



## **Središnja medicinska knjižnica**

**Dujmović, Dino (2014) *Izvanstanična cirkulirajuća DNA kao prognostički biljeg u bolesnika s limfomom [Cell-free circulating DNA (cfDNA) as a marker in patients with lymphoma]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/2160>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Dino Dujmović**

**Izvanstanična cirkulirajuća DNA kao  
prognostički biljeg u bolesnika s  
limfomom**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2014.**

UNIVERSITY OF ZAGREB  
SCHOOL OF MEDICINE

**Dino Dujmović**

**Cell-free circulating DNA (cfDNA) as a  
marker in patients with lymphoma**

**DISERTATION**

Zagreb, 2014

*Disertacija je izrađena na Zavodu za hematologiju i Zavodu za patologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu*

*Voditelj rada:  
prof.dr.sc. Igor Aurer*

***Zahvala***

*Hvala na strpljenju i stečenom znanju: mentoru, prof.dr.sc. Igoru Aureru, kolegama, prijateljima i posebno obitelji, majci i baki, koji su svi strpljivo bili uz mene tijekom dokorskog studija i izrade rada.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 LIMFOMI</b> .....	<b>8</b>
1.1.1 HODGKINOV LIMFOM.....	8
1.1.2 NON-HODGKINOVIM LIMFOMIMA B-IMUNOFENOTIPA.....	9
1.1.3 NON-HODGKINOVIM LIMFOMIMA T I NK IMUNOFENOTIPA.....	13
<b>1.2 IZVANSTANIČNA DNA</b> .....	<b>14</b>
1.2.1 IZVANSTANIČNA DNA U SOLIDNIM TUMORIMA.....	15
1.2.2 IZVANSTANIČNA DNA U LIMFOMIMA.....	15
<b>1.3 PROGNOŠTIČKI INDEKSI I BILJEZI</b> .....	<b>16</b>
1.3.1 IPI.....	16
1.3.2 FLIPI.....	17
1.3.3 MIPI.....	18
1.3.4 PROGNOŠTIČKI INDEKSI U HODGKINOVOM LIMFOMU.....	19
1.3.5 LDH.....	19
1.3.6 BETA-2 MIKROGLOBULIN.....	20
1.3.7 KI-67.....	20
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	<b>22</b>
<b>3. CILJEVI</b> .....	<b>23</b>
<b>4. BOLESNICI, MATERIJALI, METODE</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1 BOLESNICI</b> .....	<b>24</b>
4.1.1 ETIČKA NAČELA.....	24
4.1.2 KRITERIJI UKLJUČIVANJA BOLESNIKA.....	24
4.1.3 OBRADA BOLESNIKA.....	24
4.1.4 LIJEČENJE BOLESNIKA I PROCJENA ODGOVORA.....	25
<b>4.2 MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>26</b>
4.2.1 UZORKOVANJE.....	26
4.2.2 IZOLACIJA DNA.....	26
4.2.3 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE DNA.....	26
4.2.4 PATOHISTOLOŠKE METODE.....	26
4.2.5 STATISTIČKE METODE.....	27
<b>5. REZULTATI</b> .....	<b>28</b>
<b>5.1 SVI BOLESNICI</b> .....	<b>28</b>
<b>5.2 B-NON HODGKINOVIM LIMFOMIMA</b> .....	<b>33</b>
5.2.1 AGRESIVNI B-NON HODGKINOVIM LIMFOMIMA.....	35
5.2.2 INDOLENTNI B-NON HODGKINOVIM LIMFOMIMA.....	41
<b>5.3 HODGKINOV LIMFOM</b> .....	<b>48</b>
<b>5.4 T-NON HODGKINOVIM LIMFOMIMA</b> .....	<b>53</b>
<b>5.5 DINAMIKA KONCENTRACIJE IZVANSTANIČNE DNA</b> .....	<b>56</b>
<b>6. RASPRAVA</b> .....	<b>58</b>
<b>7. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>62</b>
<b>8. SAŽETAK</b> .....	<b>63</b>
<b>9. SUMMARY</b> .....	<b>64</b>
<b>10. LITERATURA</b> .....	<b>65</b>
<b>11. KRATKA BIOGRAFIJA</b> .....	<b>70</b>

## POPIS KRATICA

ABVD	kemoterapijski protokol: doksorubicin, bleomicin, vinblastin, dakarbazin
AIL	angioimunoblastični limfom
ALCL	anaplastični velikostanični limfom
ATKS	transplantacija autolognih matičnih krvotvornih stanica
B2M	beta-2 mikroglobulin
BL	Burkittov limfom
B-LCL	B-velikostanični limfom
cfDNA	izvanstanična DNA
CEOP	kemoterapijski protokol: ciklofosamid, etopozid, vinkristin, prednizon
CHOP	kemoterapijski protokol: ciklofosamid, doksorubicin, vinkristin, prednizon
CHOEP	kemoterapijski protokol: CHOP + etopozid
CNOP	kemoterapijski protokol: ciklofosamid, mitoksantron, vinkristin, prednizon
CNS	središnji živčani sustav
CT	kompjuterizirana tomografija
CVP	kemoterapijski protokol: ciklofosamid, vinkristin, prednizon
DA	podešavanje doze prema toksičnosti
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DKS	diferencijalna krvna slika
DLBCL	difuzni B-velikostanični limfom
eBEACOPP	kemoterapijski protokol: eskalirani bleomicin, etopozid, doksorubicin, ciklofosamid, vinkristin, prokarbazin, prednizon
EBV	Epstein-Barrov virus
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group – velika američka kooperativna skupina
EFS	preživljavanje bez događaja
EMZL	ekstranodalni limfom marginalne zone
EPOCH	infuzijski kemoterapijski protokol: etopozid, prednizon, vinkristin, ciklofosamid, doksorubicin
FL	folikularni limfom

FLIPI	međunarodni prognostički indeks za folikularne limfome
HIV	virus ljudske imunodeficijencije
HL	Hodgkinov limfom
IPI	međunarodni prognostički indeks
IPS	međunarodni prognostički indeks za Hodgkinov limfom
LBL	limfoblastični limfom
LDH	laktat dehidrogenaza
LPL	limfoplazmocitoidni limfom
M	muškarci
MALT	limfatično tkivo povezano sa sluznicom
MCL	limfom plaštene zone
MIPI	međunarodni prognostički indeks za limfome plaštene zone
MZL	limfom marginalne zone
NAD	nikotinamid adenin
NMZL	nodalni limfom marginalne zone
NHL	non-Hodgkinov limfom
NOS	nespecificirani
OS	ukupno preživljavanje
PCR	lančana reakcija polimeraze
PET	pozitronska emisijska tomografija
PS	opće stanje bolesnika
PTCL	periferni T-stanični limfom
R	rituksimab
SAD	Sjedinjene američke države
SE	sedimentacija eritrocita
SLL	limfom malih limfocita
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
Ž	žene



# 1. UVOD

## 1.1 LIMFOMI

### 1.1.1 Hodgkinov limfom

Hodgkinov limfom (HL) je limfoidna neoplazma koju je prvi put 1832. godine opisao Thomas Hodgkin (T) <sup>1</sup>. Limfom je građen od pojedinačnih tumorskih Reed-Sternbergovih i Hodgkinovih stanica koje su okružene reaktivnim staničnim infiltratom eozinofila, limfocita, fibroblasta, histiocita i drugih upalnih stanica. Tumorske stanice su velike s obilnom bazofilnom citoplazmom, redovito CD30+, često CD15+, dok su B-stanični biljezi obično negativni<sup>2,3</sup>. Reed-Sternbergove stanice imaju najmanje dvije jezgre s eozinofilnom jezgrićom što im daje izgled sovinog oka. Tumorske stanice čine manje od 10%, a često i manje od 1% volumena tumora. Diferencijalno-dijagnostički može ponekad biti teško razlikovati HL i ALCL. Zbog malog broja tumorskih stanica u uzorku, postavljanje dijagnoze HL iz malih bioptičkih uzoraka, npr. onih dobivenih iglenom biopsijom, može predstavljati problem. Godišnja incidencija je 1-3 novih bolesnika na 100.000 stanovnika, muškarci oboljevaju češće od žena. Razdioba pojavnosti po dobi je bimodalna s najvećom incidencijom oko 30. i 70. godine života<sup>4</sup>.

Razlikujemo dva osnovna patohistološka tipa HL, nodularnu limfocitnu predominaciju i klasični Hodgkinov limfom. Potonji se dijeli na 4 podtipa: nodularnu sklerozu, mješanu celularnost, limfocitima bogat i limfocitima siromašan podtip.<sup>5</sup>

Klinički bolest se najčešće očituje povećanjem limfnih čvorova koji su bezbolni, čvrste konzistencije te postepeno rastu. U oko 40% bolesnika prisutni su B simptomi. Najčešće su zahvaćeni limfni čvorovi vrata, aksila i medijastinuma, dok bolest rijetko zahvaća središnji živčani sustav, probavni sustav, kožu, kost i koštanu srž.

Za prvu liniju liječenja koriste se najčešće 2 kemoterapijska protokola: ABVD i eBEACOPP s ili bez ozračenja zahvaćenih regija. Između 5 i 35 % bolesnika je refraktorno na prvu liniju liječenja ili uđe u relaps. Većina relapsa se javlja unutar 3 godine, no ima i vrlo kasnih, nakon više od 10 godina Ova skupina bolesnika liječi se visokodoznom polikemoterapijom nakon koje slijedi autologna transplantacija matičnih krvotvornih stanica. Takvim pristupom može se izliječiti oko 60% bolesnika u relapsu i oko 30%-40% onih s refraktornom bolešću.<sup>6,7</sup>

## 1.1.2 Non-Hodgkinovi limfomi B-imunofenotipa

### 1.1.2.1 Folikularni limfom

Folikularni limfom (FL) je najčešći indolentni limfom, na njega ovisno o zemljopisnoj regiji otpada između 10 i 30 % svih non-Hodgkinovih limfoma (NHL)<sup>8</sup>. Kod nas čini oko 20% NHL. Tumor je građen od malih i velikih, zarezanih i nezarezanih limfatičkih stanica, centrocita i centroblasta koji izražavaju biljege B stanica: CD19, CD20 i CD79b te BCL2 i CD10. CD5 i CD43 su negativni. Tumorsko tkivo često stvara folikule oponašajući normalnu građu limfnog čvora. U većini slučajeva se nalazi translokacija t(14;18)(q32;q21) koja dovodi do povećane ekspresije antiapoptotičkog proteina BCL2<sup>9</sup>.

FL ima tri stupnja zloćudnosti, tzv. gradusa, koji se određuju prema broju velikih stanica u vidnom polju mikroskopa<sup>10</sup>. Spada u limfome dobre prognoze, petogodišnje preživljenje je preko 70%, prosječno preživljenje je oko 11 godina. U oko 1/3 bolesnika s FL 1<sup>11</sup>. stupnja povećani limfni čvorovi privremeno spontano regresiraju. Za određivanje prognoze je napravljen poseban prognostički indeks, FLIPI (follicular lymphoma international prognostic indeks – međunarodni prognostički indeks za folikularne limfome).

### 1.1.2.2 Limfom plaštene zone

Limfom plaštene zone (MCL) je agresivni limfom koji čini 3-10% svih NHL. Radi se o tumoru malih do srednje velikih stanica, centrocita koji obično izražavaju CD5, FMC7, CD43, BCL2 i ciklin-D1, jako su pozitivne na IgM, dok su CD10, CD23 i BCL6 negativni<sup>12</sup>. U većine slučajeva nalazi se t(11;14)(q13;q32) koja dovodi do povećane ekspresije ciklina-D1. Postoje plazma-stanična i blastoidna morfološka inačica. Pri dijagnozi je bolest obično diseminirana u koštano srž i ekstrapodalne organe, nerijetko gastrointestinalni trakt.<sup>13,14</sup> Odgovor na konvencionalnu kemoterapiju je lošiji nego u FL, a bolest ima trajnu sklonost relapsima. Petogodišnje preživljavanje je oko 40%. Nepovoljni prognostički čimbenici su visok MIPI (Mantle cell international prognostic indeks – međunarodni prognostički indeks za limfome plaštene zone): dob, LDH, broj leukocita i opće stanje, > 30-60% tumorskih stanica pozitivnih na Ki67 i blastoidna morfološka.<sup>15,16</sup> Mali broj bolesnika ima indolentan tijek.

### *1.1.2.3 B-velikostanični limfomi*

Nova klasifikacija SZO prepoznaje nekoliko vrsta B-velikostaničnih limfoma (B-LCL) od kojih je daleko najčešći nespecificirani difuzni B-velikostanični limfom (DLBCL-NOS).<sup>17</sup> Nešto češće se javljaju još B-velikostanični limfom bogat T stanicama ili histiocitima i primarni medijastinalni B-velikostanični limfom. B-LCL je najčešći limfom, na njega otpada 35-40% svih slučajeva. Malo je češći u muškaraca, a medijan pojave bolesti je oko 60. godine života. Histološki se nalaze velike tumorske stanice koje izražavaju biljege B loze.<sup>18,19</sup> Oko 30% bolesnika se pri dijagnozi prezentira s ektranodalnom lokalizacijom. Najčešće su probavni sustav (obično želudac), središnji živčani sustav, koža, testis, no može se javiti u bilo kojem organu<sup>20</sup>. Agresivnog je kliničkog tijeka, a prognoza ovisi o IPIu (međunarodnom prognostičkom indeksu). Izliječenje u slučajevima niskog rizika je preko 80%, srednjeg oko 60%, a visokog oko 40%. R-CHOP je najšire prihvaćena standardna kemoterapija novodijagnosticiranih bolesnika.<sup>21</sup> Bolesnike koji ne odgovore na prvu liniju ili uđu u relaps treba liječiti rituksimabom i nekim od kemoterapijskih protokola druge linije, a potom autotransplantirati. Oko 50% bolesnika u kasnom relapsu će povoljno odgovoriti na ovakvo liječenje. Bolesnici, koji su refraktorni na uvodnu terapiju ili uđu u rani relaps (manje od godinu dana od dijagnoze), imaju vrlo lošu prognozu. Liječi ih se na isti način kao i one u kasnom relapsu, no uz vrlo loš ishod (manje od 25% odgovora).<sup>22</sup>

### *1.1.2.4 Intermedijarni limfomi*

U ovu skupinu tzv. limfoma „sive zone“ spadaju 2 tipa limfoma. Prvi je limfom koji ima morfološka i genetička obilježja između DLBCL i Burkittovog limfoma (BL) pa se ne može kategorizirati ni u jedan od njih. Rijedak je, najčešće se javlja u odraslih. Kod većine bolesnika bolest je disemirana, u više od 50% s ektranodalnom lokalizacijom. Loše odgovara kako na modalitete liječenja DLBCL-a, tako i na modalitete liječenja BL te stoga ima vrlo lošu prognozu.<sup>23</sup>

Drugi limfom iz ove skupine je limfom koji ima morfološka i imunofenotipska obilježja DLBCL i HL. Obično se javlja kod mlađih muškaraca. Najčešće se prezentira velikom medijastinalnom masom sa zahvaćenim supraklavikularnim limfnim čvorovima dok su ostale regije perifernih čvorova rijetko zahvaćene. Ima agresivniji klinički tijek i lošiju prognozu nego HL i DLBCL te za sada nema konsenzusa oko najboljeg načina liječenja.<sup>24</sup>

#### 1.1.2.5 Ostali agresivni limfomi B-imunofenotipa

Limfoblastični limfom (LBL): limfomski oblik zloćudne neoplazme koja po svim ostalim karakteristikama odgovara akutnoj limfoblastičnoj leukemiji B imunofenotipa. LBL je tumor nezrelih (prekursorskih) limfatičnih stanica, limfoblasta. Najčešće se prezentira kao leukemija, ali ima i čisto limfomskih oblika. Bolesnici su obično mlađe životne dobi. Liječi se intenzivnom kemoterapijom. Bolesnicima s *bcr-abl* translokacijom treba uz kemoterapiju dati imatinib. Bolesnike višeg rizika treba alotransplantirati, dok se oni nižeg rizika liječe višegodišnjom terapijom. LBL je tumor loše prognoze, izliječenje se postiže u oko 30% bolesnika.<sup>25</sup>

Burkittov limfom (BL): Pri dijagnozi bolest je obično diseminirana, a tumorska masa raste vrlo brzo. Često se nalazi velika retroperitonealna tumorska masa i ascites, a nerijetko je zahvaćen i CNS<sup>26,27</sup>. Tumor je građen od jednoličnih, srednje velikih B stanica s bazofilnom citoplazmom i brojnim mitozama. Među tumorskim stanicama se nalaze benigni makrofagi koji ih fagocitiraju i daju preparatu izgled zvjezdanog neba. Stanice BL izražavaju membranski IgM, laki Ig lanac, B stanične antigene, CD10 i BCL6. CD5, CD23, TdT i BCL2 su negativni. Proliferacijski indeks (izražaj Ki67) je vrlo visok, 99-100%. Najčešća citogenetska promjena je t(8;14)(q24;q32), rjeđe se nalaze t(2;8)(q11;q24) ili t(8;22)(q24;q11).<sup>20,28</sup> Ovim translokacijama se *myc* gen dovodi u područje djelovanja promotora za teški ili lake lance Ig što dovodi do povećane ekspresije MYC proteina koji sprečava zaustavljanje stanica u G0 fazi ciklusa. BL se javlja kao endemski oblik u ekvatorijalnoj Africi i Novoj Gvineji u djece inficirane malarijom i EBV, kao sporadični oblik u drugim dijelovima svijeta te u imunokompromitiranih bolesnika, obično inficiranih HIV-om. To je bolest dječje i mlađe odrasle dobi, iako se može javiti i u starijih odraslih. Na BL otpada oko 3% slučajeva NHL.<sup>29</sup> Terapija izbora je intenzivna kemoterapija temeljena na visokim dozama metotreksata u kombinaciji s rituksimabom ili DA-R-EPOCHa<sup>30</sup>. Većina relapsa se javlja unutar godinu dana od dijagnoze. Ne postoji standardna druga linija liječenja, ATKS nije od koristi. Bolesnike u 2. remisiji se može pokušati izliječiti alotransplantacijom. Uz suvremenu terapiju je petogodišnje preživljavanje bolesnika s BL oko 80%. Djeca i bolesnici s lokaliziranom bolešću imaju bolju, a bolesnici stariji od 50 godina, koji slabo podnose visoke doze metotreksata, i oni sa zahvaćenim CNS-om lošiju prognozu.

