

## MOŽNOSTI PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE V DIAGNOSTICE POSTIŽENÍ KOSTNÍ DŘENĚ U PACIENTŮ S NEHODGKINSKÝMI LYMFOMY

### THE ROLE OF FLOW CYTOMETRY IN DETECTION OF BONE MARROW INFILTRATION IN PATIENTS WITH NON-HODGKIN'S LYMPHOMAS

DOUBEK M., KLABUSAY M., NAVRÁTIL M.

II. INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA FN BRNO

**Souhrn:** *Východisko.* Cílem práce bylo analyzovat a srovnat výsledky vyšetření kostní dřeně u pacientů s nehodgkinskými lymfomy získané průtokovou cytometrií, histologicky a cytologicky. *Metoda a soubor nemocných.* U 59 vzorků kostní dřeně pacientů s nehodgkinskými lymfomy (NHL) bylo retrospektivně provedeno srovnání nálezů vyšetření průtokovou cytometrií, vyšetření histologického a cytologického. V terminologii NHL jsme vycházeli z REAL klasifikace. B-NHL bylo v našem souboru 94,9 %, T-NHL 5,1 %. *Výsledky.* Zjistili jsme 71,2% shodu průtokové cytometrie, histologie a cytologie v diagnostice infiltrace kostní dřeně buňkami NHL a 60,9% shodu diagnózy určené průtokovou cytometrií s diagnózou histologickou. V práci dále zvlášť rozebíráme nálezy u každého z typů NHL. *Závěr.* Na základě našich zjištění lze vyšetření kostní dřeně průtokovou cytometrií u pacientů s NHL doporučit.

**Klíčová slova:** Cytologie, Histologie, Kostní dřeň, Nehodgkinské lymfomy, Průtoková cytometrie

**Summary:** *Background.* We decided to confirm results of flow cytometry, histology and cytology in the detection of bone marrow infiltration in patients with non-Hodgkin's lymphomas. *Design and Subjects.* In a retrospective study, we examined the correlation between flow cytometric, histological, and cytological findings in bone marrow of 59 patients treated in our department. According to the REAL classification, the distribution of all cases of NHL was as follows: 94.9 % B-cell NHLs, and 5.1 % T-cell NHLs. *Results.* A 71.2 % conformity of flow cytometric, histological, and cytological findings in evaluation of bone marrow infiltration was observed. A 60.9 % conformity between flow cytometric diagnosis and histological diagnosis was found. A discussion of individual types of NHLs and their histological and flow cytometric diagnostics follow. *Conclusion.* We recommend flow cytometric analysis of bone marrow in patients with non-Hodgkin's lymphomas.

**Key words:** Bone Marrow, Cytology, Flow Cytometry, Histology, Non-Hodgkin's Lymphomas

#### Úvod

Imunologické klasifikaci nehodgkinských lymfomů (NHL) byla již ve světě věnována řada publikací. Také v českém písemnictví lze najít práce na toto téma (1), přičemž některé z těchto sdělení vycházejí přímo z našeho pracoviště (1, 2). V následujících odstavcích se chceme pokusit zhodnotit možnosti a přínos použití průtokové cytometrie (*flowcytometrie*, imunofenotypizace) k diagnostice postižení kostní dřeně u pacientů s NHL. Vycházíme z výsledků získaných v naší laboratoři průtokové cytometrie.

#### Soubor pacientů a metoda

Celkem jsme retrospektivně analyzovali 59 vzorků kostní dřeně odebraných trepanobiopsií kosti kyčelní v rámci *stagingu* či *restagingu* choroby u pacientů s NHL. Jednalo se o nemocné léčené na našem pracovišti v letech 1997 a 1998, u nichž byl vzorek kostní dřeně vyšetřen zároveň histologicky, cytologicky i pomocí průtokové cytometrie. Sledovali jsme jednak míru shody všech tří vyšetření v tom, zda je kostní dřeň vůbec základní chorobou postižena. V případech, kdy tomu tak bylo, jsme analyzovali míru shody diagnózy *flowcytometrické* s diagnózou histologickou.

