

Přihláška do interní grantové soutěže 2024

Název projektu:

Digitální cytomorfologie megakaryocytů u Ph-negativních myeloproliferativních neoplázií s využitím zařízení Morpho – prediktivní diagnostický model využívající umělou inteligenci.

Hlavní řešitel

MUDr. David Starostka, Ph.D.

Tel. 596491634, 606771972

E-mail: david.starostka@nemhav.cz

CV a přehled publikací: příloha č. 1 a 2

Členové týmu

MUDr. Richard Doležilek

Mgr. Petra Miczková

MUDr. Peter Kováč

Mgr. Jarmila Juránová

MUDr. David Buffa

Mgr. Soňa Kolářová

Doc. Mgr. Miloš Kudělka, Ph.D.

Akademické partnerství a spolupracující subjekty

Prof. Dr. Med. Hans Michael Kvasnicka

Instituts für Pathologie und Molekularpathologie, Helios Universitätsklinikum Wuppertal

Mgr. Jarmila Juráňová

Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc

MUDr. David Buffa, Mgr. Soňa Kolářová

Klinika hematoonkologie a Ústav laboratorní diagnostiky – OKH – FN Ostrava a LF Ostravské univerzity

Doc. Mgr. Miloš Kudělka, Ph.D.

Fakulta elektroniky a informatiky VŠB-TUO Ostrava

Qian Wu, Ph.D.

Hangzhou ZhiWei Information Technology, China

Doba řešení

1.7.2024 – 30.6.2025 (12 měsíců)

Úvod do problematiky:

Multidisciplinární diagnostika v hematoonkologii

Diagnostika v hematoonkologii má multidisciplinární charakter založený na komplementaritě a synergii analytických metod: morfologie (cytologie a histologie), imunofenotypizace (průtoková cytometrie a imunohistochemie), genetické vyšetření a zohlednění klinického obrazu nemoci. **Přesná diagnóza a detailní odlišení hematolymfoidních neoplázií má klíčový klinický význam. Biologický charakter jednotlivých entit rozhoduje o klinickém průběhu a prognóze a zásadním způsobem ovlivňuje individualizaci léčby.** Relativní důležitost diagnostických metod se liší mezi entitami a neexistuje univerzální diagnostický standard.¹ Významná je též existence a stupeň diagnostické nejistoty. Jednotlivé diagnostické entity jsou tříděny v rámci WHO klasifikace nádorů hematopoetické a lymfoidní tkáně.¹ Kostní dřeň je nejčastějším orgánem vyšetřovaným v rámci hematoonkologické diagnostiky.

U cytologie jsou nátěry kostní dřeně kolorovány panoptickým barvením Pappenheimovou metodou a vyšetřovány ve světelném mikroskopu v přiměřeně tenké oblasti nátěru s využitím imerzních nebo neimerzních objektivů různého zvětšení pro hodnocení kvality, buněčnosti, rozložení buněk nebo detailního pozorování, popisu a klasifikace. K dispozici jsou také digitální morfologické analyzátoři.^{2,3}

Histologické vyšetření se provádí světelnou mikroskopií u biotických vzorků po jejich fixaci a zpracování do tenkých tkáňových řezů z parafinových bloků v základním barvení hematoxylinem-eozinem a využívá informací o detailní mikroarchitektonice postižené tkáně.²

Průtoková cytometrie umožňuje rychlou kvalitativní a kvantitativní analýzu optických a fluorescenčních vlastností obrovského množství elementů v tekutých suspenzích. Multiparametrický charakter analýzy umožňuje simultánní stanovení řady parametrů na povrchu či uvnitř buněk s využitím fluorochromů s diferencovaným emisním spektrem a monoklonálních protilátek. Základními analyzovanými prvky jsou velikost částic (FSC), denzita jejich vnitřního obsahu (granularita, SSC) a intenzita fluorescence, tj. emise fotonů o konkrétní vlnové délce způsobená specifickou laserovou excitací.^{2,4,5,6}

Imunohistochemie představuje imunofenotypizaci v tkáňových řezech. Detekce specifických antigenních determinant probíhá na stejném základním principu jako u průtokové cytometrie – vizualizace vazby antigenu a protilátky.^{2,7}

Cytogenetické vyšetření se nejčastěji provádí jako karyotypizace metodou G-pruhování založenou na působení trypsinu a barvení barvivem Giemsa-Romanowski, hodnocení probíhá pomocí světelného mikroskopu, standardně se hodnotí 30 mitóz.^{2,6}

Molekulárně genetické metody umožňují precizní a senzitivní identifikaci patologických genetických změn na různých principech.^{2,6,8,9}

Cytologická analýza kostní dřeně

Pro klasifikaci hematolymfoidních novotvarů a mnoha nenádorových stavů byly definovány přesné cytomorfológické znaky. Kostní dřeň (KD) má nejsložitější cytologický vzorec tvořený více než 200 typy buněk. Správné hodnocení a interpretace nátěrů periferní krve (PK) a KD je nepostradatelnou součástí multidisciplinární diagnostiky téměř 200 známých hematolymfoidních neoplazmat.^{1,2} Optická mikroskopie zůstává referenčním zlatým standardem analýzy krevních buněk. Tato profesně i časově náročná analýza vyžaduje odborné znalosti vysoce kvalifikovaných a zkušených odborníků a je spojena s variabilitou související se subjektivitou hodnocení.^{3,4}