### 1.1.2.6 Ostali indolentni limfomi

Limfom malih limfocita (SLL): limfomski oblik kronične limfocitne leukemije, klinički se prezentira kao i ostali indolentni limfomi. Tumor je građen od malih, naizgled zrelih limfocita koji izražavaju biljege B stanica (CD19, CD20 i CD79a), CD5 i CD23. Osim njih se mogu naći i atipične nešto veće tumorske stanice, tzv. prolimfociti. Na SLL otpada oko 7% svih NHL.<sup>31</sup>

Limfoplazmocitoidni limfom (LPL): Tumor građen od stanica koje mogu izgledati kao mali B limfociti ili limfoplazmocitoidne stanice, a mogu se naći i plazma stanice. Tumorske stanice izražavaju B stanične antigene te površinski IgM, rjeđe IgG ili IgA. CD5, CD10 i CD23 su obično negativni. U oko 50% bolesnika nalazi se t(9;14)(p13;q23) i mutacije PAX-5 gena.

Bolest je rijetka, na nju otpada oko 1% svih NHL, a javlja se u starijoj životnoj dobi. Liječenje LPL je slično onom ostalih indolentnih nodalnih NHL. U slučaju izraženog hiperviskoznog ili paraneoplastičkog sindroma, može se monoklonski IgM brzo i učinkovito ukloniti plazmaferezom. Prognoza je ista kao za nodalni limfom marginalne zone (NMZL) ili SLL, petogodišnje preživljavanje je oko 70%, a prosječno preživljavanje 8-9 godina.<sup>32</sup>

Nodalni limfom marginalne zone: Tumor je građen od malih do srednje velikih stanica koje mogu izgledati kao mali limfociti, centroцитi ili imati monocitoidni izgled. Stanice izražavaju biljege B loze dok su CD5, CD10 i CD23 negativni. Na NMZL u zapadnoj Europi otpada oko 3% svih NHL, a u srednjoj Europi i kod nas oko 10%. Klinička prezentacija je slična onoj FL. Nema kliničkih studija provedenih posebno u ovoj bolesti, no pristup i liječenje je isto kao za FL. Ishod je nešto lošiji s prosječnim preživljavanjem od oko 8-9 godina.<sup>33</sup>

EMZL ili MALTom (MALT=mucosa associated lymphoid tissue, limfatično tkivo povezano sa sluznicom) je tumor limfatičnih stanica koji nastaju u nelimfatičkim organima nakon duže stimulacije antigenom. Tumorske stanice imaju morfološke i imunološke značajke kao u NMZL. Pri dijagnozi su obično lokalizirani, rijetko dolazi do sustavnog širenja. U oko 60% slučajeva se nalazi trisomija 3. kromosoma, a u 25-50% t(11;18)(q21;q21)<sup>34</sup>. Najčešći su želučani MALTomi koji nastaju uslijed dugotrajne infekcije H. pylori. Bolest, ako nije proširena izvan želuca, većinom regredira nakon eradikacije H. pylori infekcije i bez citostatskog liječenja. Jedna od češćih lokalizacija ovog tumora su i adneksa oka. Neka istraživanja ukazuju da su ekstranodalni MZL adneksa oka uzrokovani trajnom klamidijalnom infekcijom i da eradikacija ove infekcije može dovesti do regresije tumora. Ekstranodalni MZL čine oko 6% svih NHL. Imaju dobru prognozu, petogodišnje preživljavanje je oko 85%, rijetko koji bolesnik umre od limfoma tako da agresivno liječenje skoro nikada nije indicirano.<sup>35</sup>

### 1.1.3 Non-Hodgkinovi limfomi T i NK imunofenotipa

#### 1.1.3.1 Anaplastični velikostanični limfom

Anaplastični velikostanični limfom (ALCL) je T ili NK-stanični CD30+ tumor građen od velikih stanica s obilnom citoplazmom i nepravilnim, često potkovastim jezgrama. Nova klasifikacija SZO razlikuje inačicu s i bez izražaja ALK proteina. Prva je bolje prognoze, a u tumorskim stanicama se obično nalazi t(2;5). ALK+ ALCL je tumor djece i mlađi odraslih, čini oko 3% svih NHL, obično uz mušku predominaciju<sup>36</sup>. Obično zahvaća limfne čvorove, no ni ektranodalna lokalizacija nije rijetka. Češće su zahvaćeni koža, kosti i meka tkiva, a CNS i probavni sustav rijetko. Pri dijagnozi je bolest obično diseminirana uz često prisutne B simptome<sup>37</sup>. Dobro odgovara na standardnu kemoterapiju (tj. CHOP), no često dolazi do relapsa. Međutim, najčešće i nakon toga ostaje kemosenzitivan, tako da se bolesnike uglavnom uspijeva izliječiti intenzivnom 2. linijom kemoterapije i ATKSom. Zbog toga je ovo T/NK limfom s najboljom prognozom, petogodišnje preživljavanje odraslih bolesnika je oko 70%, a kasni relapsi su rijetki. ALK- inačica se obično javlja u 5. i 6. desetljeću života. Slabije odgovara na liječenje od ALK+, a petogodišnje preživljavanje je nešto bolje nego u nespecificiranog perifernog T-staničnog limfoma (PTCL-NOS).<sup>38,39</sup>

#### 1.1.3.2 Periferni T-stanični limfomi

SZO klasifikacija prepoznaje nekoliko entiteta koji se razlikuju kako po kliničkoj prezentaciji, tako i po morfološkim, odnosno imunološkim značajkama. Histološki se nalazi tumor građen od T ili NK stanica koje obično izražavaju aberantne kombinacije imunoloških biljega. Ako se radi o T staničnom tumoru, molekulski se može dokazati klonalnost T-staničnog receptora. Prognoza PTCL je loša, uz standardno liječenje petogodišnje preživljavanje ne prelazi 30%.<sup>40</sup> Nespecificirani T periferni limfom: U ovu skupinu spadaju svi PTCL koji ne ispunjavaju kriterije za uključivanje u druge tipove. Tumorske stanice su obično CD4 pozitivne i CD8 negativne. Morfologija može biti jako različita, tumor može biti građen od naizgled normalnih T limfocita ili od izrazito atipičnih stanica. Na PTCL-NOS otpada oko 6% svih NHL. Pri dijagnozi je bolest obično diseminirana. Nema konsenzusa o optimalnom liječenju, a petogodišnje preživljavanje iznosi < 30%.<sup>41</sup>

Angioimunoblastični limfom (AIL): Tumor je građen od polimorfnog infiltrata s izraženom proliferacijom endotela venula i folikularnih dendritičkih stanica. Osim, naizgled skoro normalnih, malih do srednje velikih T stanica u čvorovima se vidi reaktivni infiltrat građen od

B limfocita, eozinofila, plazma stanica, histiocita i folikularnih dendritičkih stanica. Mogu se naći stanice nalik na Reed-Sternbergove. Obično ima više CD4 nego CD8 pozitivnih stanica. Na angioimunoblastični T stanični limfom otpada oko 1% svih NHL. Bolest je pri dijagnozi obično diseminirana, s izraženim sustavnim simptomima, bolesnici su imunodeficijentni što otežava terapiju. Tijek bolesti je agresivan, pristup liječenju kao i u nespecificiranom PTCL, a prognoza nešto bolja.<sup>42</sup>

Ekstranodalni nosni tip: Primarni ekstranodalni tumor medijane linije, najčešće nosne šupljine. Tumor je obično građen od NK, rjeđe T stanica i EBV je pozitivan. Raste angiocentrično s dosta nekroze i vaskularne destrukcije. Bolesnici obično imaju izražene sustavne simptome<sup>43</sup>.

Enteropatski tip: Tumor intraepitelnih T limfocita, obično velikih, koji izražavaju CD3, CD7, CD103 i djelomično CD30. CD4 i CD5 su negativni, CD8 i CD56 mogu biti pozitivni ili negativni. Obično nastaje u crijevima, a češće se javlja u bolesnika sa celijakijom. Bolest se obično prezentira abdominalnim tegobama, nerijetko perforacijom. Zbog enteropatije javlja se malapsorpcija. Bolest je agresivnog tijeka, slabo reagira na standardno liječenje, a čini se bolje na agresivnu kemoterapiju.<sup>44</sup>

Hepatosplenički tip: Tumor građen od CD4, CD8 i CD5 negativnih T stanica, obično s  $\gamma\delta$  tipom T-staničnog receptora. Bolest se prezentira sustavnim simptomima, hepatosplenomegalijom, infiltracijom koštane srži, leukocitozom, anemijom i trombocitopenijom. Limfni čvorovi obično nisu povećani. Klinički tijek je izrazito agresivan, a medijan preživljavanja je manji od dvije godine.<sup>45</sup>

## 1.2 IZVANSTANIČNA DNA

Izvanstanična cirkulirajuća DNA (circulating cell-free DNA, cfDNA) je slobodna DNA koja se nalazi u krvi izvan stanica. U malim količinama se nalazi u plazmi zdravih osoba u koncentraciji 0 do 35 ng/ml, medijan je 12.1 ng/ml<sup>51</sup>, dok u bolesnika s malignim oboljenjima se te vrijednosti kreću od 0 do 1000 ng/ml (prosječno 180 ng/ml). Porijeklo slobodne cirkulirajuće DNA nije u potpunosti objašnjeno, pretpostavlja se da postoje dva glavna izvora: apoptoza te nekroza i otpuštanje cijelih tumorskih stanica koje budu uništene u cirkulaciji. Apoptotska stanična smrt je karakterizirana tipičnom fragmentacijom DNA („apoptotic ladder“) uzrokovanom internukleosomskim cijepanjem. U nekim slučajevima cfDNA također pokazuje tipičan obrazac fragmentacije, no mogu se otkriti i veliki komadi DNA<sup>46</sup>. U nekih bolesnika s karcinomom prostate, dojke ili pluća u krvotoku su nađene cijele tumorske stanice.<sup>47,48</sup> Ove stanice nisu metastatske i nemaju sposobnost ekstravazacije i

kolonizacije drugih organa. Lizom ovih tumorskih stanica u krvotoku nastaju veliki odlomci cfDNA.

### 1.2.1 Izvanstanična DNA u solidnim tumorima

U bolesnika s malignim bolestima slobodna DNA ima genetske i epigenetske osobine koje jasno ukazuju da je tumorskog porijekla. Prvi dokaz toga je bila detekcija identičnih mutacija proto-onkogeni i tumorskih supresorskih gena (*KRAS2*, *TP53*) iz tumora i slobodne DNA kod istog bolesnika. Slobodna DNA pokazuje fizička svojstva slična tumorskoj jer nakon primjene citostatika „in vitro“ pokazuje slabiju stabilnost lanca, jednako kao DNA izolirana iz tumorskih stanica. Koncentracija cfDNA nije povezana s tipom tumora, gradusom ili lokalizacijom, no postoje dokazi da su koncentracije veće kod bolesnika s proširenim stadijima bolesti i udaljenim metastazama.<sup>47,48,49</sup>

### 1.2.2 Izvanstanična DNA u limfomima

Za razliku od solidnih tumora gdje je prisustvo i korelacija koncentracije cfDNA s biološkim, kliničkim i prognostičkim značajkama bolesti detaljno ispitana, za hematološke neoplazme postoji tek mali broj dostupnih informacija. Objavljena su samo dva rada, jedan u djece, a drugi u odraslih.

U pedijatrijskih bolesnika s limfomima je razina slobodne DNA viša nego u zdrave djece. Nema statistički značajne razlike u koncentraciji cfDNA između tri najčešća histološka tipa (BL, HL i ALCL). Starija djeca s HL i proširenim ALCL su imala veću koncentraciju cfDNA, nego mlađa. Nije nađena korelacija između koncentracije cfDNA i ostalih kliničkih osobina poput B simptoma, razine LDH i veličine tumorske mase. Koncentracija cfDNA je korelirala s prognozom samo u bolesnika s HL. Bolesnici s vrijednostima nižim od 46 ng/ml su imali statistički bolje EFS, nego bolesnici s koncentracijom višom od 46 ng/ml (trogodišnji EFS 92% naprema 60%).<sup>50</sup>

U odraslih je koncentracija cfDNA bila povišena pri dijagnozi kod bolesnika s DLBCL, MCL i HL, dok je kod bolesnika s FL bila otprilike ista kao i u zdravih bolesnika<sup>51</sup>. Kod DLBCL je povišena razina slobodne DNA korelirala s nekoliko poznatih negativnih prognostičkih faktora. Bolesnici stariji od 60 godina, oni s proširenom bolesti (stadij III i IV) i povišenom razinom laktat dehidrogenaze (LDH) imali su povišenu razinu cfDNA. Slična povezanost je nađena i za B-simptome kao i za veliku tumorsku masu. Posljedično tome, bolesnici s povišenim vrijednostima cirkulirajuće DNA imali su veći IPI i nepovoljniju prognozu.



Bolesnici s DBLCLom koji su pri dijagnozi imali niže ili normalne vrijednosti cfDNA imali su i duže vrijeme do neuspjeha terapije. U drugim tipovima limfoma koncentracija cfDNA nije bila u korelaciji s prognozom.

### 1.3 PROGNOŠTIČKI INDEKSI I BILJEZI

#### 1.3.1 IPI

Međunarodni prognostički indeks (IPI) koristi se od 1993. godine kao osnovni prognostički model za bolesnike s limfomima (tablica 1). Negativni prognostički faktori su dob > 60 godina, stadij III ili IV, povišen LDH, ECOG PS  $\geq 2$ , više od jedne ektranodalne lokalizacije. Svaki od navedenih parametara nosi po jedan bod. Postoje 4 prognostičke skupine bolesnika: niskog rizika, niskog srednjeg rizika, srednje visokog i visokog rizika<sup>52</sup>.

TABLICA 1 IPI

Dob $\geq 60$ godina
Stadij III ili IV
Povišen LDH
ECOG PS $\geq 2$
Više od jedne ektranodalne lokalizacije

Broj bodova(IPI score)	Prognoza(rizik)	5-godišnje preživljenje
0,1	Nizak rizik	73%
2	Nizak/srednji rizik	51%
3	Srednji/visok rizik	43%
4,5	Visok rizik	26%

Zbog uvođenja rituksimaba i njegovog utjecaja na liječenje limfoma je 2007. godine reviziran IPI (tablica 2). Identificirane su tri prognostičke grupe: loše, dobre i vrlo dobre prognoze.<sup>53</sup>

TABLICA 2

Skupina rizika	broj rizičnih faktora	Postotak bolesnika	4-godišnji OS
Loša	3,4,5	45%	55%
Dobra	1,2	45%	79%

Vrlo dobra	0	10%	94%
------------	---	-----	-----

I danas se IPI smatra zlatnim standardom s kojim se uspoređuju svi ostali prognostički parametri.

### 1.3.2 FLIPI

2004. godine, nakon analize više od 4000 bolesnika, predložen je novi prognostički indeks za FL, FLIPI (tablica 3). U FLIPI su uključeni parametri koji se odnose na karakteristike bolesnika (mlađi od 60, naprema stariji od 60 godina) veličinu tumorske mase (Ann Arbor stadij I i II, naprema III-IV; broj zahvaćenih nodalnih područja manje ili više ili jednako od 4), agresivnost tumora (razina LDH manja ili veća od gornje granice referentnog intervala) te na utjecaj tumora na koštanu srž (razina hemoglobina viša ili niža od 120 g/L). Na temelju ovih parametara bolesnici s FL se mogu svrstati u jednu od 3 skupine: niskog, srednjeg i visokog rizika. Pokazana je razlika u preživljenju između svih grupa rizika, stoga se danas FLIPI redovito koristi za određivanje prognoze i procjenu najboljeg terapijskog pristupa pojedinom bolesniku.<sup>54</sup>

TABLICA 3 FLIPI

Parametar		Broj bodova	
Dob (stariji od 60 godina)		1	
Veličina tumorske mase (stadij III i IV)		1	
Razina serumskog LDH (iznad gornje granice referentnog intervala)		1	
Razina hemoglobina (ispod 120 g/l)		1	
Broj zahvaćenih nodalnih regija (4 i više)		1	
Skupina rizika	broj rizičnih faktora	Postotak bolesnika	5-godišnji OS
niski	0-1	36%	71%
srednji	2	37%	51%
visoki	3 i više	27%	36%

### 1.3.3 MIPI

IPI i FLIPI nisu dovoljno specifični za limfom plaštenih stanica. Njemačka skupina za indolentne limfome je analizirala podatke 455 bolesnika s MCL liječenih između 1996. i 2004. Analizom laboratorijskih i kliničkih značajki identificirana su 4 pokazatelja s neovisnom prognostičkom vrijednošću: dob, ECOG PS, LDH i broj leukocita. Postoje 3 inačice MIPI-a, prvi koji uključuje složen matematički model (tablica 4), biološki koji uključuje indeks proliferacije Ki67 i pojednostavljeni.