Průměrný věk našich pacientů byl 56 let (medián 57 let, nejnížší věk 23 let, nejvyšší 74 let). Žen bylo 18 (30,5 %), mužů 41 (69,5 %). U všech pacientů byla diagnóza NHL stanovena

histologicky, ve všech případech z jiného materiálu než z kostní dřeně. Nejčastěji byla diagnóza určena vyšetřením lymfatických uzlin. Během sledovaného období zemřelo 14 pacientů. Korelace sledovaných vyšetření s pitevním nálezem ale nebyla hodnocena, neboť pitváno bylo jen 6 osob a ještě k tomu smrt nastala vždy až ve významném časovém odstupu od provedení trepanobiopsie.

Při popisu jednotlivých NHL v textu vycházíme z REAL klasifikace (*A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*) (8, 9). Naprostá většina pacientů, 56 (94,9 %), byla postižena NHL B řady, jen 3 (5,1 %) NHL T řady. Jedná se o diagnózy stanovené na základě histologického vyšetření. Nejvíce nemocných, 20, mělo difúzní velkobuněčný B lymfom, 14 lymfom folikulárního centra, 9 lymfom plášťové zóny, 4 lymfoplazmocytoidní lymfom (imunocytom), 3 lymfocytární lymfom z malých lymfocytů, 2 nodální B lymfom marginální zóny, 1 extranodální B lymfom marginální zóny (MALT lymfom, *lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue*), 2 nemocní měli histologicky blíže neurčený B NHL střední malignity a 1 nemocný blíže neurčený B NHL vysoké malignity; z T NHL měli všichni 3 nemocní periferní T buněčný nespecifikovaný lymfom.

Vzorky kostní dřeně v laboratoři průtokové cytometrie byly zpracovány v den odběru. Do několika zkumavek jsme pipetovali množství vzorku obsahující  $10^6$  leukocytů. Vyšetření

kostní dřeně jsme prováděli podle standardních protokolů, ve kterých byly užity dvojkombované protilátky firem Immunotech, Caltag Laboratories a Becton Dickinson značené fykocytrinem (PE) nebo fluoresceinem (FITC). Vzorky jsme inkubovali s protilátkami 25 minut ve tmě při teplotě 4 °C. Následovala lýza erytrocytů standardní metodou přístrojem Coulter Q-PREP (hypotonická lýza 0,12% kyselinou mravenčí, úprava pH a osmolalita vzorku roztokem Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaCl a Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fixace paraformaldehydem). Základní panel zahrnoval vyšetření těchto kombinací znaků: CD 45/CD 14, CD 5/CD 19, CD 38/CD 34, CD 10/HLA DR. Další antigeny byly doplněny individuálně podle zjištěné linie patologického klonu. Statistické hodnocení jsme provedli párovým t-testem.

## Výsledky

Tři srovnávaná vyšetření, vyšetření průtokovou cytometrií, histologické a cytologické, se shodovala v hodnocení kostní dřeně, zda je či není postižena NHL, ve 42 případech (71,2 %). Počet vzorků, u nichž všemi třemi metodami nebylo sledováno postižení kostní dřeně, byl 21 (35,6 %). Imunofenotypizace se s histologií shodovala ve 47 případech (79,7 %) a neshodovala ve 12 případech (20,3 %). Z těchto 12 případů bylo u 3 vzorků pozitivní pouze vyšetření histologické a u zbylých 9 pouze imunofenotypizační. Imunofenotypizace a cytologie se shodovaly v tom, zda dřeň je nebo není infiltrována buňkami NHL, v 53 případech (89,8 %). Z 6 (10,2 %) případů neshody byla jenom cytologie pozitivní u 1 pacienta a jenom *flowcytometrie* u 5 nemocných. Shoda histologické diagnózy a průtokové cytometrie u histologicky i imunofenotypizačně pozitivních nálezů infiltrace kostní dřeně, celkem 23 vzorků, byla následující: U 14 analýz (60,9 %) imunofenotypizace potvrzovala nebo vylučovala histologickou diagnózu, u 9 analýz (39,1 %) se s ní naopak neshodovala. Při hodnocení procentuálního zastoupení patologické buněčné populace v kostní dřeni jsme mohli srovnat pouze výsledky *flowcytometrie* a cytologie, neboť histologicky byla hodnocena jen přítomnost či nepřítomnost patologických buněk, nikoliv jejich počty. Z 21 vzorků takto srovnávaných ukázalo cytomorfológické vyšetření vyšší infiltraci dřeně než *flowcytometrie* u 8 nemocných, ve zbylých 13 případech tomu bylo naopak. Pro velmi velký rozptyl hodnot vyšly ale tyto rozdíly po vyhodnocení párovým t-testem jako statisticky nesignifikantní.

