C, Coffins GP, Roberts DJ, Atoyebi W, Hatton CSR. A novel scoring system combining expression of CD23, CD20, and CD38 with platelet

- count predicts for the presence of the t(11;14) translocation of mantle cell lymphoma. *Cytometry Part B* 2011;80B:230-237.
24. Lai R, Weiss LM, Chang KL, Arber DA. Frequency of CD43 expression in non-Hodgkin lymphoma—A survey of 742 cases and further characterization of rare CD43(+) follicular lymphomas. *Am J Clin Pathol* 1999;111:488-494.
 25. McEver RP, Zhu C. Rolling cell adhesion. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010;26:363-396.
 26. Burgess M, Gill DS, Singhanian R, Cheung C, Chambers L, Reynolds BA, Smith L, Mollee P, Saunders NA, McMillan NA. CD62L as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2013;19:5675-5685.
 27. Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Vassilakopoulos TP, Kontopidou FN, Rassidakis GZ, Dimopoulou MN, Kittas C, Pangalis GA. The splenic form of mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2002;68:12-21.
 28. Durrieu F, Genevieve F, Arnoulet C, Brumpt C, Capod J-C, Degenne M, Feuillard J, Garand R, Kara-Terki A, Kulhein E, et al. Normal levels of peripheral CD19(+)CD5(+) CLL-like cells: Toward a defined threshold for CLL follow-up—A GEIL-GOELAMS Study. *Cytometry Part B* 2011;80B:346-353.
 29. Gupta R, Jain P, Deo SVS, Sharma A. Flow cytometric analysis of CD5+B cells—A frame of reference for minimal residual disease analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2004;121:368-372.
 30. Weir EG, Cowan K, LeBeau P, Borowitz MJ. A limited antibody panel can distinguish B-precursor acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with four color flow cytometry: Implications for residual disease detection. *Leukemia* 1999;13:555-567.
 31. Kern W, Danhauser-Riedl S, Ratci R, Schnittger S, Schoch C, Kolg HJ, Ludvig WD, Hiddemann W, Haferlach T. Detection of minimal residual disease in unselected patients with acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry for definition of leukemia-associated immunophenotypes and determination of their frequencies in normal bone marrow. *Haematologica* 2003;88:646-653.

14.2 Příl. 2: Ukázka analýzy 8-FCM panelu MCL MRD