Hodnocení nátěru aspirátu KD je součástí diagnostického vyšetřovacího postupu u pacientů s hematologickými chorobami, či u pacientů, u kterých existuje podezření (např. z nátěru PK) na hematologické onemocnění, které je nutné hodnocením aspirátu KD ověřit. Součástí hodnocení je stanovení relativního rozpočtu hematopoetických buněk (myelogram) a morfológický popis hematopoetických vývojových řad a dalších buněk přítomných v kostní dřeni.¹⁰

Mikroskopické hodnocení obarveného nátěru aspirátu KD začíná vždy přehledným zhodnocením při menším zvětšení (100–400×), a to i v okrajích a konečných cípech nátěru, kde mohou být vytlačeny větší buňky či kompaktní shluky patologických buněk. Pak následuje vlastní hodnocení při zvětšení 1000×. Vyšetření provádí garant výkonu (lékař se specializovanou odbornou způsobilostí v oboru Hematologie a transfúzní lékařství), který je zodpovědným pracovníkem ke konečnému uvolnění výsledku tohoto vyšetření pro klinické lékaře a který je schopen uvést interpretaci s event. klinickou rozvahou. Ta by měla být součástí výsledku. Na hodnocení vyšetření se mohou podílet i oprávnění pracovníci (laborant, VŠ nelékař).¹⁰

Zvětšení 100–400× je určeno pro zhodnocení:

- a) kvality nátěru a kvality jeho obarvení
- b) buněčnosti nátěru
- c) přítomnosti a morfologie megakaryocytů
- d) orientačního zastoupení jednotlivých vývojových řad včetně jejich nerovnoměrné distribuce
- e) přítomnosti ostrůvků erytropoezy
- f) přítomnosti velkých fyziologických i patologických buněk, případně jejich trsů zejména v okrajích či konečných cípech nátěrů
- g) přítomnosti ojedinělých patologických buněk u těžce hypocelulárních nátěrů
- h) výběru těch úseků preparátu, kde jsou buňky náležitě rozprostřeny a jsou vhodné pro hodnocení při větším zvětšení.

Při zvětšení 1000x popisujeme jednotlivé buňky (morfologický popis) a počítáme jejich zastoupení (myelogram). K hodnocení si vybíráme část nátěru, ve které jsou buňky rovnoměrně rozprostřeny. U vstupního vyšetření aspirátu KD se doporučuje spočítat 500 jaderných buněk; u kontrolních či hypocelulárních nátěrů pak alespoň 250–300 jaderných buněk. V případech, kdy není splnění tohoto početního zastoupení možné či účelné, je nutný komentář v popisu. Nátěr v mikroskopu hodnotíme meandrovitým či bajonetovým rovnoměrným pohybem objektivu nad podložním sklem nejlépe na šířku skla od jednoho okraje k druhému.¹⁰

Myelogram odpovídá poměrnému zastoupení jaderných buněk v kostní dřeni, které je vyjádřeno v procentech. Přítomnost buněk, které se do běžného rozpočtu nezařazují, se udává v poměrném zastoupení (tj. např. N/100, N/250, N/300, resp. N/500). Do myelogramu započítáváme granulopoézu, erytropoezu, lymfocytopenézu, monocytopenézu, mastocyty a další definované buňky. Morfologicky popisujeme každou vývojovou řadu zvlášť – její početní a poměrné zastoupení, přítomnost jednotlivých stádií, jejich morfologické změny.¹⁰

Digitální cytomorfologie KD založená na umělé inteligenci

V poslední době došlo k bezprecedentnímu vývoji v oblasti automatizované klasifikace obrazu a rozhodování s podporou umělé inteligence (AI). Diagnostická aplikace a integrace téměř dokonalé virtuální morfologie a algoritmů rozpoznávání a klasifikace buněk založených na systémech strojového učení a hlubokého učení (subdomény AI) představují skutečnou revoluci v morfologické analýze krevních buněk. Zobrazení celého nátěru umožňuje pořízení komplexních digitálních dat během několika minut. Tento postup se používá v histopatologii, ale v hematologické cytopatologii vyžaduje mnohem větší zvětšení (100× objektivu olejové imerze).^{14,15} Algoritmy AI brání chybné klasifikaci identifikací detailů, které by mohly uniknout lidskému oku, ale mohou také otevřít zcela nekonvenční způsoby interpretace obrazových dat zejména při znalosti skupinového buněčného kontextu analyzovaných populací.^{16,17}

Existují různé komerční systémy pro preklasifikaci buněk PK v běžné laboratorní praxi. Nejrozšířenější systém CellaVision (Lund, Švédsko) je schopen plně skenovat nátěr periferní krve, vyhledávat buňky, zaznamenávat jejich snímky, preklasifikovat buňky a zobrazovat je na obrazovce počítače. Odborník pak

zkontroluje navrženou klasifikaci buněk.¹⁷ Morphogo (ZhiWei, Hangzhou, Čína) je unikátní automatické cytopatologické zařízení s certifikací CE-IVDR (In vitro Medical Devices Regulation), UKCA (UK Conformity Assessed Marking) a TGA (Therapeutic Goods Administration) s integrovaným skenovacím hardwarem a softwarem na bázi strojového učení. Je schopen plně skenovat nátěry PK a KD. Samoučící algoritmus rozpoznávání buněk pomocí AI je schopen lokalizovat a preklasifikovat jaderné elementy (a abnormální erytrocyty v PK) a provádět statistickou analýzu pro kompletaci myelogramu. Zařízení také ukládá kompletní datové informace ve formě digitálních fotografií.^{17,18} Velké validační studie prokázaly, že Morphogo vykazuje vysokou přesnost v klasifikaci buněk a robustní a stabilní konzistenci s profesionálními hematopatologi, v některých případech dosahuje dokonce superhumánní úrovně.¹⁸ Tento systém je leadrem v digitalizaci morfodiagnostiky KD a jeho rutinní implementace bude mít významný dopad na pracovní postupy v hematologických laboratořích.¹⁶