Výsledky u jednotlivých typů NHL:

B NHL.

**Difúzní velkobuněčný B lymfom.** 20 vzorků. Podle Kielské klasifikace bylo 8 těchto lymfomů imunoblastických, 8 centroblastických, 3 blíže histologicky neurčené a 1 centroblastický s přechodem do imunoblastického. Ve 12 případech se tři sledované metody shodly v tom, že kostní dřeň tumorem není postižena. Ve 2 případech byla pozitivní imunofenotypizace a histologie negativní, v jednom případě tomu bylo naopak. Znak CD 5 byl pozitivní v jednom případě, slabě pozitivní (*dim*) ve dvou a negativní ve třech. Znak CD 10 byl pozitivní u jednoho nemocného, slabě pozitivní u třech a negativní u ostatních. HLA DR byl negativní u dvou pacientů, slabě pozitivní u tří a negativní opět u dvou, CD 38 byl pozitivní u 5 nemocných. B lymfocytární antigeny CD 19, CD 20, CD 21 a CD 22 byly pozitivní vždy. Povrchové a intracelulární imunoglobuliny vyšetřovány nebyly.

**Lymfom folikulárního centra.** 14 vzorků (z toho histologicky stupeň III [střední malignita] 1 vzorek). Infiltrace kostní dřeně byla zjištěna histologicky nebo imunofenotypizačně v 7 případech. Obě metody se shodly v nálezů postižení dřeně u 5 vzorků. Jeden byl hodnocen jako pozitivní jen histologicky a jeden jen *flowcytometricky*. Antigen CD 5 byl pozitivní ve dvou případech, negativní ve zbylých čtyřech, CD 10 byl pozitivní pouze v jediném případě stejně jako CD 11c. Pan B-antigeny byly vždy pozitivní (CD 19, CD 20, CD 21 a CD 22), CD 23 a CD 38 byly pozitivní ve třech případech. U poloviny vzorků byla prokázána exprese HLA DR

antigenů. Povrchový imunoglobulin byl pozitivní v obou případech, kdy byl vyšetřován.

**Lymfom plášťové zóny (mantle cell).** 9 vzorků. Shoda histologie a imunofenotypizace v nálezů postižení kostní dřeně byla v 6 případech, neshoda ve 3 (1x pozitivní jen histologie, 2x jen *flowcytometrie*). Dva případy původně hodnotil histolog jako chronickou lymfatickou leukemii (CLL). Imunofenotyp: u šesti vzorků (včetně těch histologicky hodnocených jako CLL) byla nalezena typická exprese antigenů CD 5+, CD 19+, CD 23-. Ve dvou případech kombinace CD 5+, CD 19+, CD 23+, respektive CD 5-, CD 19+, CD 23+. Z dalších antigenů: znak CD 10 nebyl detekován v žádném případě, CD 20, CD 21, CD 22, CD 79a a HLA DR naopak ve všech. CD 38 znak byl pozitivní ve 2/3 případů ale negativní v 1/3. V jednom případě byl nalezen pozitivní povrchový imunoglobulin D, v jednom povrchový volný řetězec κ.

**Lymfoplazmocytoïdní lymfom (imunocytom).** 4 vzorky, 2 z nich negativní, 2 s nálezem infiltrace dřeně všemi třemi metodami. Jeden vzorek nesl znaky CD 5+, CD 19+, CD 23+, HLA DR +/-, druhý CD 5-, CD 19+, CD 20+, CD 38+.