Matematička formula glasi:  $[0,03535 \times \text{dob}] + 0,6978$  (ako je  $\text{PS} > 1$ ) +  $[1,367 \times \log_{10}(\text{LDH}/\text{gornja granica vrijednosti})] + [0,9393 \times \log_{10}(\text{broj leukocita u nl})]$

TABLICA 4 MIPI

MIPI	rizik	Postotak bolesnika	Medijan preživljenja
< 5.7	Nizak	44%	Nije postignuto
5.7- < 6.2	Srednji	35%	51 mjesec
≥6.2	Visok	21%	29 mjeseci

Obzirom na složenost matematičkog modela napravljen je pojednostavljeni MIPI (tablica 5). Za svaki od parametara dodaju se od 0 do 3 boda, do maksimalne vrijednosti od 11 bodova. Pacijenti sa zbrojem od 0-3 klasificiraju se kao niskog rizika, od 4-5 srednjeg, a 6-11 se klasificiraju kao bolesnici visokog rizika.

TABLICA 5 Pojednostavljeni MIPI

Broj bodova	Dob u godinama	ECOG PS	LDH/ULN	L (x10 <sup>9</sup> )
0	<50	0-1	<0.67	<6.7
1	50-59	-	0.67-0.99	6.7-9.99
2	60-69	2-4	1.00-1.49	10.000-14.99
3	≥70	-	≥1.5	≥15.00

Biološki model koji uključuje i vrijednost proliferacijskog indeksa Ki67 zbog slabe reproducibilnosti podataka se manje koristi u rutinskoj praksi, a više u kliničkim ispitivanjima.<sup>55</sup>

### 1.3.4 Prognošički indeksi u Hodgkinovom limfomu

Kod Hodgkinovog limfoma koriste se različiti prognošički indeksi ovisno o proširenosti bolesti (tablica 6). Kod bolesnika s lokaliziranom bolesti u stadiju I i II nepovoljni prognošički čimbenici su: zahvaćenost 3 ili više regija limfnih čvorova, velika tumorska masa u medijastinumu (promjer  $>1/3$  prsnog koša), SE  $>50$  bez B simptoma, SE  $>30$  s B simptomima te ekстранodalna bolest. Bolest ima nepovoljnu prognozu ako je ispunjen barem jedan od navedenih uvjeta.<sup>56</sup>

Kod bolesnika s proširenom bolesti (stadij III ili IV) u uporabi je Hasencleverov indeks (IPS) koji se temelji na 7 nepovoljnih prognošičkih čimbenika: dob bolesnika  $>45$  godina života, muški spol, leukocitoza ( $L >15.0 \times 10^9/L$ ), limfopenija (limfocit  $<0.6 \times 10^9/L$  ili  $<8\%$  u DKS), anemija (hemoglobin  $<105$  g/L), koncentracija albumina  $<40$  g/L te proširenost bolesti (stadij IV). Svaki od navedenih parametara nosi 1 bod, bolesnici sa zbrojem 3 ili više imaju lošiju prognozu.<sup>57</sup>

TABLICA 6 Prognošički indeksi u HL

Stadij I i II	Stadij III i IV – Hasencleverov indeks
Zahvaćeno $\geq 3$ regije limfnih čvorova Velika tumorska masa u medijastinumu (promjera većeg od $1/3$ toraksa) SE $\geq 50$ bez B simptoma SE $\geq 30$ i B simptomi Ekстранodalna bolest	Dob $\geq 45$ godina Muški spol Leukociti $\geq 15.0 \times 10^9/L$ Limfociti $<0,6 \times 10^9/L$ ili $< 8\%$ u DKS Hemoglobin $<105$ g/l Albumin $<40$ g/l Stadij IV
Za nepovoljnu prognozu je dovoljan jedan kriterij.	Bolesnici s 3 ili više kriterija imaju lošu prognozu.

### 1.3.5 LDH

Laktat dehidrogenaza (LDH) je enzim prisutan u različitim količinama u citoplazmi svih stanica organizma. LDH je NAD<sup>+</sup> oksidoreduktaza i katalizira oksidaciju laktata u piruvat koristeći NAD<sup>+</sup> kao akceptor vodikovih iona. Reakcija je reverzibilna i kod fiziološkog pH favorizirana je redukcija piruvata u laktat. Sastoji se od 4 polipeptidna lanca koji pripadaju tipu H (heart) i M (muscle). Postoji 5 tipova izoenzima specifičnih za određeni organ:

- LDH1 – H4 | srce i eritrociti
- LDH2 – H3M1 | etikuloendotelni sustav
- LDH3 – H2M2 | pluća, slezena, limfni čvorovi
- LDH4 – H1M3 | bubreg, posteljica, gušterača

- LDH5 – M4 | jetra, poprečno prugasti mišić

H podjedinica prevladava u tkivima s povećanom potrošnjom kisika, a M u tkivima s visokom glikolitičkom aktivnošću.

Razaranjem tkiva se LDH otpušta u krvotok, stoga razina LDH može biti jedan od pokazatelja stanja u kojima dolazi do raspada stanica, od hemolize i upalnih procesa (pankreatitis, meningitis) do zloćudnih bolesti. Kod limfoma, kao i kod drugih brzo rastućih zloćudnih bolesti, pojačano je umiranje stanica nekrozom i apoptozom. Posebice kod agresivnih limfoma je LDH dobar pokazatelj aktivnosti malignog procesa.<sup>58</sup>

### 1.3.6 Beta-2 mikroglobulin

Beta-2 mikroglobulin je glikoprotein molekularne težine 11815 Daltona koji se nalazi na površini svih stanica s jezgrom. U ljudi ga kodira *B2M* gen, a dio je kompleksa tkivne snošljivosti I te igra važnu ulogu u staničnoj interakciji i staničnom prepoznavanju<sup>58</sup>. Prema nekim rezultatima, je u bolesnika s limfomom povišena razina beta-2 mikroglobulina povezana s lošijom prognozom.

### 1.3.7 Ki-67

Ki-67 je humani protein koji je usko povezan sa staničnom proliferacijom. Nalazi ga se u jezgri tijekom svih aktivnih faza staničnog ciklusa (G1, S, G2 i M), a nema ga u stanicama koje su u fazi mirovanja (G0). Tijekom mitoze, kad se jezgrina ovojnica raspadne, većinom se nalazi na površini kromosoma. Činjenica da je ovaj protein prisutan samo u aktivnim fazama staničnog ciklusa čini ga odličnim biljekom za određivanje stanične proliferacije. Imunohistokemijskim bojenjem određuje se postotak Ki-67 pozitivnih stanica u odnosu na ukupan broj tumorskih stanica. Taj postotak se zove indeks proliferacije. U nekim istraživanjima je razina izraženosti Ki-67 bila od prognostičke važnosti u bolesnika s limfomom.<sup>59</sup>

FL gradusa 1 i 2 u 18% posto slučajeva ima visok proliferacijski indeks. Takvi tumori se klinički ponašaju agresivnije i bolesnici žive kraće bez znakova bolesti od bolesnika s FL niskog gradusa i niskog proliferacijskog indeksa.<sup>60</sup> Kod limfoma plaštene zone izražaj Ki-67 veći od 40% je negativan prognostički pokazatelj. Proliferacijski indeks je veći u blastoidnom i pleomorfnom podtipu limfoma plaštene zone, morfološkim inačicama agresivnijeg kliničkog tijeka.<sup>61</sup> Kod DLBCL izražaj Ki-67 je često visok, obično iznad 40 posto, a ponekad i preko 90% što je ipak rijetko. U nekim istraživanjima su bolesnici s izražajem Ki-67 većim od 80% imali lošije ukupno preživljenje.<sup>59,62</sup> Također, izražaj KI-67 može pomoći u

razlikovanju DBLCL-a od intermedijarnog tipa limfoma kod kojeg su vrijednosti obično iznad 90%, odnosno Burkittovog limfoma kod kojeg su vrijednosti indeksa proliferacije obično oko 100%.

## **2. HIPOTEZA**

1. Određivanje razine i praćenje razine izvanstanične DNA ima dijagnostičko i prognostičko značenje u bolesnika sa limfomom.
2. Razina izvanstaničnice DNA viša je u agresivnih nego u indolentnih limfoma.

### 3. CILJEVI

**Ciljevi ovog rada su:**

1. **Istražiti vrijednost slobodne izvanstanične DNA u bolesnika s limfomom** kao biljega aktivnosti bolesti i odgovora na terapiju;
2. Utvrditi **korelira li koncentracija slobodne DNA** ili dinamika koncentracije slobodne DNA s prognozom;
3. Utvrditi je li koncentracija slobodne DNA povezana s nekim od **poznatih kliničkih ili bioloških prognostičkih čimbenika**;
4. Utvrditi postoji li povezanost koncentracije slobodne DNA s **patohistološkim obilježjima limfoma**;
5. Utvrditi **dinamiku koncentracije slobodne DNA tijekom bolesti**.

Osim doprinosa razumijevanju biologije limfoma, ovo istraživanje bi moglo imati i praktičnu vrijednost. Iako se time bavio velik broj istraživanja, još uvijek nije posve jasno zašto neki bolesnici dobro reagiraju na liječenje, a neki ne. Novi, jednostavan i pouzdan biljeg aktivnosti bolesti mogao bi imati utjecaj na bolje planiranje strategije liječenja ovih bolesnika.



## 4. BOLESNICI, MATERIJALI, METODE

### 4.1 BOLESNICI

#### 4.1.1 Etička načela

Ispitivanje je započeto nakon dobivanja odobrenja Etičkog povjerenstva KBC Zagreb. Svi bolesnici su prije uključivanja u ispitivanje potpisali informirani pristanak. Identitet bolesnika je zaštićen tijekom ispitivanja.

#### 4.1.2 Kriteriji uključivanja bolesnika

U ispitivanje su uključeni bolesnici kojima je postavljena dijagnoza limfoma u razdoblju od 2010. do 2013. godine, a liječeni su u KBC Zagreb.

- Kriteriji za uključivanje:
  - histološki potvrđena dijagnoza limfoma;
  - planirano liječenje kemo/imuno/radioterapijom;
  - potpisan informirani pristanak.
- Kriteriji za isključivanje:
  - morfološkim metodama vidljive cirkulirajuće tumorske stanice;
  - poznata HIV infekcija;
  - trudnoća;
  - liječenje glukokortikoidima prije uzimanja uzorka krvi za analizu;
  - stanja koja mogu podići razinu cirkulirajuće DNA: nedavna velika operacija, druga zloćudna bolest, trauma ili teška upala.

#### 4.1.3 Obrada bolesnika

Standardna obrada bolesnika se sastoji od anamneze, fizikalnog pregleda, koji uključuje mjerenje palpabilnih limfnih čvorova u dvije dimenzije (vrat, supraklavikularne regije, aksile, prepone i eventualno ostale palpaciji dostupne regije zahvaćene limfomom) te procjene općeg stanja bolesnika (performance status prema ECOG-u).<sup>63,64</sup> Laboratorijska obrada uključuje sedimentaciju, kompletnu krvnu sliku, rutinske biokemijske pretrage uključujući LDH te beta-2 mikroglobulin.

Dijagnoza limfoma je postavljena na temelju nalaza histološke i imunohistokemijske obrade biopsije tumora. U određenim slučajevima su korištene i citogenetske, odnosno molekulske

tehnike te imunofenotipizacija na protočnom citometru. Dijagnozu je postavljao hematopatolog. Osim standardne obrade potrebne za dijagnozu, uzorci tumorskog tkiva dodatno su imunohistokemijski obojeni na Ki-67.

Za procjenu proširenosti bolesti kod svih bolesnika je učinjen CT grudnog koša, trbuha i male zdjelice ili PET-CT te biopsija kosti. Na osnovu tih podataka bolesnicima je određen stadij bolesti prema Ann Arbor klasifikaciji i veličina tumorske mase.

#### 4.1.4 Liječenje bolesnika i procjena odgovora

Liječenje bolesnika i procjena odgovora na liječenje provedeni su u skladu s Hrvatskim konsenzusom o liječenju limfoma te prema uobičajenoj praksi liječnika u Zavodu za hematologiju KBC Zagreb<sup>63,64</sup>. Izbor terapije ovisio je o proširenosti bolesti, dobi bolesnika i stupnju rizika. Bolesnici s klasičnim HL liječeni su ABVDom ili eBEACOPPom. Oni s indolentnim limfomima liječeni su rituksimabom i klorambucilom, R-CVPom ili R-CHOPom. Bolesnici s B-LCL liječeni su R-CHOPom, R-CHOEPom, R-EPOCHom, R-CNOPom ili R-CEOPom. Kod bolesnika s limfomima sive zone primjenjivali smo R-eBEACOPP ili DA-R-EPOCH, a kod onih s BL našu inačicu terapije temeljene na visokim dozama metotreksata<sup>30</sup>. Bolesnici s T staničnim limfomima liječeni su istim kemoterapijskim protokolima kao oni s B-LCL, samo bez rituksimaba. Bolesnici s LBL liječeni su intenzivnim kemoterapijskim protokolima za akutne limfoblastične leukemije. Jedan bolesnik s HL tipa nodalne limfocitne predominacije liječen je rituksimabom i zračenjem, jedan s ektranodalnim FL je samo operiran. Po završetku sustavnog liječenja su zračeni bolesnici sa stadijem I i II HL, stadijem I agresivnih limfoma kao i oni s inicijalnom velikom tumorskom masom.

Procjena odgovora na liječenje provedena je nakon 3-4 ciklusa (tzv. interim procjena odgovora) te na kraju planirane terapije CTom ili PET-CTom i kliničkim pregledom. Biopsija kosti je ponovljena na kraju liječenja u onih bolesnika koji su na početku liječenja imali koštanu srž infiltriranu limfomom. Odgovor na liječenje je procjenjivan na temelju standardnih kriterija i klasificiran kao kompletna remisija, parcijalna remisija, stabilna bolest i progresivna bolest.<sup>65,66</sup>

## 4.2 MATERIJALI I METODE

### 4.2.1 Uzorkovanje

Uzorci za određivanje slobodne DNA uzimani su pri dijagnozi, odnosno prije započinjanja protutumorskog liječenja te pri evaluaciji nakon provedenog liječenja.

Krv za određivanje koncentracije cfDNA uzimala se u eprvetu s EDTA, vađeno je oko 3 ml krvi. Uzorci su uzimani prilikom rutinske obrade bolesnika, krv su vadile medicinske sestre Zavoda za hematologiju. Uzorak krvi se je nakon toga centrifugirao 15 minuta na 3000 g. Nakon centrifugiranja pipetom je uzeta plazma koja je nakon toga zamrznuta na -20 C do određivanja količine izvanstanične DNA.

### 4.2.2 Izolacija DNA

DNA je izolirana na Zavodu za biokemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pomoću gotovog kita za izolaciju DNA prema uputi proizvođača. Korišten je DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen GmbH, Njemačka).

### 4.2.3 Određivanje koncentracije DNA

Koncentracija DNA je određivana uporabom PCR-a u stvarnom vremenu.<sup>67</sup> Korišten je komercijalno dostupan Quantifiler™ Human Kit (Applied Biosystems, SAD). Uvjeti reakcije bili su: početna denaturacija 10 minuta na 95°C te potom 40 ciklusa: 15 sekundi denaturacije na 95°C i 1 minuta hibridizacije i amplifikacije na 60°C. Kodirajuća regija korištena za kvantifikaciju je bila dio gena koji kodira hTERT (ljudski gen telomerazne reverzne transkriptaze).

### 4.2.4 Patohistološke metode

Sva imunohistekemijska bojenja učinjena su na Zavodu za patologiju KBC-a Zagreb iz dijagnostičkog patohistološkog materijala. Dijagnoza limfoma svih bolesnika je postavljena od strane iskusnih hematopatologa u KBC Zagreb. Osim rutinskog bojanja specifičnog za svaki pojedini tip limfoma svi uzorci su dodatno obojeni imunohistokemijski na Ki-67.

#### 4.2.5 Statističke metode

Promatrani ishodi su odgovor na liječenje (kompletna i parcijalna remisija), preživljenje bez događaja (EFS) i ukupno preživljavanje (OS)<sup>65,66</sup>. EFS se računa od prvog dana primjene prvog ciklusa terapije do neuspjeha liječenja (nezadovoljavajući odgovor na liječenje, progresija ili relaps bolesti, smrt od bilo kojeg uzroka) ili do zadnje kontrole. OS se računa od prvog dana primjene prvog ciklusa terapije do smrti ili zadnje kontrole.