Tak například se předpokládá, že v rámci zralých lymfoidních novotvarů by další trénink a zlepšení rozpoznávacích algoritmů mohly umožnit a usnadnit i subklasifikaci do specifických diagnostických entit.¹⁹ Velký prostor také zůstává pro spolehlivé rozpoznání liniových dysplastických změn podporované AI.

Mezi výhody kompletního skenování a automatizované digitální analýzy patří bezprecedentní rychlost zpracování, vzdálený přístup, snížení pracovní únavy, nákladů a redukce počtu revizí optickou mikroskopií, významné zlepšení morfologického vzdělávání a dále též standardizace, harmonizace a zajištění kvality eliminující subjektivitu hodnocení. Virtuální sklíčka se časem nezhoršují, mají minimální požadavky na skladování a jsou dostupnější pro prohlížení, konzultace a publikace a vytváření digitálních obrazových archivů, rozsáhlých databází a knihoven.^{14,15,18,20}

Ačkoliv se AI v průtokové cytometrii běžně nepoužívá, klasifikátory asistované AI již byly navrženy také pro kvantitativní imunofenotypizaci v hematatoonkologii a automatizovanou kvantifikaci minimální reziduální choroby.^{21,22}

Diagnostika s podporou umělé inteligence má obrovský potenciál pro další zlepšení a inovativní transformaci diagnostické hematatoonkologie. V nejbližší budoucnosti se dočkáme implementace AI směřující k překonání konvenční analýzy v rutinní praxi, včetně standardizace barvicích metod, kvality obrazu, rozpoznávání buněk, kvalitativního hodnocení a harmonizace a standardizace procesů.^{14,16,19} Technologický pokrok využívající AI nelze v této oblasti zastavit, ale vysoce kvalifikovaný morfolog bude vždy nezbytný pro reklasifikaci buněk a diagnostickou interpretaci; expertíza tak zůstává základním kamenem cytomorfologické diagnostiky v hematatoonkologii.^{18,20}

Diagnostika Ph-negativních myeloproliferativních neoplázií (MPN) s důrazem na morfologii megakaryocytů

Přesná diagnostika a klasifikace myeloproliferativních novotvarů (MPN) vyžaduje integraci klinických, morfologických a genetických nálezů. U MPN je přesná klasifikace klíčová pro optimální léčbu, protože cíle léčby a rizika progresu se u jednotlivých poruch liší. Navzdory velkým pokrokům v chápání molekulárního a genetického základu MPN je morfologické hodnocení kostní dřeně v trepanobiopsii (BMT) rozhodující pro odlišení podtypů MPN a jejich reaktivních mimiker. V případech esenciální trombocytémie, primární myelofibrozy a prepolycytemické polycythaemia vera, které postrádají

mutaci v 1 ze 3 hlavních genů vyskytujících se u MPN (tzv. triple negativní), je jejich odlišení od reaktivního procesu, například v důsledku chronického zánětu, obzvláště náročné. Morfologické hodnocení je významně omezeno používáním subjektivních, kvalitativních a špatně reprodukovatelných diagnostických kritérií.^{23,24}

Ústředním bodem histologické interpretace BMT u pacientů s podezřením na MPN je hodnocení megakaryocytů pomocí dlouhodobě zavedených, přesto však vysoce subjektivních cytologických a topografických znaků. Patří mezi ně variace ve velikosti buněk, atypie (např. jaderná lobulace/složitost) a „clustering“ buněk. Navzdory jejich důležitosti v klasifikačním systému WHO existují spory o významu a spolehlivosti těchto subjektivních cytologických charakteristik. Inovativní kvantitativní přístup k popisu, analýze a klasifikaci komplexních cytologických a topografických znaků megakaryocytů v BMT má potenciál významně zpřesnit integrativní diagnostiku MPN. Komplexní morfologické rysy megakaryocytů mohou být zachyceny na digitálních snímcích rutinně připravených řezů barvených hematoxylinem a eosinem a použity k vývoji inovativních diagnostických, klasifikačních a monitorovacích nástrojů onemocnění prostřednictvím analýzy obrazu a technologií umělé inteligence.^{23,24}