**Lymfocytární lymfom z malých lymfocytů.** 3 vzorky. Imunofenotypizačně byla dřeň postižena ve všech případech, histologicky jen v jednom! Typický fenotyp patologických buněk CD 5+, CD 19+, CD 20+/-, CD 23+ jsme našli jen u jednoho nemocného. Další dva měli sice ve dřeni buňky CD 5+ a CD 19+, ty ale byly CD 23-. Z dalších antigenů byl znak CD 10 pozitivní u jednoho vzorku, u něhož zároveň nebyl exprimován znak CD 23 a také HLA DR, jenž byl v druhých dvou případech pozitivní.

**Nodální B lymfom marginální zóny.** 2 nemocní. U obou nemocných byla imunofenotypizačně i cytologicky nalezena infiltrace kostní dřeně. Histologie byla v jednom případě negativní, ve druhém histolog hodnotil nález jako myeloproliferaci. Imunofenotyp NHL buněk jednoho vzorku byl uzavřen jako CD 5-, CD 10-, CD 19+, CD 20+, CD 23-, CD 25-, HLA DR +, druhého jako CD 5+, CD 10+, CD 19+, CD 20+, CD 23-, HLA DR -!

**Extranodální B lymfom marginální zóny (MALT lymfom, lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue).** 1 pacient. U tohoto nemocného histolog nenašel infiltraci dřeně při základní chorobě, imunofenotypizačně byla nalezena infiltrace elementy fenotypu CD 5-, CD 10-, CD 19+, CD 20+, CD 21+, CD 22+, CD 23-, CD 38-, CD 45 +/-, povrchový imunoglobulin -, HLA DR- (přibližně 7 % buněk dřeně). Stejně tak bylo vysloveno podezření na infiltraci dřeně vyšetřením cytologickým.

Tři lymfomy, ve všech případech šlo o B NHL, nebyly blíže histologicky určeny. V jednom případě se jednalo o NHL vysoké malignity, ve dvou o NHL malignity střední. Fenotyp vzorku vysoké malignity (byla nalezena infiltrace dřeně všemi sledovanými metodami) byl: CD 5-, CD 10-, pan B +, CD 23-, CD 38+, HLA DR+, povrchové řetězce +. Při sledování parametrů *forward scatter* versus *side scatter* se buňky jeví jako větší než normální lymfocyty. V jednom případě NHL střední malignity nebyla infiltrace dřeně nalezena, ve druhém ano (jak histologicky a cytomorfológicky tak i *flowcytometricky*). Fenotyp buněk byl CD 5+, pan B +, CD 23 -, CD 38 +.

**Periferní nespecifikovaný T buněčný lymfom.** 3 pacient (u dvou nemocných se jednalo o velkobuněčnou variantu tohoto NHL). U prvního nemocného (NHL střední velikosti buněk) byla dřeň prostoupena patologickým elementy - zjištěno histologicky, *flowcytometricky* i cytomorfológicky. Imunofenotyp patologické populace: CD 2+, CD 3+, CD 4-, CD 5+, CD 7+/-, CD 8+/-, 38+, 71+. Ve druhém případě nebylo postižení dřeně detekováno žádnou z prováděných diagnostických metod, ve třetím byla dřeň postižena, imunofenotyp ale odpovídal B NHL (exprese pan B antigenů) nikoliv závěru histologickému (histolog nepoužíval imunofluorescenční vyšetření!).

## Rozprava

Na základě našeho pozorování lze říci, že *flowcytometrie* se zdá být metodou senzitivnější než vyšetření histologické. Specifická této metody ale není příliš velká. Je to dáno zejména tím, že řada ne Hodgkinsonských lymfomů nenese na svých buňkách specifické znaky jen pro daný typ onemocnění. Zřetelnou výjimkou je pouze *mantle cell* lymfom a lymfocytární lymfom z malých lymfocytů či CLL.