Od opisnih varijabli (deskriptora) korišten je medijan i raspon. Za usporedbu koncentracije cfDNA između različitih skupina koristili smo Mann-Whitneyev ili Kruskal-Wallisov test. Trajanje najboljeg odgovora i preživljenje bolesnika prikazano je Kaplan-Meierovom metodom. Za usporedbu preživljenja između pojedinih skupina i podskupina upotrebljavao se log-rank test. Za procjenu korelacije između različitih parametara koristili smo Spearmanov test korelacije. Statistički značajnom smatrana je vrijednost  $p < 0,05$  kod koje je odbacivana nul-hipoteza. Statistička analiza je učinjena upotrebom licenciranog statističkog programa SPSS (IBM, 2011, SAD).

## 5. REZULTATI

### 5.1 SVI BOLESNICI

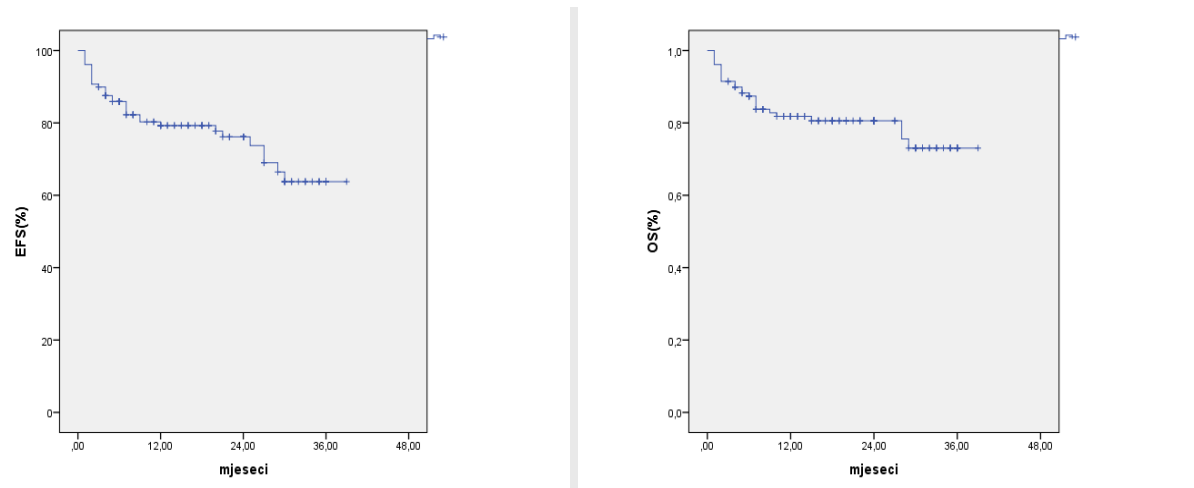
U ispitivanje je uključeno 129 bolesnika. Bilo je podjednako muškaraca i žena. Prosječna dob ispitanika je bila 56 godina. Najveći broj ih je imao B-LCL, potom HL i FL što odgovara očekivanoj incidenciji pojedinih vrsta limfoma. U tablici 7 su prikazane značajke bolesnika.

TABLICA 7 Značajke bolesnika uključenih u istraživanje

Značajka	Broj bolesnika (%) (n=129)
Dob (medijan,raspon) [godine]	56 (17-87)
Spol (m/ž)	66 (51.2) / 63 (48.8)
<b>Tip limfoma</b>	
HL	29 (22.5)
<b>B-NHL</b>	<b>93 (72.1)</b>
<b>Agresivni B- NHL</b>	<b>66 (51.2)</b>
B-LCL	47 (36.4)
MCL	8 (6.2)
BL	4 (3.1)
Intermedijarni između BL i B-LCL	3 (2.3)
Intermedijarni između HL i B-LCL	4 (3.1)
<b>Indolentni B-NHL</b>	<b>27 (20.9)</b>
FL	16 (12.4)
EMZL	5 (3.9)
NMZL	3 (2.3)
SLL	2 (1.6)
LPL	1 (0.8)
<b>T-NHL</b>	<b>7 (5.4)</b>
PTCL	4 (3.1)
ALCL	2 (1.6)
LBL	1 (0.8)

Medijan praćenja bolesnika bio je 15 mjeseci. Dvogodišnje OS je bio 81+-4%, a EFS 76+-4% (sl. 1).

SLIKA 1 OS i EFS svih ispitanika



Medijan razine cfDNA u bolesnika uključenih u ispitivanje je iznosila 20.57 ng/ml s rasponom od 0.45 do 2009.45 ng/ml. Koncentracija cfDNA u različitim tipovima limfoma prikazan je u tablici 8. Razlika u koncentraciji cfDNA između B-NHL, T-NHL i HL nije bila statistički značajna.

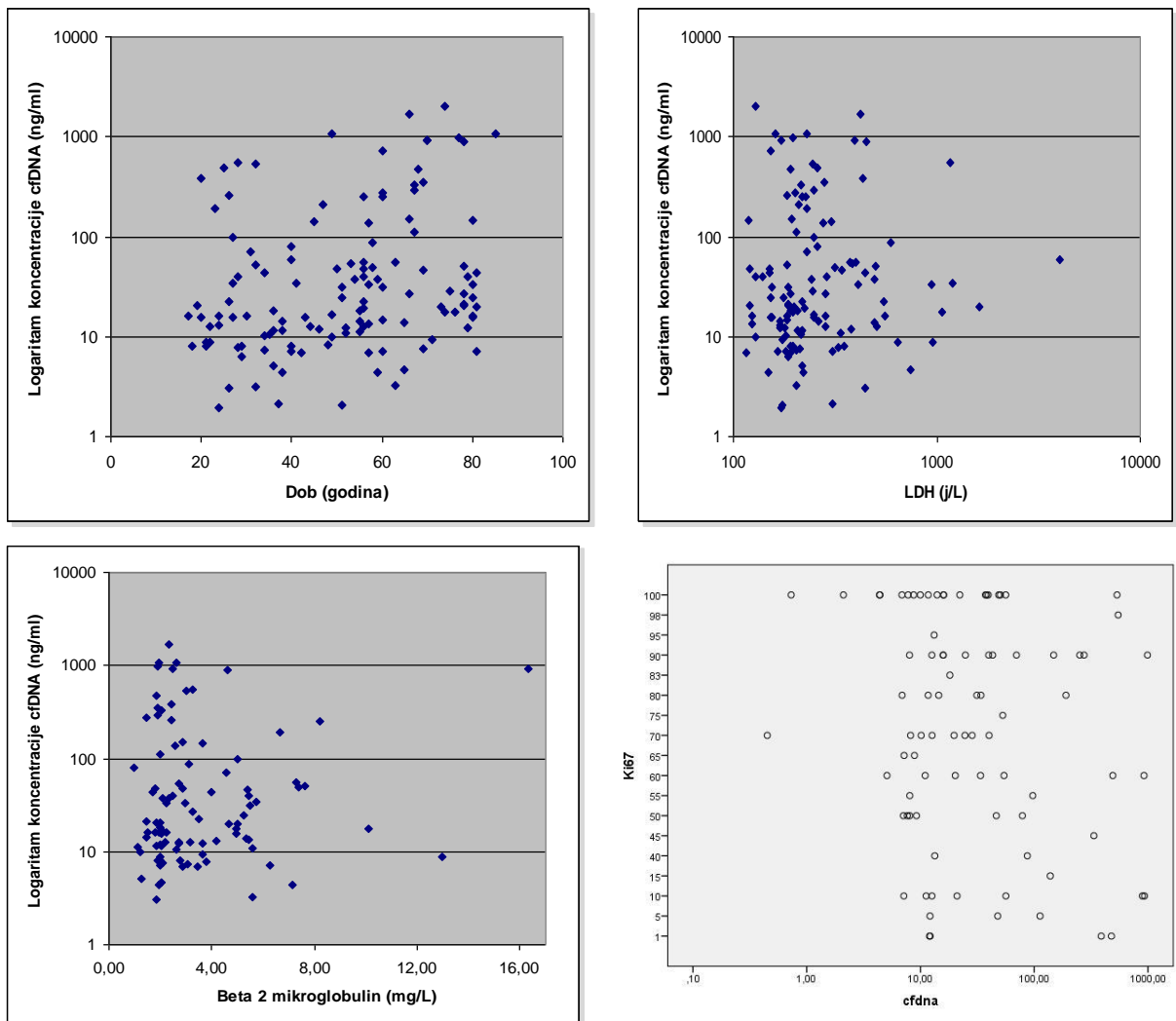
TABLICA 8 Razina cfDNA svih ispitanika

Tip limfoma	Razina cfDNA (ng/ml) medijan (raspon); broj bolesnika s koncentracijom iznad normale (%)
<b>Sveukupno</b>	<b>20.57 (0.45-2009.45); 49 (38.0)</b>
HL	12.65 (1.95-546.34); 8 (28)
<b>B-NHL</b>	<b>23.43 (0.45-2009.45); 36 (39)</b>
<b>Agresivni B- NHL</b>	<b>26.66 (0.45-1676.44); 27 (41)</b>
B-LCL	24.80 (0.45-1676.44); 18 (38)
MCL	36.62 (7.66-476.60); 4 (50)
BL	15.96 (8.70-534.44); 1 (25)
Intermedijarni između BL i B-LCL	955.42 (921.71.-1079); 3 (100)
Intermedijarni između HL i B-LCL	9.96(7.78-147.46); 1 (25)
<b>Indolentni B-NHL</b>	<b>17.92 (2.09-2009.45); 9 (36)</b>
FL	16.84 (2.09-251.63); 5 (31)
EMZL	20.95 (11.99-2009.45); 2 (40)
NMZL	15.48 (12.17-931.5); 2 (67)
SLL	12.50 (7.14-17,87); 0
LPL	15.48; 0
<b>T-NHL</b>	<b>38.04 (12.12-892.36); 5 (71)</b>
PTCL	62.08 (12.12-892.36); 3 (75)

Tip limfoma	Razina cfDNA (ng/ml) medijan (raspon); broj bolesnika s koncentracijom iznad normale (%)
ALCL	89.42 (38.04-140.81); 2 (100)
LBL	15.81; 0

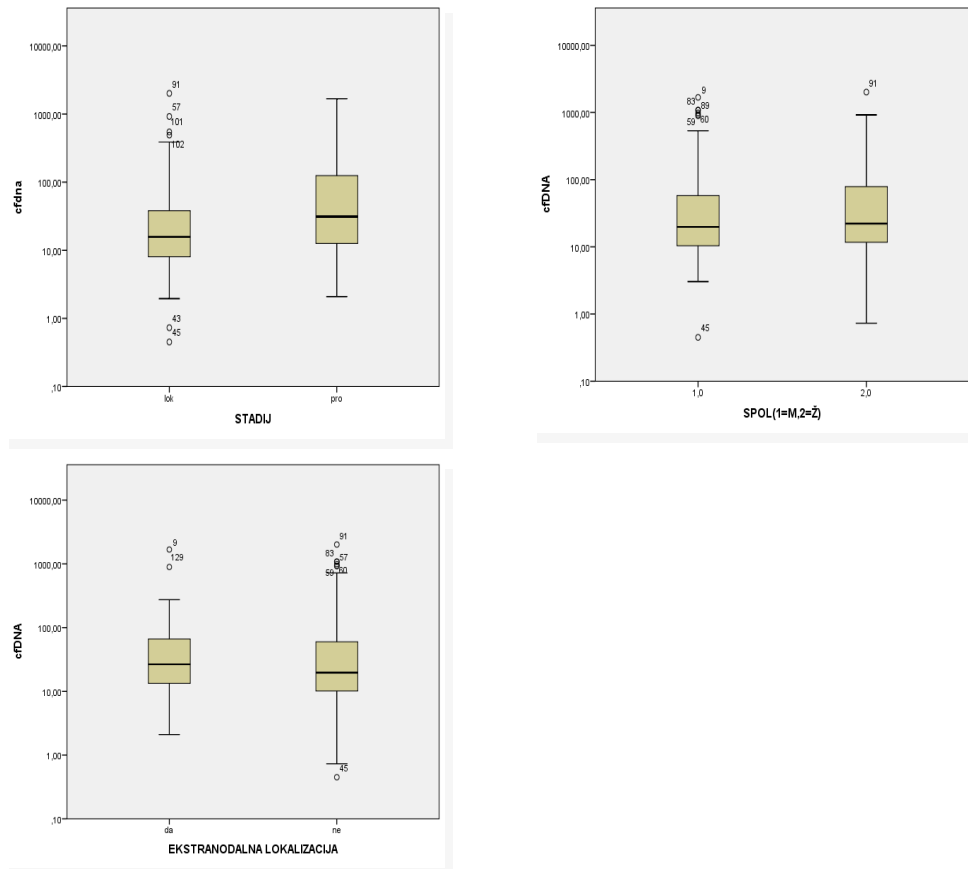
Koncentracija cfDNA je korelirala s dobi bolesnika ( $p=0.01$ ), LDH ( $p=0.002$ ) i koncentracijom beta 2 mikroglobulina ( $p=0.007$ ), a nije korelirala s Ki-67 ( $p=0.185$ ) (sl. 2).

SLIKA 2 Koncentracija cfDNA u usporedbi s dobi, LDH, beta-2 mikroglobulinom i Ki-67 u svih bolesnika



Koncentracija cfDNA je bila viša u bolesnika s proširenom bolesti (stadij III i IV), nego u onih s lokaliziranom bolesti (stadij I i II) ( $p=0.019$ ). Nije bilo razlike u koncentraciji cfDNA prema spolu niti postojanju ekстранodalne lokalizacije bolesti (sl. 3).

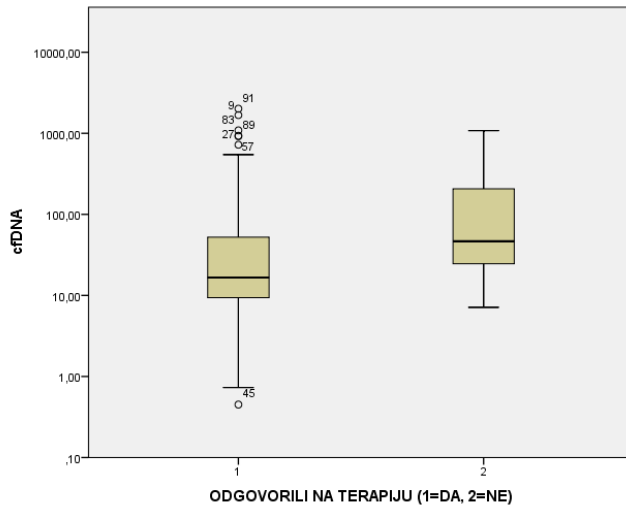
SLIKA 3. Koncentracija cfDNA prema proširenosti bolesti, spolu i ekстранodalnoj lokalizaciji u svih bolesnika



Nije bilo razlike u odgovoru na liječenje, OS i EFS između bolesnika s koncentracijom cfDNA unutar i iznad vrijednosti izmjerenih u zdravih osoba (dvogodišnji OS  $82 \pm 5\%$  naprema  $77 \pm 6\%$ ,  $p=0.406$ ; dvogodišnji EFS  $79 \pm 5\%$  naprema  $71 \pm 7\%$ ,  $p=0.265$ ). Bolesnici koji su odgovorili na terapiju su imali nižu koncentraciju cfDNA od onih koji nisu odgovorili na liječenje ( $p=0.005$ ) (sl 4).

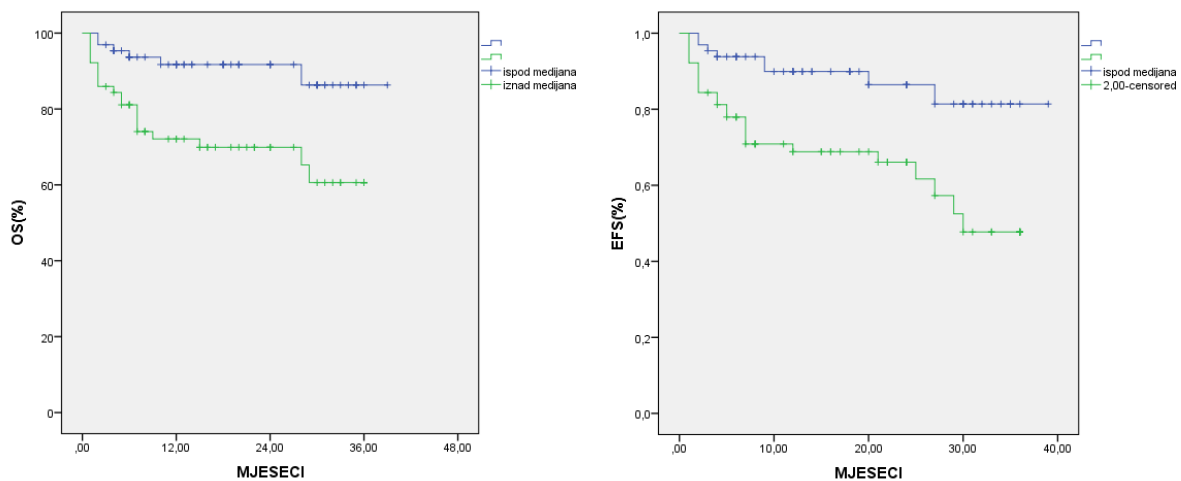


SLIKA 4 Koncentracija cfDNA prema odgovoru na terapiju u svih bolesnika



Odgovor na liječenje ( $p=0.002$ ), OS i EFS bolesnika s koncentracijom cfDNA ispod medijana bili su značajno bolji, nego u skupini bolesnika s koncentracijom cfDNA iznad medijana (dvogodišnji OS  $92\pm 4\%$  naprema  $70\pm 6\%$ ,  $p=0.002$ ; dvogodišnji EFS  $86\pm 5\%$  naprema  $66\pm 6\%$ ,  $p=0.001$ ) (sl. 5).