Byla vytvořena nová výpočetní metoda pro systematickou analýzu tkáňových megakaryocytů využívající postupy strojového učení schopné asociovat extrahované rysy se základní diagnózou MPN nebo reaktivním/nenádorovým stavem. Pro zlepšení morfologického hodnocení MPN byl vyvinut přístup strojového učení pro automatizovanou identifikaci, kvantitativní analýzu a abstraktní reprezentaci znaků megakaryocytů vycházející z vyšetření reaktivních/nenádorových vzorků BMT a vzorků od pacientů s prokázanou diagnózou esenciální trombocytémie, polycytemia vera nebo primární myelofibrózy. Byla popsána aplikace automatizovaného workflow pro identifikaci relevantních histologických znaků z rutinně připravovaných BMT. Následná analýza umožnila automatizovanou tkáňovou diagnostiku MPN s vysokou prediktivní přesností (plocha pod křivkou 0,95) a podala důkaz potenciálu rozlišovat podtypy MPN.^{23,24}

Metoda vizuální reprezentace abstrahovaných znaků megakaryocytů v kontextu analyzovaných kohort pacientů usnadňuje interpretaci nálezů nekonvenčním způsobem. Automatizovaný fenotypizační přístup BMT má významný potenciál jako doplněk ke standardnímu genetickému a molekulárnímu testování u pacientů s podezřením na MPN. Přístupy strojového učení mají též oproti konvenční histologické analýze několik hlavních výhod: potenciál poskytnout rychlé a spolehlivé počáteční diagnostické posouzení vzorků před definitivním závěrem patologa; komplexní přehled megakaryocytární populace umožní patologovi soustředit se šířeji na proces integrace patologických rysů s klinickými a laboratorními nálezy; přístup je ideální pro přesnější hodnocení sekvenčních vzorků od pacientů podstupujících léčbu a/nebo opakované vyšetření.^{23,24}

Reference:

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Arber DA, Hasserjian RP, Le Beau MM, Orazi A, Siebert R. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th Edition, IARC, Lyon 2017.
2. Starostka D. et al.: Možnosti diagnostiky CD5-pozitivních B-lymfoproliferací, Onkologie 2014; 8(3): 102-106.
3. Pecka M et al. Praktická hematologie. Laboratorní metody. První vydání. Nakladatelství Infiniti art, s.r.o., Český Těšín, 2010.
4. Marinov I. Průtoková cytometrie v klinické hematologii. 2. přepracované a rozšířené vydání. Triton, Praha. 2008.

5. Novák M. Mechanizmy navozené imunotolerance nádorových buněk cestou dráhy programové buněčné smrti u chronické lymfocytární leukémie a možnosti jejich detekce metodami průtokové cytometrie. Dizertační práce. Univerzita Palackého, Lékařská fakulta, Olomouc 2015.
6. Pospíšilová Š, Dvořáková D, Mayer J et al. Molekulární hematologie. Galén, Praha. 2013.
7. Böcker W, Buchwalow IB. Immunohistochemistry: Basics and methods. Springer. 2010.
8. Richard KK, Robinett S. Detection of genetic translocations in lymphoma using fluorescence in situ hybridization. *Methods Mol Biol* 2013; 999:189-202.
9. Teruya-Feldstein J. Getting the diagnosis right in NHL: role of immunohistochemistry and molecular diagnostic testing. *J Natl Compr Canc Netw* 2008 Apr; 6:422-7.
10. Doporučení laboratorní sekce České hematologické společnosti ČLS JEP: HODNOCENÍ NÁTĚRU ASPIRÁTU KOSTNÍ DŘEŇE.
11. Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC; International Council for Standardization In Hematology. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hematol*. 2008 Oct;30(5):349-64. doi: 10.1111/j.1751-553X.2008.01100.x. PMID: 18822060.
12. Palmer L, Briggs C, McFadden S, Zini G, Burthem J, Rozenberg G, Proytcheva M, Machin SJ. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *Int J Lab Hematol*. 2015 Jun;37(3):287-303. doi: 10.1111/ijlh.12327. Epub 2015 Mar 2. PMID: 25728865.
13. Torlakovic EE, Brynes RK, Hyjek E, Lee SH, Kreipe H, Kremer M, McKenna R, Sadahira Y, Tzankov A, Reis M, Porwit A; International Council for Standardization in Haematology. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow immunohistochemistry. *Int J Lab Hematol*. 2015 Aug;37(4):431-49. doi: 10.1111/ijlh.12365. Epub 2015 May 15. PMID: 25977137.
14. Zini G, Barbagallo O, Scavone F, Béné MC. Digital morphology in hematology diagnosis and education: The experience of the European LeukemiaNet WP10. *Int J Lab Hematol*. 2022 Sep;44 Suppl 1:37-44. doi: 10.1111/ijlh.13908. PMID: 36074713.
15. Walter W, Haferlach C, Nadarajah N, Schmidts I, Kühn C, Kern W et al. T. How artificial intelligence might disrupt diagnostics in hematology in the near future. *Oncogene*. 2021 Jun;40(25):4271-4280. doi: 10.1038/s41388-021-01861-y. Epub 2021 Jun 8. PMID: 34103684; PMCID: PMC8225509.
16. Lin E, Fuda F, Luu HS, Cox AM, Fang F, Feng J, Chen M. Digital pathology and artificial intelligence as the next chapter in diagnostic hematopathology. *Semin Diagn Pathol*. 2023 Mar;40(2):88-94. doi: 10.1053/j.semdp.2023.02.001. Epub 2023 Feb 15. PMID: 36801182.
17. Kratz A, Lee SH, Zini G, Riedl JA, Hur M, Machin S; International Council for Standardization in Haematology. Digital morphology analyzers in hematology: ICSH review and recommendations. *Int J Lab Hematol*. 2019 Aug;41(4):437-447. doi: 10.1111/ijlh.13042. Epub 2019 May 2. PMID: 31046197.
18. Jin H, Fu X, Cao X, Sun M, Wang X, Zhong Y et al. Developing and Preliminary Validating an Automatic Cell Classification System for Bone Marrow Smears: a Pilot Study. *J Med Syst*. 2020 Sep 7;44(10):184. doi: 10.1007/s10916-020-01654-y. PMID: 32894360; PMCID: PMC7476995.
19. Tang G, Fu X, Wang Z, Chen M. A Machine Learning Tool Using Digital Microscopy (Morphogo) for the Identification of Abnormal Lymphocytes in the Bone Marrow. *Acta Cytol*. 2021;65(4):354-357. doi: 10.1159/000518382. Epub 2021 Jul 20. PMID: 34350848.
20. Fu X, Fu M, Li Q, Peng X, Lu J, Fang F et al. Morphogo: An Automatic Bone Marrow Cell Classification System on Digital Images Analyzed by Artificial Intelligence. *Acta Cytol*. 2020;64(6):588-596. doi: 10.1159/000509524. Epub 2020 Jul 28. PMID: 32721953.
21. Starostka D, Kriegova E, Kudelka M, Mikula P, Zehnalova S, Radvansky M et al. Quantitative assessment of informative immunophenotypic markers increases the diagnostic value of immunophenotyping in mature CD5-positive B-cell neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018 Jul;94(4):576-587. doi: 10.1002/cyto.b.21607. Epub 2018 Jan 17. PMID: 29220870.
22. Bazinet A, Wang A, Li X, Jia F, Mo H, Wang W, Wang SA. Automated quantification of measurable residual disease in chronic lymphocytic leukemia using an artificial intelligence-assisted workflow. *Cytometry B Clin Cytom*. 2023 Feb 23. doi: 10.1002/cyto.b.22116. Epub ahead of print. PMID: 36824056.
23. Sirinukunwattana K, Aberdeen A, Theissen H, Sousos N, Psaila B, Mead AJ, Turner GDH, Rees G, Rittscher J, Royston D. Artificial intelligence-based morphological fingerprinting of megakaryocytes: a new tool for assessing disease in MPN patients. *Blood Adv*. 2020 Jul 28;4(14):3284-3294. doi: 10.1182/bloodadvances.2020002230. PMID: 32706893; PMCID: PMC7391156.
24. Ryou H, Lomas O, Theissen H, Thomas E, Rittscher J, Royston D. Quantitative interpretation of bone marrow biopsies in MPN-What's the point in a molecular age? *Br J Haematol*. 2023 Nov;203(4):523-535. doi: 10.1111/bjh.19154. Epub 2023 Oct 19. PMID: 37858962.