Jaký by měl být nálezy u jednotlivých námi analyzovaných NHL:

**Difúzní velkobuněčný B lymfom.** Imunofenotyp tohoto lymfomu je povrchový imunoglobulin +/-, cytoplazmatický imunoglobulin +/-, pan B znaky (CD 19, CD 20, CD 21, CD 22) +, CD 45 +/-, CD 5 +/-, CD 10 +/- (9). Tomuto fenotypu žádné z našich zjištění vysloveně neodporuje, avšak nálezy CD 5+, CD 19+ buněk zjištěny v jednom případě se nezdá být příliš typickým pro tento nádor.

**Lymfom folikulárního centra.** Buňky lymfomu folikulárního centra mají následující imunofenotyp: pan B znaky +, CD 5-, CD 10 +/-, CD 11c-, CD 23 +/-, CD 25-, CD 43-, povrchový imunoglobulin (často aberantní) +. CD 20 antigen je exprimován intenzivněji než CD 19 (7). Tomuto spektru antigenů se u našich nemocných vymyká nálezy pozitivních antigenů CD 5 (dva nemocní) a CD 11c (jeden pacient).

**Lymfom pláštěvé zóny (*mantle cell*).** Typickými imunofenotypickými znaky lymfomu pláštěvé zóny jsou: CD 5+, CD 10 +/-, CD 11c-, CD 19+, CD 20+, CD 22+, CD 23-, CD 43+, CD 79a+. Buňky lymfomu dále nesou povrchový imunoglobulin M anebo imunoglobulin D, jenž fyziologické centrocyty, z nichž lymfom pláštěvé zóny vychází, nemají, a volné řetězce  $\kappa$  či  $\lambda$  (12, 15). Řetězce  $\kappa$  bývají zjišťovány častěji. Uvedený fenotyp mělo 66,7 % námi analyzovaných *mantle cell* lymfomů. Dále existuje **variantní forma lymfomu pláštěvé zóny**, jež je charakterizována znaky: CD 5+/-, CD 10 +/-, CD 20+, CD 23 +/- (17). Ji by mohly odpovídat dva naše nálezy, kdy jsme nezjistili typickou expresi antigenů pro *mantle cell* lymfom (viz výše).

**Lymfoplazmocytoidní lymfom (imunocytom).** Pouze jeden z pozitivních vzorků imunofenotypem nevyklučuje tento NHL, pro nějž jsou typické znaky: povrchový imunoglobulin M+ a D+/-, cytoplazmatický imunoglobulin +, pan B znaky +, CD 5-, CD 10-, CD 43 +/-, CD 25 +/- (7, 9).

**Lymfocytární lymfom z malých lymfocytů** má imunofenotyp identický s B chronickou lymfatickou leukémií, tedy CD 5+, CD 10-, CD 19+, CD 20 +/-, CD 23+, CD 38-, HLA DR+. Agresivní typ B chronické lymfatické leukémie dále silně exprimuje CD 44 antigen a neexprimuje CD 11c (5), tyto znaky ale u našich vzorků vyšetřeny nebyly. Expresí CD 44 znamená nepříznivou prognózu i v případě NHL vysoké malignity (13). Kromě toho sérové hladiny solubilního antigenu CD 23 korelují s aktivitou nejen tohoto typu NHL, ale i jiných NHL nízké malignity (16). Jen jeden z našich nálezu, ten, u nějž byla prokázána infiltrace dřeně i histologicky, potvrzuje diagnózu lymfocytárního lymfomu z malých lymfocytů, jeden pak má fenotyp ukazující na lymfom pláštěvé zóny.

**Nodální B lymfom marginální zóny.** Buňky tumoru nesou antigeny pan B a povrchový imunoglobulin M nebo D, CD 43 a cytoplazmatický imunoglobulin jsou +/-, CD 11c +/- . Ostatní znaky (CD 5, CD 10, CD 23) neexprimuje (8). Jeden z našich vzorků tedy imunofenotypizačně odporoval diagnóze nodálního B lymfomu marginální zóny.