SLIKA 5. OS i EFS svih bolesnika u odnosu na koncentraciju cfDNA

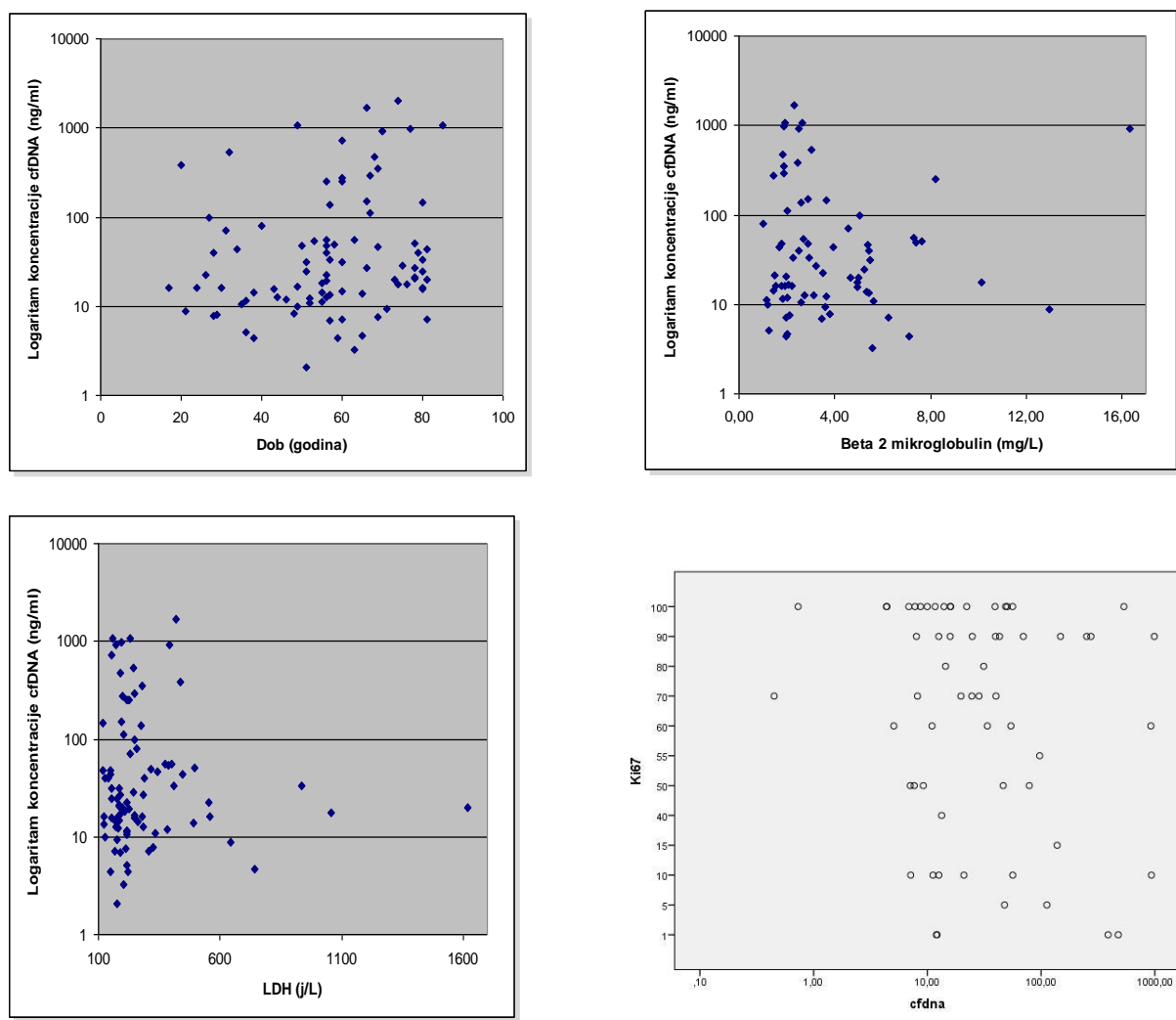


U multivarijantnoj Coxovoj regresijskoj analizi u koju su kao mogući prognostički čimbenici uvršteni tip limfoma, dob bolesnika, LDH, beta 2 mikroglobulin i koncentracija cfDNA za OS su ispali statistički značajni prognostički čimbenici dob ( $p=0.005$ ) i LDH ( $p=0.036$ ), a za EFS dob ( $p=0.014$ ) i beta 2 mikroglobulin ( $p=0.024$ ), dok je LDH bio graničan ( $p=0.092$ ).

## 5.2B-NON HODGKINOVIM LIMFOMI

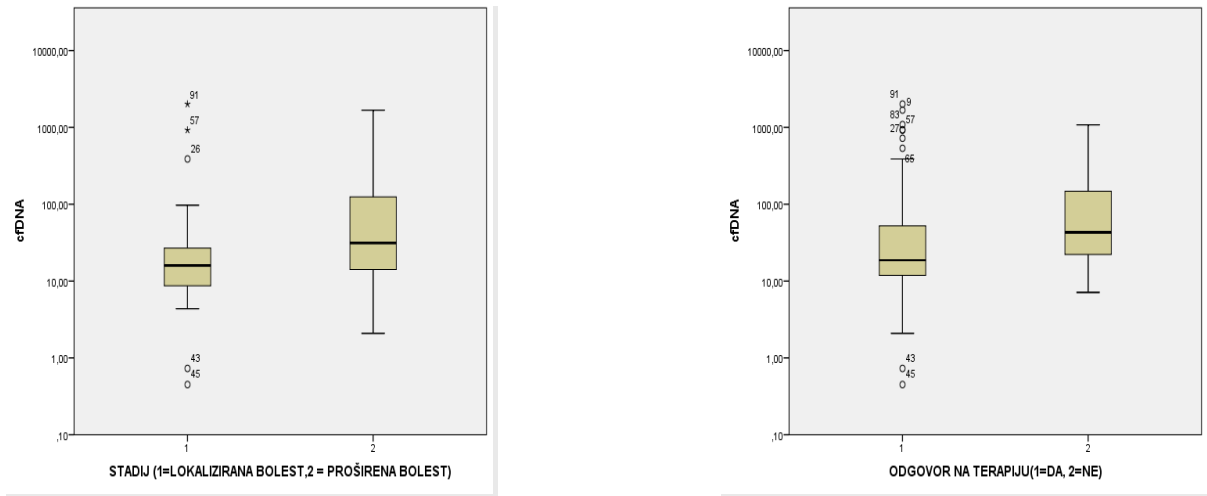
Koncentracija cfDNA je korelirala s dobi bolesnika ( $p=0.048$ ) i koncentracijom beta 2 mikroglobulina ( $p=0.02$ ), a ne s LDH ( $p=0.12$ ) niti Ki-67 ( $p=0.177$ ) (sl. 6).

SLIKA 6 Koncentracija cfDNA u usporedbi s dobi, koncentracijom beta-2 mikroglobulina, LDH i Ki-67 u bolesnika s B-NHL



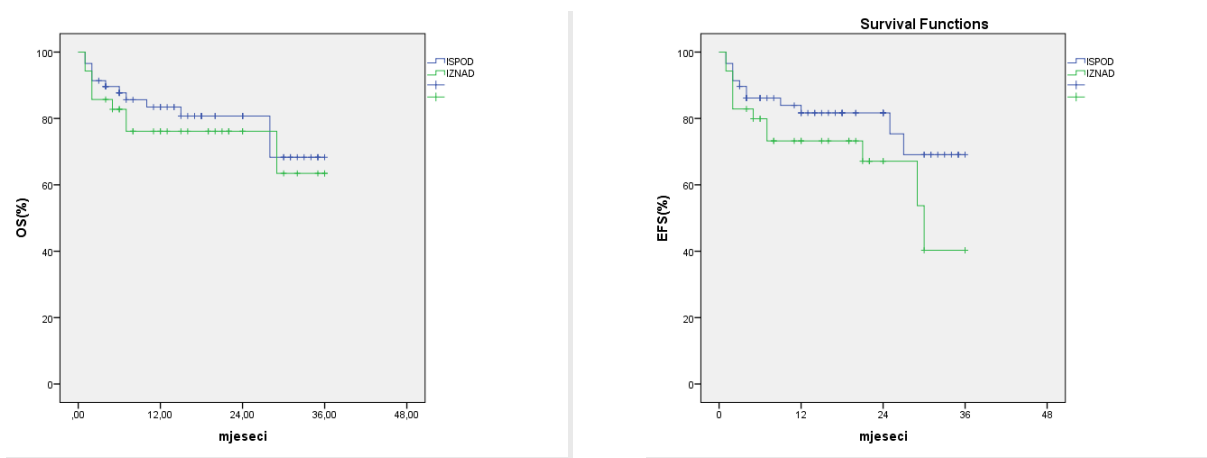
Nije bilo razlike u koncentraciji cfDNA prema spolu niti između agresivnih i indolentnih B-NHL. Bolesnici u stadiju I i II su imali značajno nižu koncentraciju cfDNA, nego oni u stadiju III i IV ( $p=0.019$ ). Bolesnici koji su odgovorili na terapiju su imali granično nižu koncentraciju cfDNA od onih koji nisu odgovorili na liječenje ( $p=0.064$ ) (sl 7).

SLIKA 7 Koncentracija cfDNA u odnosu na stadij bolesti i odgovor na liječenje u bolesnika s B-NHL



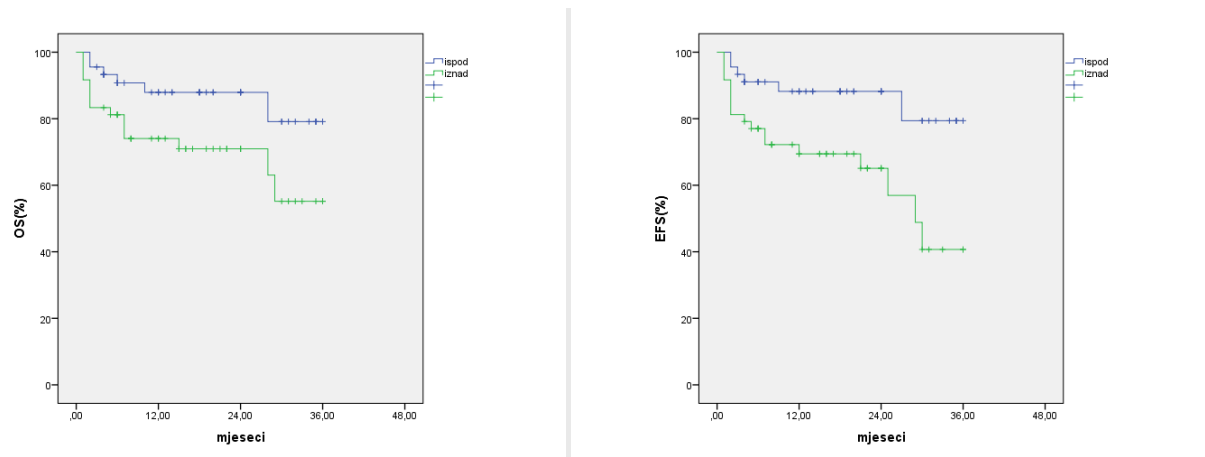
Nije bilo razlike u odgovoru na liječenje, OS i EFS između bolesnika s koncentracijom cfDNA unutar i iznad vrijednosti izmjerenih u zdravih osoba (dvogodišnji OS 82+-6% naprema 76+-7%, p=0.534; dvogodišnji EFS 82+-5% naprema 67+-9%, p=0.129) (sl. 8)

SLIKA 8 OS i EFS bolesnika s B-NHL s normalnom i povišenom koncentracijom cfDNA



Odgovor na liječenje (p=0.023), OS i EFS bolesnika s koncentracijom cfDNA ispod medijana bili su značajno bolji, nego u skupini bolesnika s koncentracijom cfDNA iznad medijana (dvogodišnji OS 88+-5% naprema 74+-7%, p=0.043; dvogodišnji EFS 88+-5% naprema 69+-7%, p=0.008) (sl. 9).

SLIKA 9 OS i EFS bolesnika s B-NHL prema koncentraciji cfDNA

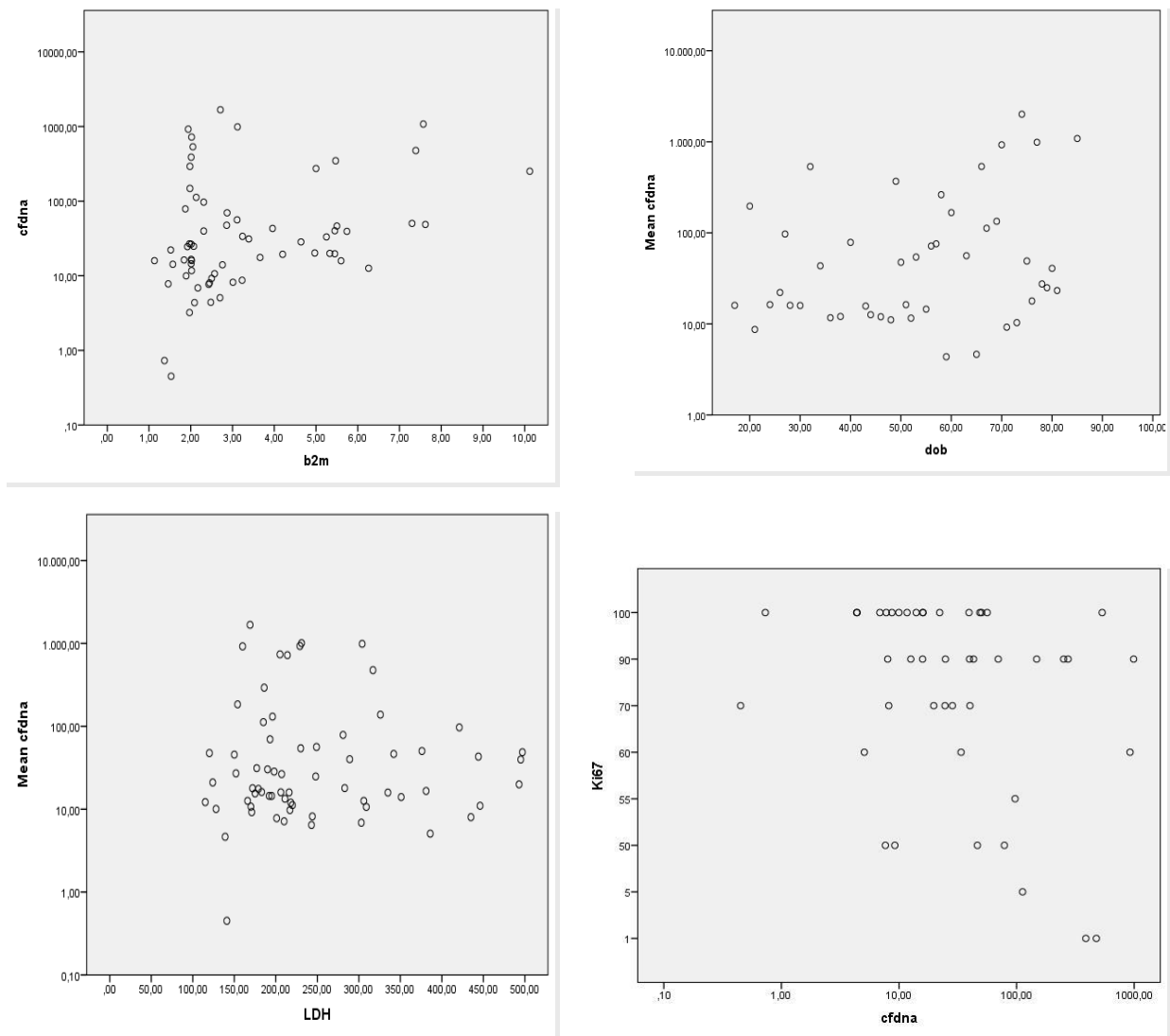


U multivarijantnoj Coxovoj regresijskoj analizi u koju su kao mogući prognostički čimbenici uvršteni tip limfoma, dob bolesnika, LDH, beta 2 mikroglobulin i koncentracija cfDNA za OS su ispali statistički značajni prognostički čimbenici dob ( $p=0.006$ ) i LDH ( $p=0.035$ ), dok je utjecaj beta 2 mikroglobulina graničan ( $p=0.088$ ), a za EFS dob ( $p=0.027$ ) i beta 2 mikroglobulin ( $p=0.014$ ), ali ne i LDH ( $p=0.103$ ).