Cíl projektu:

1. Komplexní integrativní diagnostika kostní dřeně u cca 200 případů Ph- MPN a reaktivních změn hemopoézy formou MDM s cílem maximalizace přesnosti a jistoty závěrečné diagnózy.
2. Pořízení digitálního myelogramu zařízením Morphogo u cca 200 případů Ph- MPN a reaktivních změn hemopoézy zahrnujícího digitální záznam všech megakaryocytů.
3. Obrazová optimalizace záznamu megakaryocytů.
4. Vytvoření digitální knihovny megakaryocytů a jejich morfologická fenotypizace na expertní bázi a s využitím metod AI.
5. Vytvoření a trénink prediktivního diagnostického modelu (klasifikátoru) využívajícího digitální morfologii megakaryocytů k rozlišení reaktivní hemopoézy a MPN a subtypů Ph- MPN (ET, PV, PMF) s využitím AI.
6. Validace prediktivního diagnostického modelu na kontrolním datasetu.

Materiál a metodika:

I. Analyzovaný soubor:

Soubor zahrnuje všechny vzorky kostní dřeně odebrané aspirací a trepanobiopsií v období let 2022-2024 u pacientů s jistou primární diagnózou Ph- MPN (celkem cca 150 případů) a reaktivními změnami hemopoézy (cca 50 případů). Jde o kombinovanou retrospektivní a prospektivní analýzu. Pro pacienta nepředstavuje studie žádnou zátěž navíc, k analýze slouží rutinně odebírané vzorky. Automatizovaný myelogram se také stanovuje v běžně odebíraných vzorcích. Výsledky studie neovlivní v době jejího průběhu žádným způsobem zdravotní péči o pacienta. Informovaný souhlas s anonymním využitím výsledků analýzy kostní dřeně k výzkumným účelům je součástí informovaného souhlasu s odběrem kostní dřeně (Příloha č. 3 a 4).

II. Diagnostická analýza odebraných vzorků:

1. Cytomorfologie kostní dřeně

Mikroskopické hodnocení obarveného nátěru aspirátu KD začíná vždy přehledným zhodnocením při menším zvětšení (200–500×), a to i v okrajích a konečných cípech nátěru, kde mohou být vytlačeny větší buňky či kompaktní shluky patologických buněk. Pak následuje vlastní podrobné hodnocení při zvětšení 1000×. Součástí hodnocení je stanovení relativního rozpočtu hematopoetických buněk (myelogram) a morfologický popis hematopoetických vývojových řad a dalších buněk přítomných v KD a nakonec též diagnostická interpretace nálezu s podporou výsledku FCM. Vyšetření probíhá dle podrobných pravidel uvedených v Úvodu a dle příslušných vyšetřovacích SOP.