**Extranodální B lymfom marginální zóny (MALT lymfom, *lymphoma of mucosa associated lymphoid tissue*).** Pro tento NHL je charakteristický imunofenotypizační nálezy odpovídající vyšetření našemu s tou výjimkou, že povrchový imunoglobulin by měl být pozitivní. Dále MALT lymfomy někdy exprimují CD antigen 11c a často antigen CD 43. Pozitivní CD 43 a negativní CD 10 na povrchu buněk MALT lymfomu jej odlišují od lymfomů folikulárních (7, 8, 9). Co

se týká exprese molekuly CD 5, Ferry et al. (6) popsali tři případy MALT lymfomu, dva byly primárně uloženy v očníci, jeden postihoval jazyk, s pozitivním nálezem CD 5. Pozitivní nálezy CD 5 by mohl znamenat, že jde o agresivnější formu extranodálního B lymfomu marginální zóny, formu s tendencí diseminaci do kostní dřeně a vysokým sklonem k relapsům.

**Periferní nespecifikovaný T buněčný lymfom.** Imunofenotyp lymfomů této provizorní kategorie v rámci REAL klasifikace, jež se dělí na skupiny podle velikosti maligních buněk, téměř odpovídá našemu nálezu u prvního nemocného. Pro periferní nespecifikovaný T buněčný lymfom je typická exprese antigenů CD 2, CD 3, CD 5 a CD 4 nebo CD 8 (častěji CD 4). Tumor nemusí v 75 % případů exprimovat antigen CD 7 (10). Podle práce Ascaniho et al. (3) exprimuje asi třetina těchto NHL i znak CD 30 a asi desatina CD 15, přičemž exprese ostatních výše zmíněných znaků nemusí být ve všech případech stoprocentní.

V případech bližší neurčených NHL se u lymfomu střední malignity mohlo podle imunofenotypizace jednat o *mantle cell* lymfom, u lymfomu vysoké malignity pak imunofenotyp nevyklučoval diagnózu difúzního velkobuněčného B lymfomu, případně B buněčného burkittoidního lymfomu či lymfomu folikulárního centra (ačkoliv jde o nádor nízké nebo střední malignity).

I když počet námi vyšetřených nemocných není velký, zastoupení jednotlivých typů NHL v našem souboru se velmi podobá distribuci NHL popsané v práci Salara et al. (14), ve které je uvedeno prospektivní zhodnocení početního zastoupení lymfoidních malignit v souboru 940 pacientů s těmito chorobami.

Diagnostika postižení kostní dřeně při NHL může být někdy ošidnou. Pro téměř všechny typy NHL není imunofenotypizací vyšetření diagnostické (výjimky byly uvedeny). Ve většině případů totiž neexistuje specifický marker nebo kombinace znaků vždy jen pro jeden typ NHL. Možnosti, jak zpřesnit imunofenotypizační vyšetření dřeně u pacientů s NHL, může být jednak vypracování lepších protokolů pro analýzu malých populací buněk, používání většího spektra protilátek a většího spektra jejich vzájemných kombinací. I tak by ale asi nebyly možnosti průtokové cytometrie neomezené. Výhodnější než samotná *flowcytometrie* je určitě vyšetření imunohistochemické. Stanovení exprese jednotlivých znaků na maligních elementech je přínosné u pacientů, u nichž se zvažuje imunoterapie s použitím radionuklidem značených protilátek namířených proti některým antigenům maligních buněk (například CD 20 v případě B NHL) (4).

## Závěr

Průtoková cytometrie je vhodným doplněním ostatních diagnostických metod, zejména vyšetření histologického, při analýze postižení kostní dřeně u pacientů s NHL. Její možnosti však nejsou bezmezné.

## Příloha

**Tabulka.** Porovnání nálezů histologického a *flowcytometrického* vyšetření kostní dřeně u pacientů s NHL. Znaménko + značí nálezy infiltrace dřeně, - značí, že infiltrace zjištěna nebyla. Uvedeny jsou absolutní a relativní počty nálezů.