### 5.2.1 Agresivni B-non Hodgkinovi limfomi

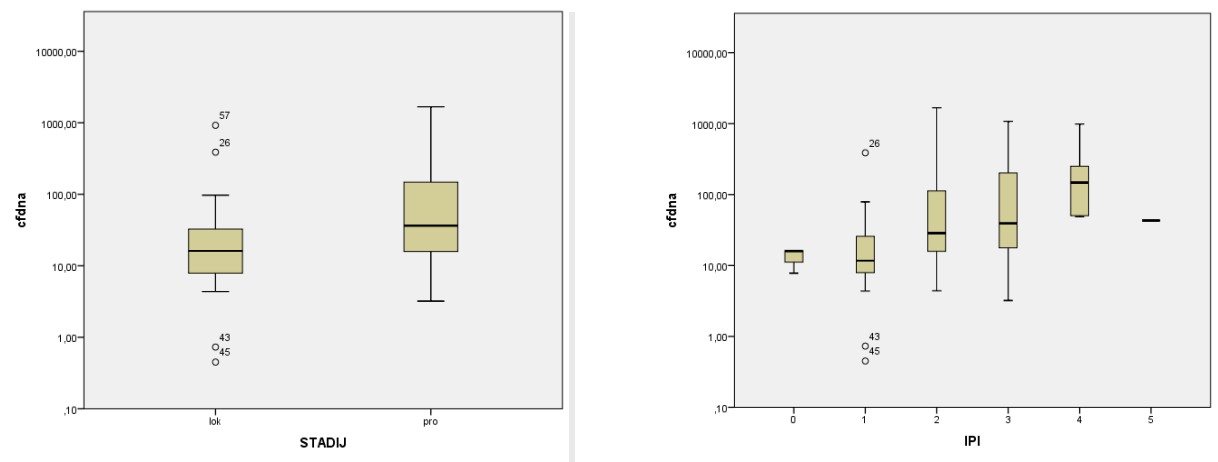
Koncentracija cfDNA korelira s beta 2 mikroglobulinom ( $p=0.01$ ) i Ki-67 ( $p=0,046$ ), ali ne s dobi ( $p=0.14$ ) niti LDH ( $p=0.19$ ) (sl.10).

SLIKA 10 Korelacija cfDNA s koncentracijom beta-2 mikroglobulina, dobi, LDH i Ki-67 u bolesnika s agresivnim B-NHL



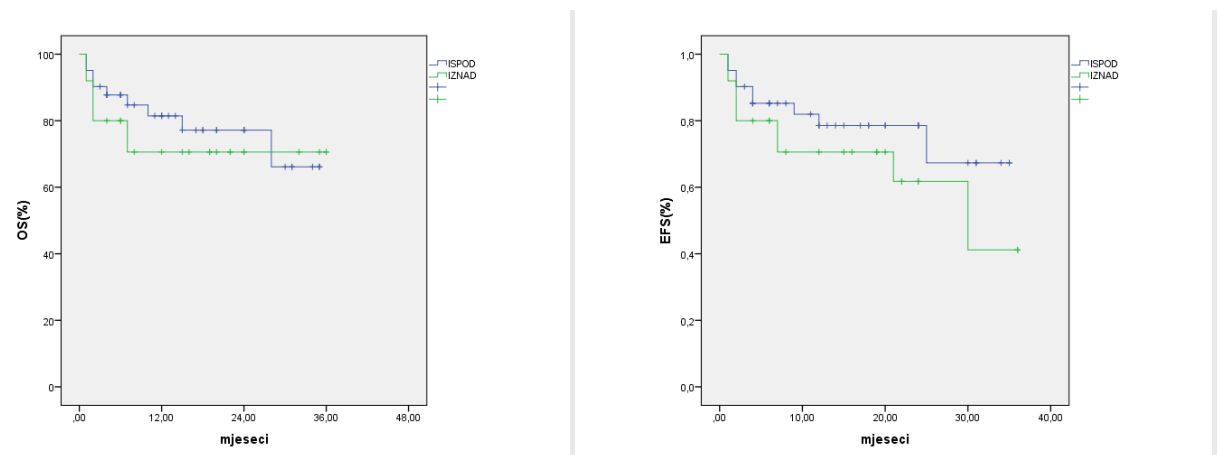
Nije bilo razlike u koncentraciji cfDNA prema spolu. Bolesnici s proširenom bolesti i višim IPI su imali višu koncentraciju cfDNA ( $p=0.008$  i  $p=0.005$ ) (sl.11). Razlika u koncentraciji cfDNA između različitih tipova agresivnih B-NHL je bila granično statistički značajna ( $p=0.05$ ). Sva tri bolesnika s intermedijarnim tipom agresivnog B-NHL između BL i B-LCL su imali visoke koncentracije cfDNA. Bolesnici koji su odgovorili na liječenje su imali statistički značajno nižu koncentraciju cfDNA od onih koji nisu odgovorili ( $p=0.019$ ).

SLIKA 11. Koncentracija cfDNA u bolesnika s agresivnim B-NHL prema stadiju i IPI



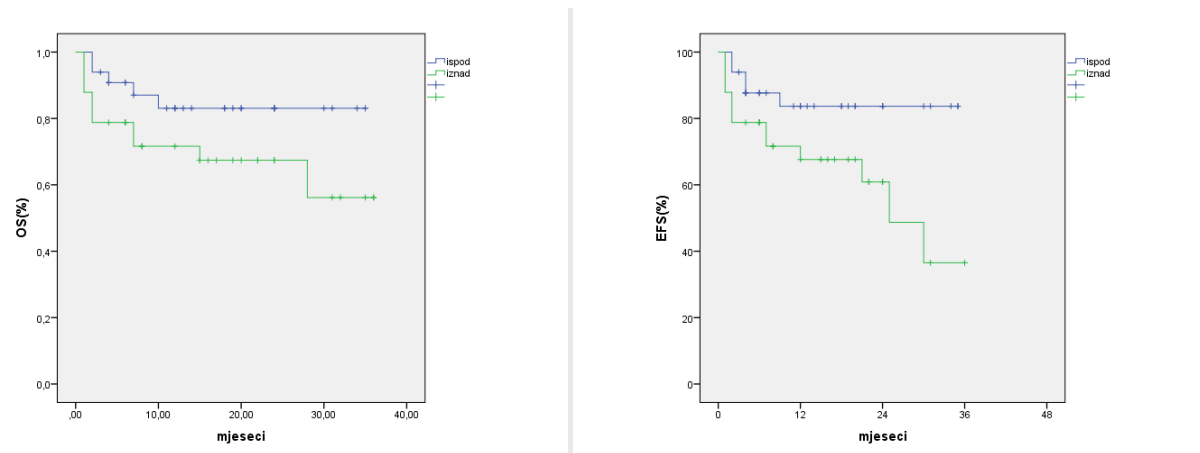
Nije bilo razlike u odgovoru na liječenje, OS i EFS između bolesnika s koncentracijama cfDNA unutar i iznad vrijednosti izmjerenih u zdravih osoba (dvogodišnji OS: 78+-7% naprema 70+-9%,  $p=0.58$ ; dvogodišnji EFS: 78+-7% naprema 62+-12%,  $p=0.23$ ). (sl.12)

SLIKA 12 OS i EFS bolesnika s agresivnim B-NHL s normalnom i povišenom koncentracijom cfDNA



Bolesnici s koncentracijom cfDNA ispod medijana su imali granično bolji OS i značajno bolji odgovor na liječenje ( $p=0.008$ ) i EFS od onih s koncentracijom cfDNA iznad medijana (dvogodišnji OS: 83+-7% naprema 67+-9%,  $p=0.098$ ; dvogodišnji EFS: 83+-7% naprema 60+-10%,  $p=0.035$ ). (sl.13)

SLIKA 13 OS i EFS bolesnika s agresivnim B-NHL u odnosu na koncentraciju cfDNA



U multivarijantnoj Coxovoj regresijskoj analizi u koju su kao mogući prognostički čimbenici uvršteni tip limfoma, dob bolesnika, LDH, beta 2 mikroglobulin, IPI i koncentracija cfDNA za OS su ispali statistički značajni prognostički čimbenici utjecaj IPI ( $p=0.011$ ) i dob ( $p=0.04$ ), a za EFS IPI ( $p=0.01$ ), dok je utjecaj dobi graničan ( $p=0.08$ ).

#### 5.2.1.1 B-velikostanični limfom

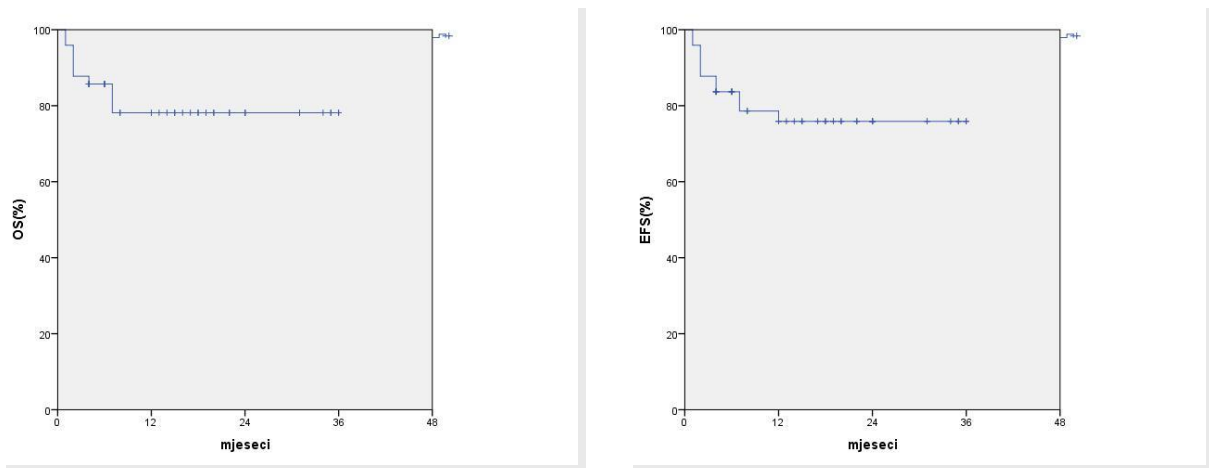
U tablici 9 su prikazane značajke bolesnika.

TABLICA 9 Značajke bolesnika s B-LCL

ZNAČAJKA	BROJ BOLESNIKA (n=49)
<b>Demografske značajke</b>	
Dob (medijan, raspon) [godine]	60 (20-81)
Spol (m/ž)	26 / 23
<b>Značajke bolesti</b>	
Stadij I,II	18
III, IV	31
IPI 0-2	31
3-5	18
<b>Odgovor na liječenje</b>	
KR, nKR	39
NR, NA	10
relaps	2

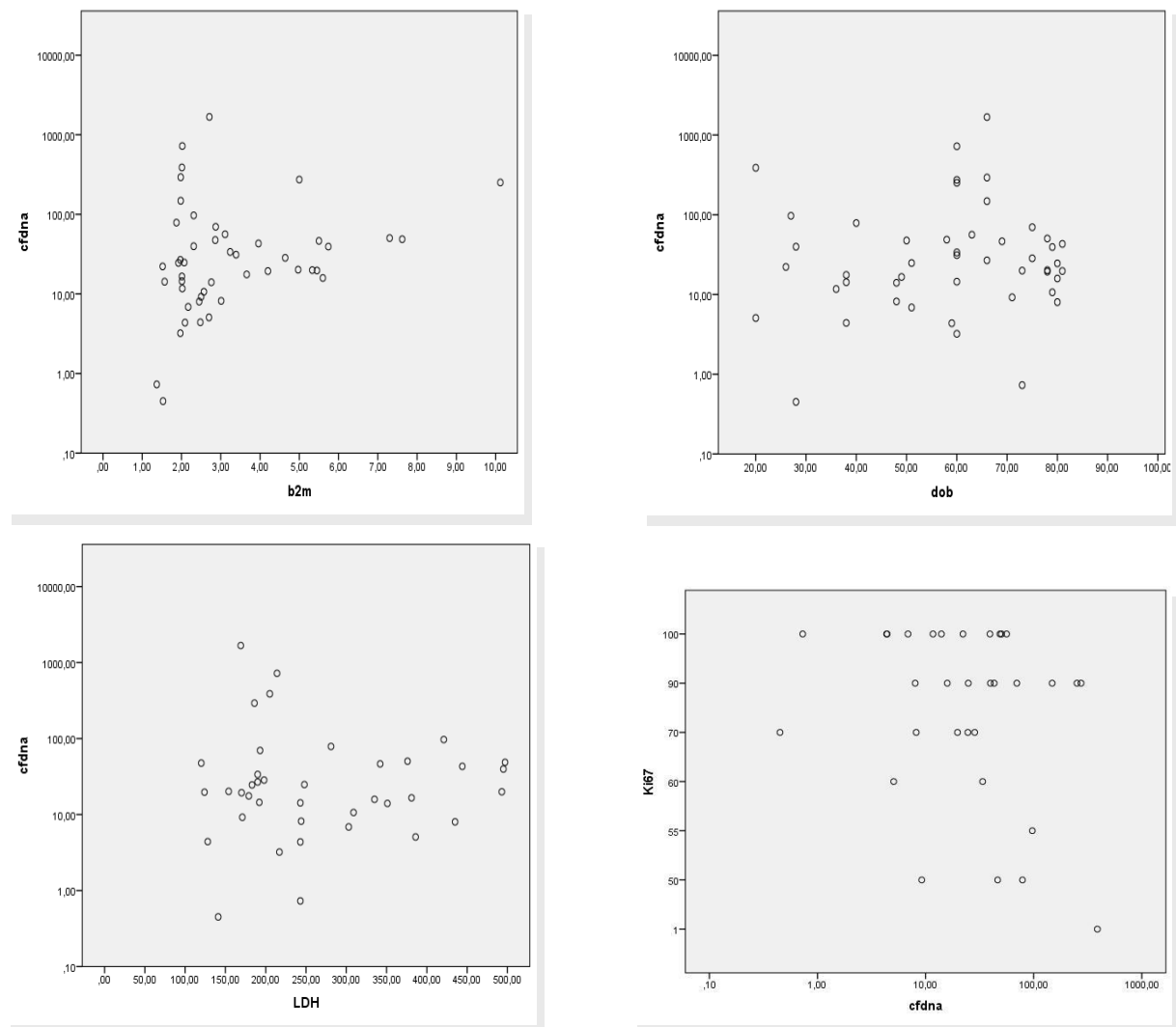
Dvogodišnje OS je bilo 79.6%, a EFS 77.6% (sl. 14).

SLIKA 14 OS i EFS bolesnika s B-LCL



Koncentracija cfDNA nije korelirala s beta 2 mikroglobulinom ( $p=0.092$ ) ni s dobi ( $p=0.58$ ) ni s LDH ( $p=0.17$ ) niti s Ki-67 ( $p=0,206$ ) (sl.15 ).

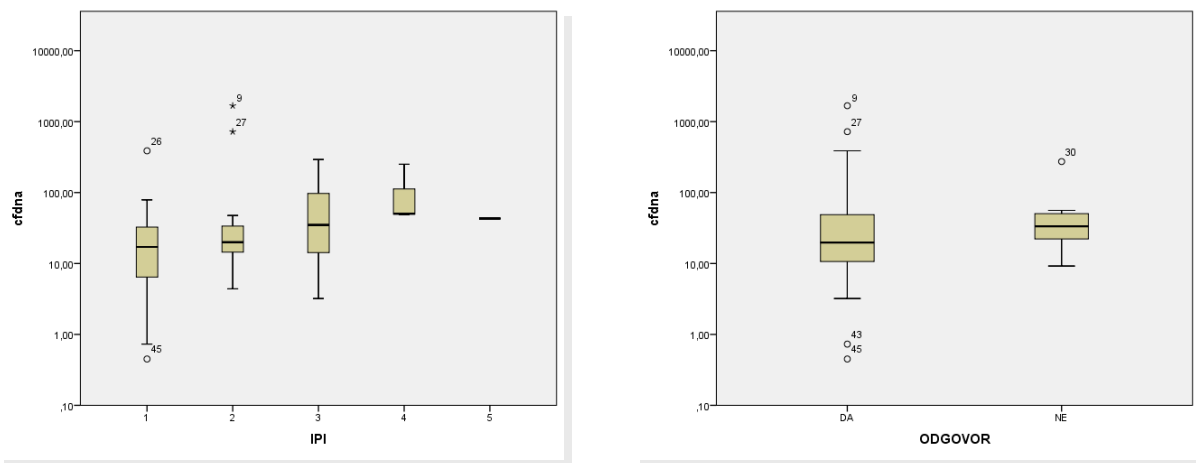
SLIKA 15 Korelacija koncentracije cfDNA s koncentracijom beta-2 mikroglobulina, dobi, LDH i Ki-67 u bolesnika s B-LCL





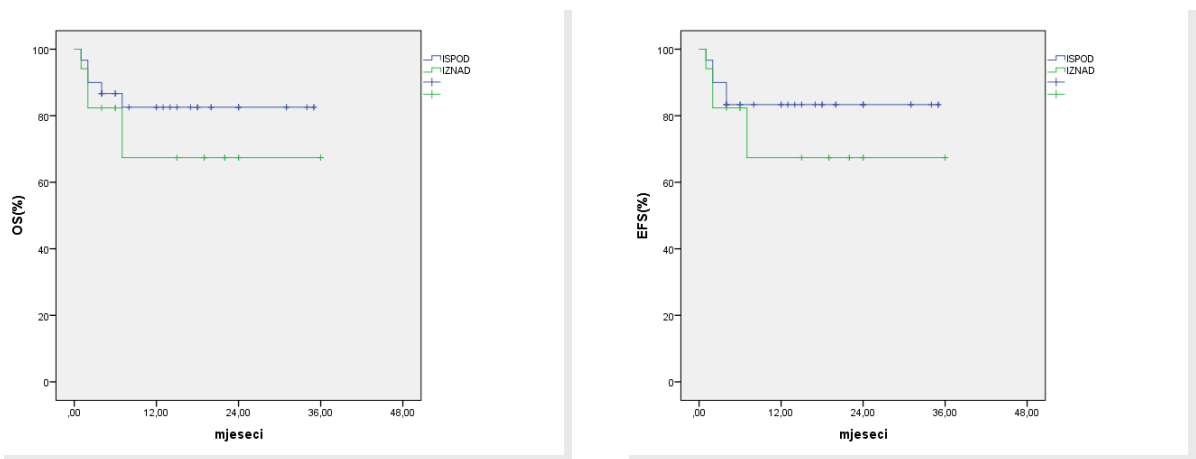
Nije bilo razlike u koncentraciji cfDNA prema spolu. Bolesnici s višim IPI su imali značajno više ( $p=0.029$ ), a oni s proširenom bolesti granično više koncentracije cfDNA ( $p=0.06$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji cfDNA između bolesnika koji jesu ili nisu odgovorili na liječenje (sl.16).