Myelogram provádí laborantka se specializovanou způsobilostí. VŠ-JOP se specializovanou způsobilostí reviduje myelogram, provádí kvalitativní cytomorfologické hodnocení KD, formuluje popis cytologického nálezu a navrhuje jeho diagnostickou interpretaci. Garant výkonu - lékař se specializovanou způsobilostí - reviduje cytomorfologický nálezu, interpretuje jej a stanovuje cytologickou diagnózu s podporou výsledku FCM.

Digitální cytomorfologické vyšetření kostní dřeně se stanovením automatizovaného myelogramu se realizuje na spolupracujícím externím pracovišti ve Spolkové republice Německo (Helios Universitätsklinikum Wuppertal) nebo v hematologické laboratoři LHKB, dojde-li v roce 2024 k instalaci přístroje. Vyšetření provádí pověřený pracovník LHKB Nemocnice Havířov na zařízení Morphogo nebo reprezentant výrobce Morphogo. V rámci digitálního myelogramu je pořízen záznam všech megakaryocytů jako tzv. „large cells“.

Řešitelé: DS, PM, DB, SK, JJ

2. Histologie a imunohistochemie kostní dřeně

Morfologické hodnocení kostní dřeně

Mikroskopické hodnocení nakrájeného a nabarveného trepanobiopsického válečku kostní dřeně provádí atestovaný patolog (lékař se specializovanou způsobilostí v oboru patologie), který začíná přehledným posouzením při nejmenším (40×) a malém (100×) zvětšení, ze kterého se vyjadřuje k celkové buněčnosti kostní dřeně vzhledem k věku a ke stavu trámčů kostní spongiozy. Pak následuje hodnocení při zvětšení středně velkém (200×) až velkém (400×), ze kterého se hematopatolog vyjadřuje k charakteristikám jednotlivých buněčných řad hematopoézy, konkrétně k jejich proporcionálnímu zastoupení, topografii, morfologii a vyzrávání a dále hodnotí i stav krevních sinusoid, zásoby železa a stupeň fibrotizace.

Imunohistochemická analýza kostní dřeně:

Následuje imunohistochemické vyšetření materiálu, které připraví atestované laborantky dle standardizovaného operačního postupu naší laboratoře pro odečtení atestovaným patologem. Toto vyšetření zvýrazní jednotlivé buněčné řady hematopoézy. Ke každé trepanobiopsii jsou standardně použity tyto protilátky: Myeloperoxidase, CD71, Glycophorin A, CD61, CD 68, CD20, CD3, CD34, CD117, CD138, Kappa a Lambda a podle diagnózy se případně dle potřeby doplňují protilátky další. Konkrétně u B lymfomů se jedná o protilátky CD79a, CD5, CD23, CD10, cyclin D1, SOX11, BCL2, BCL6, PAX5, MUM1, cMYC. U T lymfomů protilátky CD5, CD4, CD8, CD2, CD56 a CD30. U Hodgkinova lymfomu CD30. U myelomu CD56 a cyclin D1. U systémové mastocytózy CD2 a CD25. U chronické myelomonocytární leukémie se přidává ještě protilátka CD163. U metastáz pak vedle průkazu epitelového charakteru pomocí protilátky CKAE1/3 i protilátky specifické pro daný orgánový systém, např. CK7, CK20, CDX2, TTF1, napsin A, TRPS1, PSA, NKX3, SOX10, melan A, HMB45, OCT3/4, PAX8, RCC a další.

Po zhodnocení základního barvení, všech barvení speciálních a kompletní imunohistochemické analýzy sepíše patolog zprávu s kompletním popisem dodaného materiálu, s interpretací všech provedených vyšetření a v závěru textu stanoví diagnózu, kterou zakóduje v nemocničním informačním systému a vytištěnou zprávu podepíše.

Řešitelé: RD, PK

3. Cytogenetika a molekulární genetika kostní dřeně

Cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření se provádí v externí laboratoři Spadia. Rozsah vyšetření je individualizován dle očekávaného přínosu, požadovaný rozsah vyšetření indikuje ošetřující hematolog.

Multidisciplinární meeting (MDM):

Multidisciplinární meeting je pracovní porada expertů v diagnostické hematoonkologii (v minimálním složení atestovaný hematopatolog + atestovaný hematolog + expert VŠ JOP z hematologické laboratoře), na které se projednávají všechny případy vyšetření kostní dřeně v Nemocnici Havířov. Výsledkem projednání případu na MDM je diagnostický report z vyšetření kostní dřeně.

Řešitelé: DS, RD, PM

Diagnostický report z vyšetření kostní dřeně:

Diagnostický report z vyšetření kostní dřeně je komplexním souhrnem relevantních klinických a laboratorních dat umožňujících petrifikaci diagnózy založenou zejména na synergii a komplementaritě nálezů.

Diagnostický report z vyšetření kostní dřeně zahrnuje:

- podstatné klinické údaje
- výsledek hemogramu
- výsledek cytomorfologické analýzy kostní dřeně
- výsledek imunofenotypizace kostní dřeně průtokovou cytometrií
- výsledek histologického a imunohistochemického vyšetření kostní dřeně
- výsledek cytogenetické a molekulárně genetické analýzy kostní dřeně, event. genetické analýzy periferní krve
- závěrečnou diagnózu
- event. doporučení pro další diagnostiku.