	Průtoková cytometrie +	Průtoková cytometrie -
Histologie +	26 (44 %)	3 (5 %)
Histologie -	9 (15 %)	21 (36 %)

## Literatura

1. Adam, Z. Hematologické choroby nízkého stupně malignity. Standardní léčebné postupy a zhodnocení účinnosti 2-chlordeoxyadenosinu. 1. vyd., Brno, Masarykova univerzita 1997, 252 s.
2. Adam, Z., Doušek, M., Mayer, J., Vorlíček, J. REAL klasifikace maligních lymfoproliferativních nemocí; jejich imunofenotypické znaky a klinická charakteristika. In Imunofenotypizace leukocytů v onkologii, Klin. Onkol. - zvláštní číslo 1998, 2-16
3. Ascani, S., Zinzani, P. L., Gherlinzoni, F. et al. Peripheral T-cell lymphomas. Clinicopathologic study of 168 cases diagnosed according to the R.E.A.L. Classification. *Annals of Oncology*, 8, 1997, 583-592
4. Coicoran, M. C., Fary, J., Bernstein, I., Press, O. W. Radioimmunotherapy strategies for non-Hodgkin's lymphomas. *Annals of Oncology*, 8 (Suppl. 1), 1997, S133-S138
5. Eisterer, W., Hilbe, W., Stauder, R., Bechter, O., Fend, F., Thaler, J. An aggressive subtype of B-CLL is characterized by strong CD44 expression and lack of CD11c. *British Journal of Haematology*, 93, 1996, 661-669
6. Ferry, J. A., Yang, W., Zukerberg, L. R., Wotherspoon, A. C., Arnold, A., Harris, N. L. CD5+ Extranodal Marginal Zone B-Cell (MALT) Lymphoma. A Low Grade Neoplasm With a Propensity for Bone Marrow Involvement and Relapse. *American Journal of Clinical Pathology*, 105, 1996, 31-37
7. Grogan, T. M. New classification of low-grade lymphoma. *Annals of Oncology*, 7 (Suppl. 6), 1996, S3-S12
8. Harris, N. L., Jaffe, E. S., Stein, H. et al. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal From the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 84, 1994, 1361-1392
9. Chan, J. K. C., Blank, P., Cleary, M. C. et al. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms Proposed by the International Lymphoma Study Group. A Summary Version. *Amer. J. Clin. Pathology*, 103, 1995, 543-560
10. Jaffe, E. S., Kremes, I., Raffeld, M. Classification of T-cell and NK-cell neoplasms based on the REAL classification. *Annals of Oncology*, 8 (Suppl. 2), 1997, S17-S24
11. Kouček, K., Stary, J. Nové poznatky v imunologické klasifikaci maligních lymfomů. *Vnitř. Lék.*, 40, 1994, 130-139
12. Majlis, A., Pugh, W. C., Rodriguez, M. A., Benedict, W. F., Cabanillas, F. Mantle Cell Lymphoma: Correlation of Clinical Outcome and Biologic Features With Three Histologic Variants. *Journal of Clinical Oncology*, 15, 1997, 1664-1671
13. Pals, S. T., Driltenburg, P., Radaszkiewicz, T., Mantel-Horst, E. Adhesion Molecules in the Dissemination of Non-Hodgkin's Lymphomas. *Acta Haematol.*, 97, 1997, 73-80
14. Salas, A., Fernández de Sevilla, A., Romagosa, V. et al. Distribution and incidence rates of lymphoid neoplasms according to the REAL classification in a single institution. A prospective study of 940 cases. *Eur J Haematol.*, 59, 1997, 231-237
15. Szczarkowski, W., Davis, B. H., Stone, E., Waldum, J. Mantle Cell Lymphoma. *Cytometry Forum*, 9, 1996, 3 s.
16. Zinzani, P. L., Baccini, C., Zaccaria, A. et al. Clinical implications of serum levels of soluble CD23 and tumor necrosis factor alpha in low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol.*, 57, 1996, 335-340
17. Zucca, E., Stein, H., Coiffier, B. European Lymphoma Task Force (ELTF). Report of the workshop on Mantle Cell Lymphoma (MCL). *Annals of Oncology*, 5, 1994, 507-511