SLIKA 16 Koncentracija cfDNA u odnosu na IPI i odgovor na liječenje u bolesnika s B-LCL



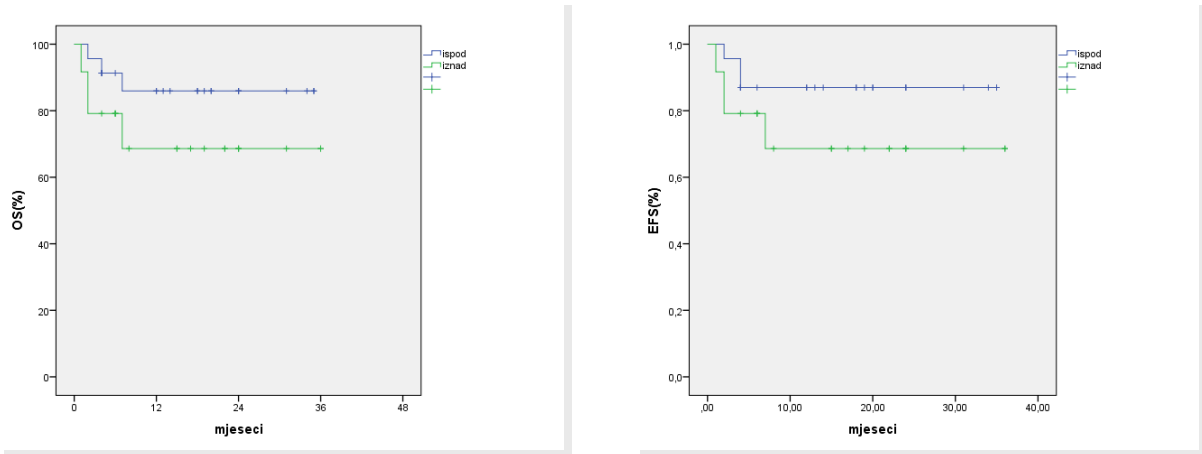
Nije bilo statistički značajne razlike u odgovoru na liječenje, OS i EFS između bolesnika s normalnim i povišenim koncentracijama cfDNA (dvogodišnji OS: 83+-7% naprema 67+-12%,  $p=0.31$ ; dvogodišnji EFS: 83+-7% naprema 67+-12%,  $p=0.32$ ) (sl.17).

SLIKA 17 OS i EFS bolesnika s B-LCL s normalnom i povišenom koncentracijom cfDNA



Isto tako, nije bilo statistički značajne razlike u odgovoru na liječenje, OS i EFS između bolesnika s koncentracijama cfDNA ispod i iznad medijana (dvogodišnji OS: 86+-8% naprema 69+-10%,  $p=0.16$ ; dvogodišnji EFS: 86+-7% naprema 69+-10%,  $p=0.16$ ) (sl 18).

SLIKA 18 OS i EFS bolesnika s B-LCL prema koncentraciji cfDNA

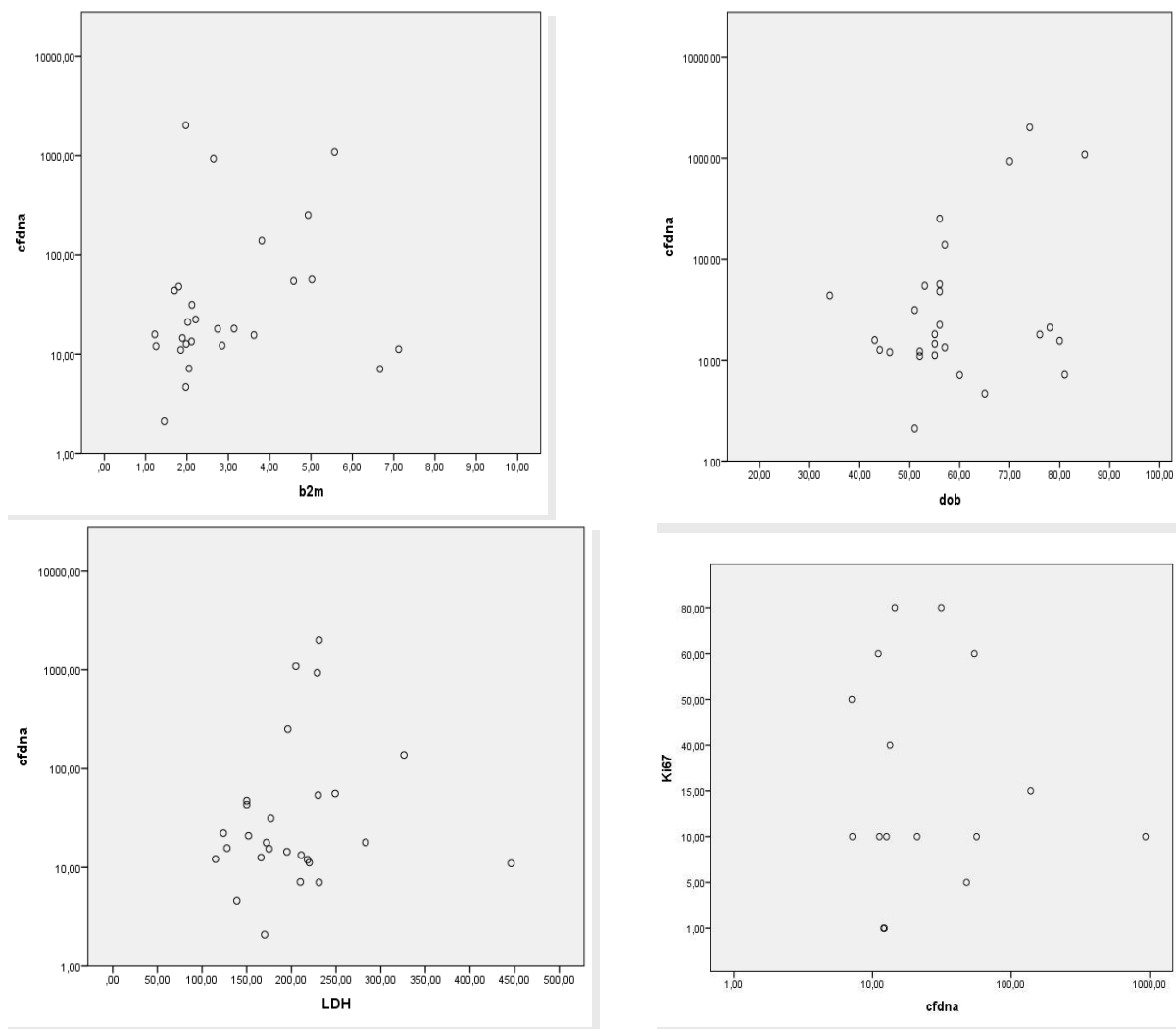


U multivarijantnoj Coxovoj regresijskoj analizi u koju su kao mogući prognostički čimbenici uvršteni dob bolesnika, LDH, beta 2 mikroglobulin, IPI i koncentracija cfDNA za OS i EFS je jedini statistički značajan prognostički čimbenik bio IPI ( $p=0.039$  za OS i  $p=0.035$  za EFS).

### 5.2.2 Indolentni B-non Hodgkinovi limfomi

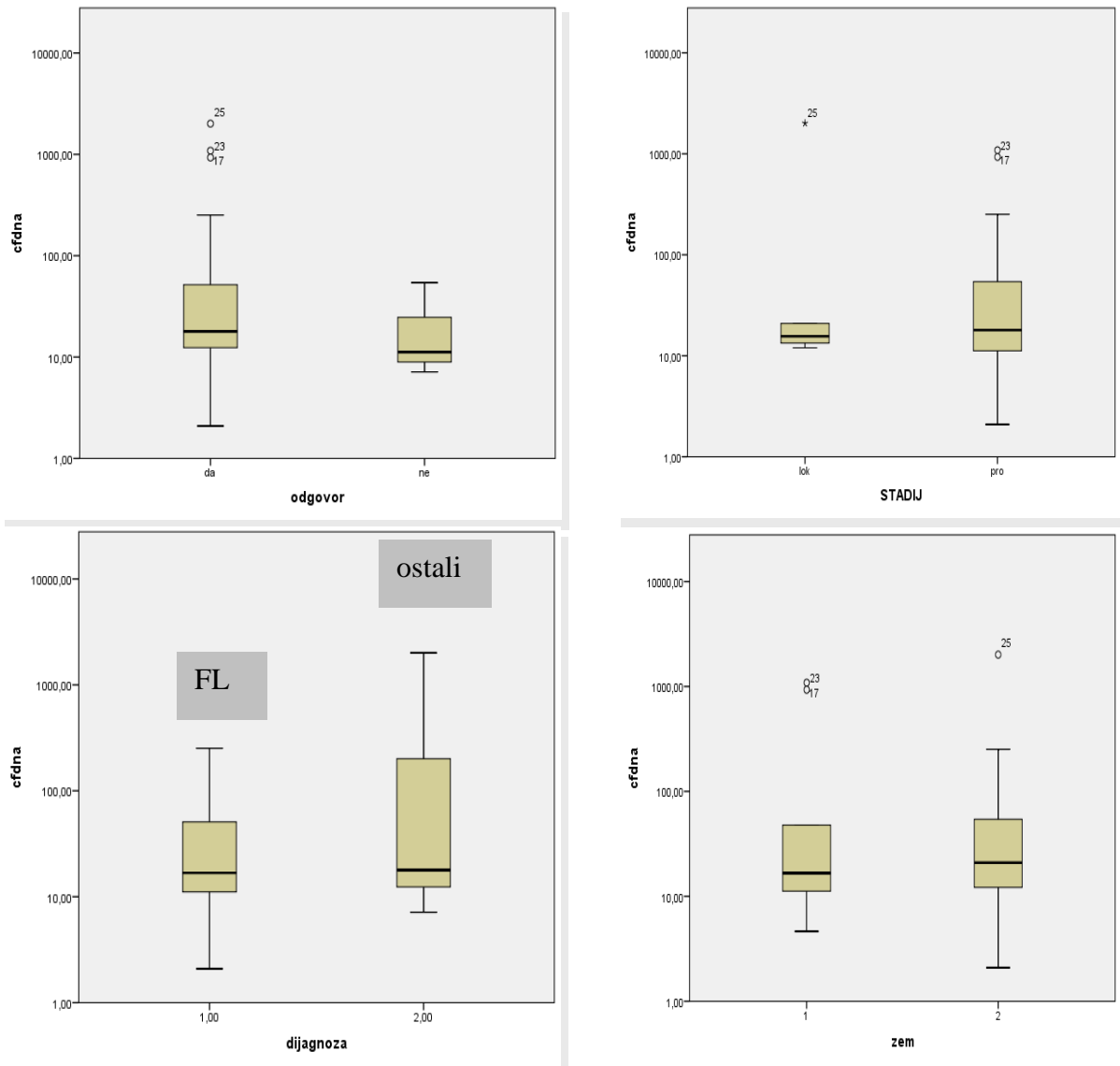
Koncentracija cfDNA nije korelirala s beta 2 mikroglobulinom ( $p=0.17$ ) ni s dobi ( $p=0.26$ ) ni s LDH ( $p=0.38$ ) niti s Ki-67 ( $p=0.85$ ) (sl. 19).

SLIKA 19 Korelacija koncentracije cfDNA s koncentracijom beta-2 mikroglobulina, dobi, LDH i Ki-67 u bolesnika s indolentnim B-NHL



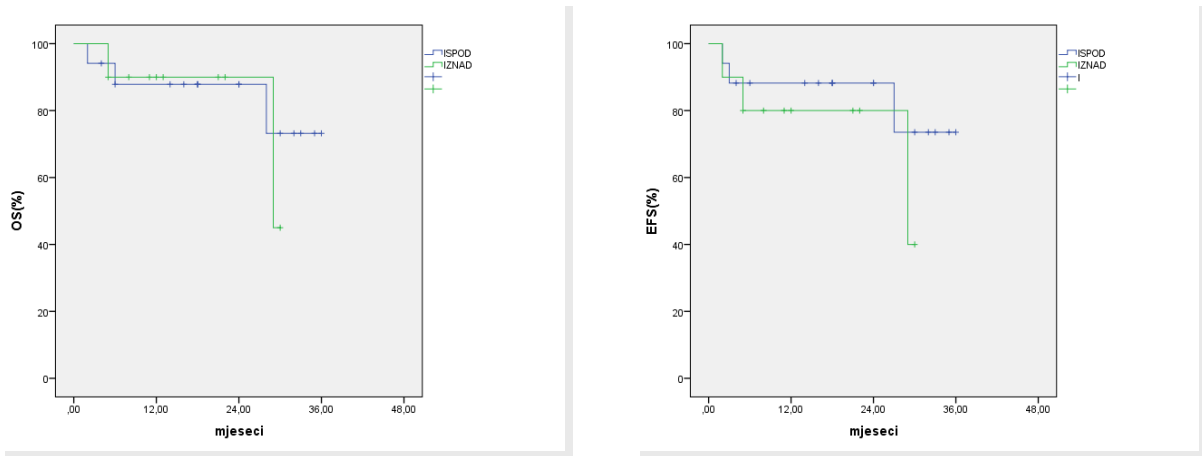
Nije bilo razlike u koncentraciji cfDNA prema tipu limfoma, spolu, proširenosti bolesti niti IPI. Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji cfDNA između bolesnika koji jesu i onih koji nisu odgovorili na liječenje (sl. 20).

SLIKA 20 Koncentracija cfDNA prema odgovoru na liječenje, stadiju, tipu limfoma i spolu u bolesnika s indolentnim B-NHL



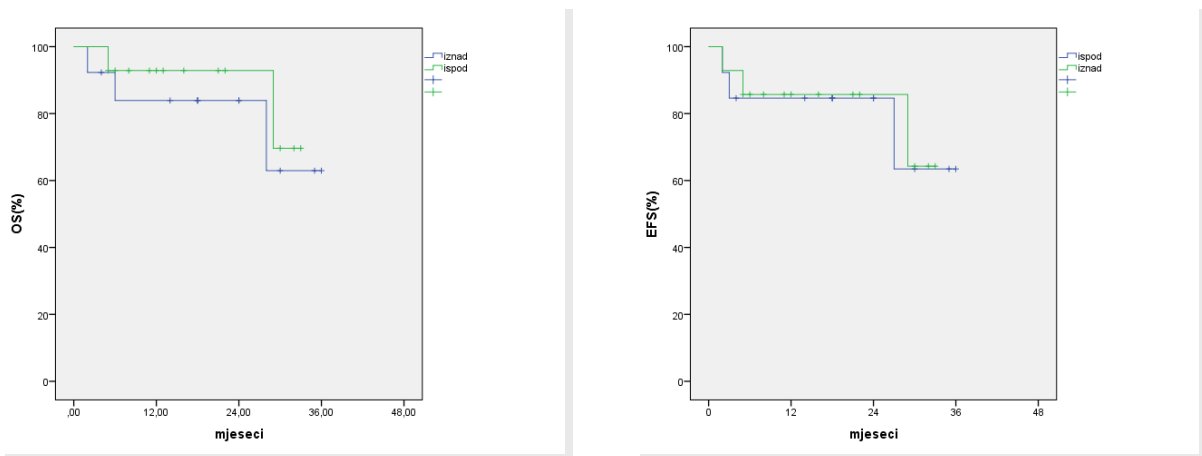
Nije bilo razlike u odgovoru na terapiju ni OS niti EFS između bolesnika s normalnim i povišenim koncentracijama cfDNA (dvogodišnji OS: 88+-8% naprema 90+-10%, p=0.74; dvogodišnji EFS: 88+-8% naprema 80+-12%, p=0.39) (sl. 21).