Diagnostický report z vyšetření kostní dřeně se pořizuje v NIS v oddíle Diagnostické reporty KD s využitím předdefinovaného formátu.

Diagnostický report z vyšetření kostní dřeně kompletuje pověřený lékař hematologické laboratoře.

Závěrečnou diagnózu stanovuje pověřený atestovaný hematolog spolu s primářem patologie, oba report kontrahují po předchozím projednání případu na multidisciplinárním mítinku.

Diagnostický report z vyšetření kostní dřeně se vydává v elektronické a pro externí uživatele též v listinné podobě.

Pracovní diagnóza je neúplný klinický diagnostický závěr formulovaný na základě průběžných výsledků vyšetření.

Závěrečná diagnóza je závěr diagnostického reportu z vyšetření kostní dřeně. V případě hematolymfoidních neoplázií se uvádí dle WHO klasifikace (4. revize i 5. revize).

Finální diagnózu stanovuje klinik při znalosti všech potřebných informací, zejména pak závěrečné diagnózy.

Řešitelé: DS, RD, PM

Kontrola kvality laboratorní analýzy

Externí kontrola kvality národní:

Provádí se dvakrát ročně předepsaným hodnocením digitálních fotografií kostní dřeně organizovaným SEKK.

Externí kontrola kvality mezinárodní:

Provádí se dvakrát ročně hodnocením v programu EQAS.

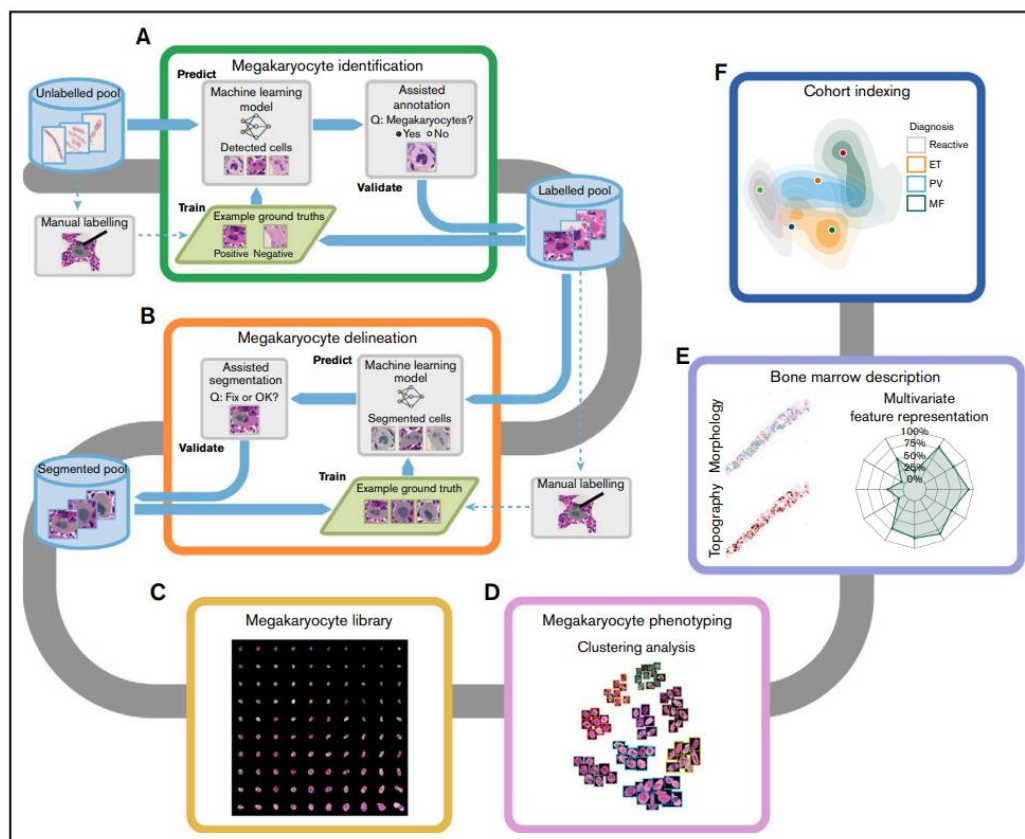
<https://www.instand-ev.de/en/instand-eqas/eqa-program/offer/haematology-09-bone-marrow-cytology/>

Mezilaboratorní porovnání:

Provádí se třikrát ročně komparací myelogramu a diagnostického závěru mezi referenční expertní laboratoří a hematologickou laboratoří LHKB.

Tvorba prediktivního diagnostického modelu (klasifikátoru):

Prediktivní diagnostický model bude vytvořen s využitím AI a knihovny megakaryocytů ve spolupráci s Katedrou informatiky FEI VŠB-TUO na podobném principu publikovaném v Blood Adv. 2020 Jul 28;4(14):3284-3294. doi: 10.1182/bloodadvances.2020002230. PMID: 32706893; PMCID: PMC7391156.



Výstup:

- časový harmonogram

Červenec – prosinec 2024:

Komplexní vyšetření cca 200 vzorků kostní dřeně z období let 2023 a 2024 (cytologie, průtoková cytometrie, histologie + imunohistochemie, cytogenetika) včetně digitálního myelogramu na zařízení MorphoGo. Integrativní diagnostika formou MDM. Průběžný záznam dat.

Červenec-září 2024:

Vytvoření digitální knihovny megakaryocytů a jejich morfologická fenotypizace na expertní bázi a s využitím metod AI.

Říjen-prosinec 2024:

Vytvoření a trénink diagnostického prediktivního modelu využívajícího digitální morfologii megakaryocytů k rozlišení reaktivní hemopoézy a Ph- MPN a subtypů Ph- MPN (ET, PV, PMF).

Prosinec 2024:

Submise sdělení do časopisu ***Transfuze a Hematologie Dnes***.

Leden-únor 2025:

Validace diagnostického prediktivního modelu na kontrolním datasetu.

Březen-červen 2025:

- A) Odborné sdělení na celoustavním semináři Nemocnice Havířov.
- B) Odborná sdělení na národních a mezinárodních konferencích a kongresech.
- C) Diagnostický workshop pořádaný Nemocnicí Havířov.

Květen 2025:

Submise sdělení do ***Int J Clin Hematol. nebo npj Digital Medicine***

- očekávané výsledky

1. Vytvoření digitální knihovny megakaryocytů a jejich morfologická fenotypizace na expertní bázi a s využitím metod AI.
2. Vytvoření a trénink prediktivního diagnostického modelu (klasifikátoru) využívajícího digitální morfologii megakaryocytů k rozlišení reaktivní hemopoézy a Ph- MPN a subtypů Ph- MPN (ET, PV, PMF) s využitím AI.
3. Validace prediktivního diagnostického modelu na kontrolním datasetu.

- povinný publikační výstup

A) J_{imp} (původní/přehledový článek v odborném periodiku, který je obsažen v databázi Web of Science): originální sdělení v časopisu ***Int J Lab Hematol. nebo npj Digital Medicine***

B) JSC (původní/přehledový článek v recenzovaném odborném periodiku, který je obsažen v databázi SCOPUS): přehledné sdělení v časopisu ***Transfuze a Hematologie Dnes***.

- další publikační a prezentační výstupy

- A) Odborné sdělení na celoustavním semináři Nemocnice Havířov.
- B) Odborná sdělení na národních a mezinárodních konferencích a kongresech.
- C) Diagnostický workshop pořádaný Nemocnicí Havířov.

- přínos pro praxi

1. Zvýšení kvality diagnostiky Ph- MPN včetně jejich subtypů a odlišení Ph- MPN od reaktivních změn hemopoézy zavedením prediktivního diagnostického modelu.
2. Zvýšení standardizace, harmonizace a zajištění kvality integrativní diagnostiky Ph- MPN omezením subjektivity hodnocení.
3. Rozvoj procesu tvorby systematické a didaktické edukační databáze digitálních snímků kostní dřeně a komplexních cytologických nálezů v oblasti MPN.

Požadavky na výsledky z projektů:

Druh požadovaných výsledků podle kategorií rejstříků informací o výsledcích (RIV):

- Povinné jsou dva výsledky pro každý projekt:

PRVNÍ povinný výsledek pro každý projekt	DRUHÝ povinný výsledek pro každý projekt (možnosti)
J _{imp} - původní/přehledový článek v odborném periodiku, který je obsažen v databázi Web of Science	J _{imp} - původní/přehledový článek v odborném periodiku, který je obsažen v databázi Web of Science
	B - odborná kniha
	C - kapitola v odborné knize
	P – patent
	F _{prum} , F _{užit} - průmyslový vzor, užitečný vzor
	N _{met} - certifikovaná metodika
	JSC - původní/přehledový článek v recenzovaném odborném periodiku, který je obsažen v databázi SCOPUS

Ekonomika

Náklady projektu

- Investiční náklady nevznikají.
- **Osobní náklady** jsou uvedeny níže, včetně honorárií za statistické zpracování: **196 000 Kč**
- **Materiálové náklady:** náklady na mezinárodní EKK: **5 000 Kč**
- **Náklady na editaci odborného textu a open access poplatky:** **60 000 Kč.**

Celkové náklady projektu činí **261 000 Kč.**

Osobní náklady

Jméno - řešitelský tým Nemocnice Havířov	celková navrhovaná částka za projekt (max 50 000 Kč/1 osobu)	zapojení v jednotlivých letech	
		2024	2025
MUDr. David Starostka, Ph.D. (DS)	28 000	ANO	ANO
MUDr. Richard Doležilek (RD)	30 000	ANO	ANO
MUDr. Peter Kováč (PK)	18 000	ANO	ANO
Mgr. Petra Miczková (PM)	20 000	ANO	ANO

Jméno - řešitelský tým FN Ostrava, FN Olomouc, VŠB-TU Ostrava	celková navrhovaná částka za projekt (max 50 000 Kč/1 osobu)	zapojení v jednotlivých letech	
		2024	2025
MUDr. David Buffa (DB)	20 000	ANO	ANO
Mgr. Soňa Kolářová (SK)	10 000	ANO	ANO
Mgr. Jarmila Juráňová (JJ)	10 000	ANO	ANO
Doc. Mgr. Miloš Kudělka (MK)	60 000	ANO	ANO

Za řešitelský tým:



MUDr. David Starostka, Ph.D.

Havířov 6.5.2024