SLIKA 21 OS i EFS bolesnika s indolentnim B-NHL s normalnom i povišenom koncentracijom cfDNA



Isto tako, nije bilo razlike u odgovoru na terapiju ni OS niti EFS između bolesnika s koncentracijama cfDNA ispod i iznad medijana (dvogodišnji OS: 85+/-10% naprema 93+/-7%,  $p=0.54$ ; dvogodišnji EFS: 85+/-10% naprema 86+/-10%,  $p=0.87$ ) (sl. 22).

SLIKA 22 OS i EFS bolesnika s indolentim B-NHL prema koncentraciji cfDNA



Multivarijatna analiza nije rađena zbog malog broja bolesnika.

### 5.2.2.1 Folikularni limfom

U tablici 10 su prikazane značajke bolesnika s FL.

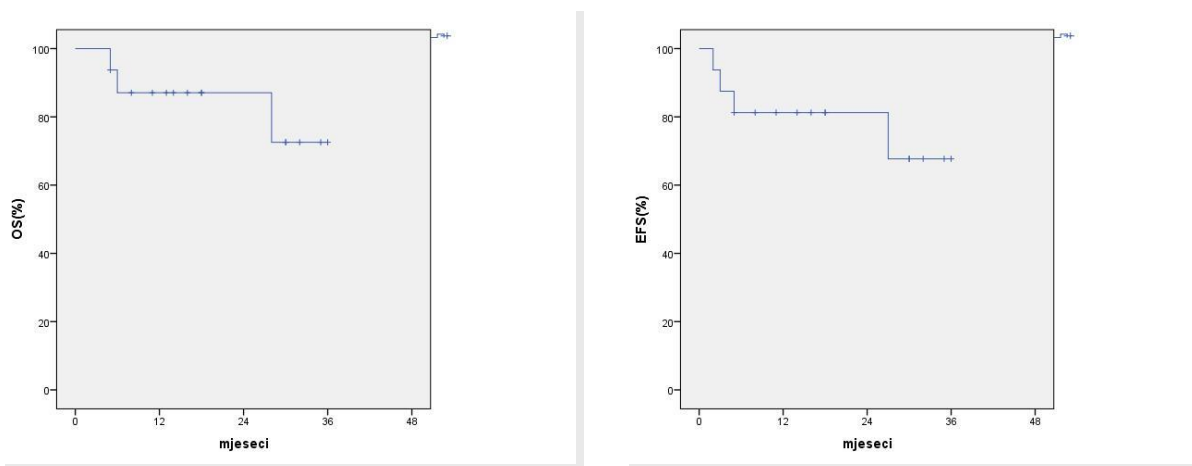
TABLICA 10 Značajke bolesnika s FL

ZNAČAJKA	BROJ BOLESNIKA (n=16)
<b>Demografske značajke</b>	
Dob (medijan, raspon) [godine]	55 (43-65)
Spol (m/ž)	6 / 10
<b>Značajke bolesti</b>	
Stadij I, II	2
III, IV	14
FLIPI nizak	8
srednji	5
visok	3
<b>Odgovor na liječenje</b>	
KR, nKR	11
PR	3
Relaps, refraktorni	3

Medijan koncentracije cfDNA je bio 16.8 ng/ml s rasponom od 2.09 ng/ml do 251,63 ng/ml

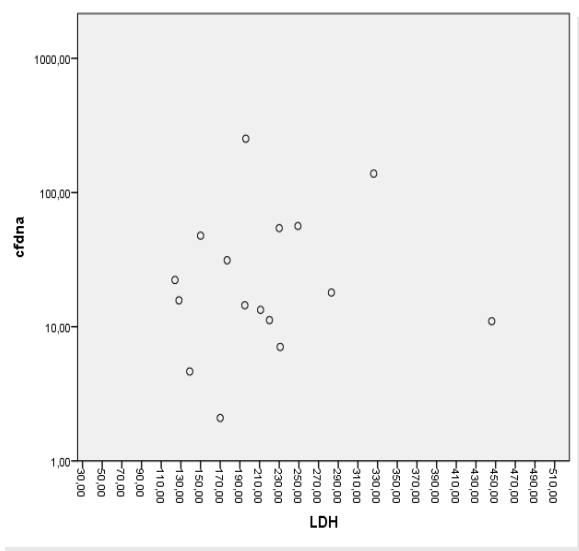
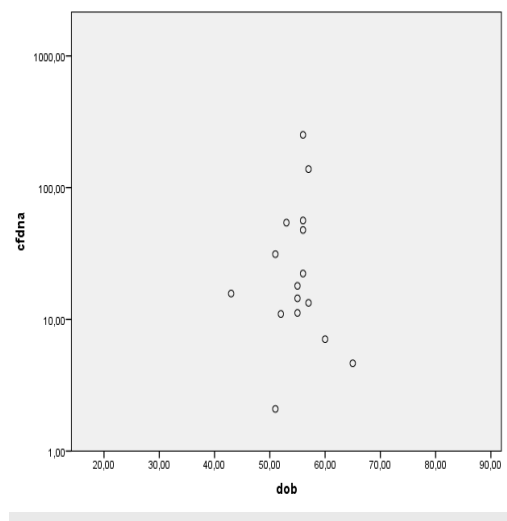
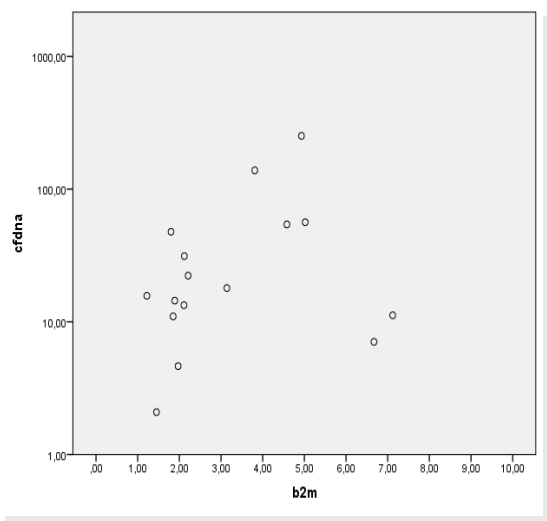
Dvogodišnje OS je bilo 81 %, a EFS 75% (sl. 23).

SLIKA 23 OS i EFS bolesnika s FL



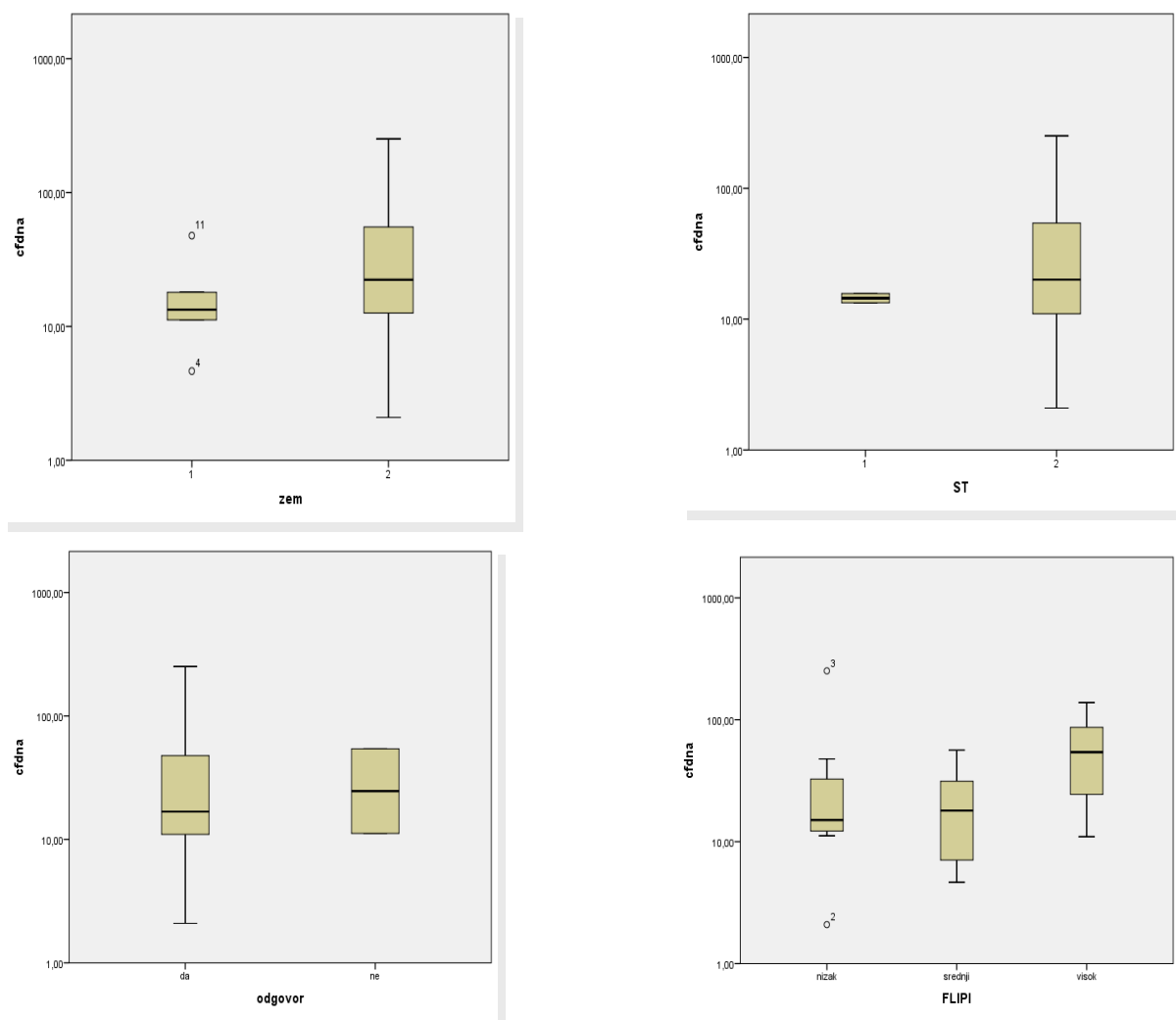
Koncentracija cfDNA ne korelira ni s beta 2 mikroglobulinom ( $p=0.2$ ) ni s dobi ( $p=0,86$ ) niti LDH ( $p=0.57$ ) (sl. 24).

SLIKA 24 Korelacija koncentracije cfDNA u bolesnika s FL s koncentracijom beta-2 mikroglobulina, dobi i LDH



Nije bilo razlike u koncentraciji cfDNA prema spolu, proširenosti bolesti niti FLIPI. Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji cfDNA između bolesnika koji jesu i onih koji nisu odgovorili na liječenje (sl. 25).

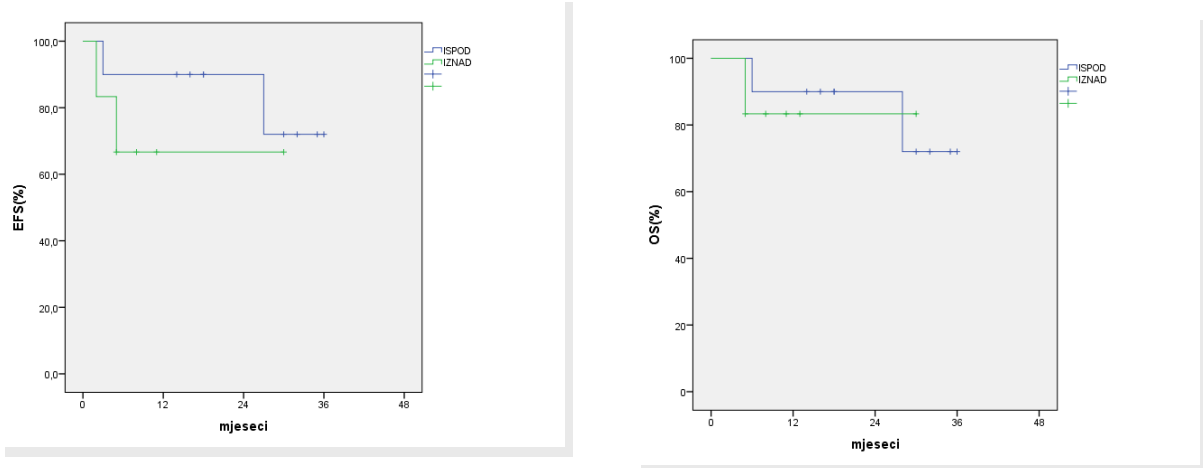
SLIKA 25 Koncentracija cfDNA u bolesnika s FL prema spolu, stadiju, odgovoru na liječenje i FLIPI



Nije bilo statistički značajne razlike u odgovoru na terapiju niti OS i EFS između bolesnika s normalnim i povišenim koncentracijama cfDNA (dvogodišnji OS: 90+/-10% naprema 83+/-15%,  $p=0.82$ ; dvogodišnji EFS: 90+/-10% naprema 83+/-15%,  $p=0.39$ ) (sl. 26).

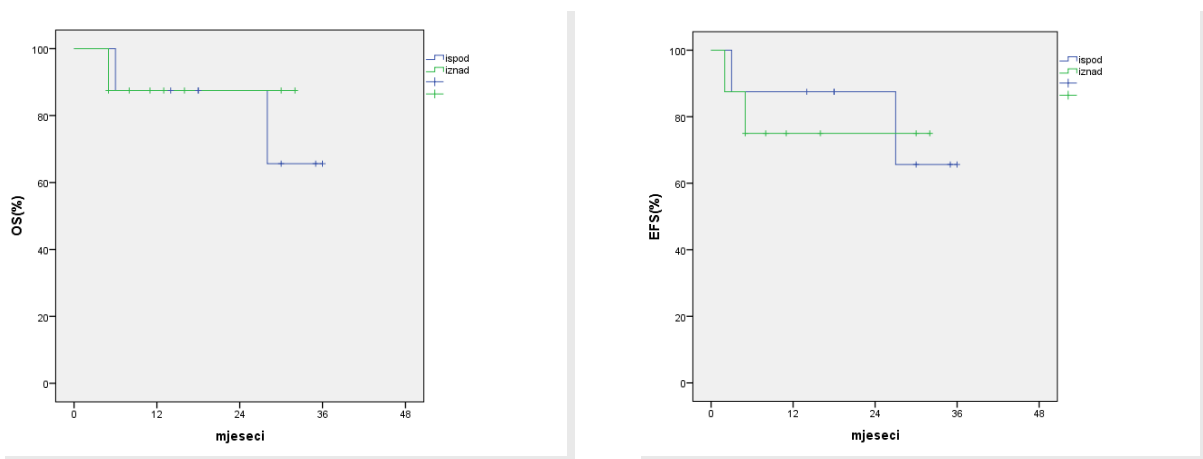


SLIKA 26 OS i EFS bolesnika s FL s normalnom i povišenom koncentracijom cfDNA



Isto tako, nije bilo statistički značajne razlike u odgovoru na terapiju niti OS i EFS između bolesnika s koncentracijama cfDNA ispod i iznad medijana (dvogodišnji OS: 88+-12% naprema 88+-12%, p=0.75; dvogodišnji EFS: 88+-12% naprema 88+-12%, p=0.84) (sl. 27).

SLIKA 27 OS i EFS bolesnika s FL prema koncentraciji cfDNA



Multivarijatna analiza nije rađena zbog malog broja bolesnika.

### 5.3 HODGKINOV LIMFOM

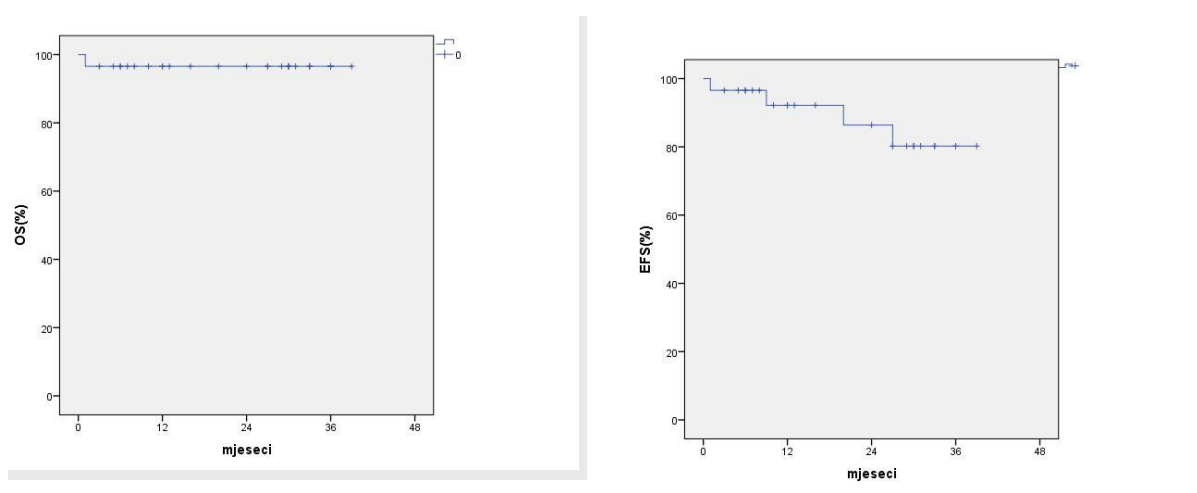
U ispitivanje je uključeno 29 bolesnika s HL, njihove značajke su prikazane u tablici 11.

TABLICA 11 Značajke bolesnika s HL

ZNAČAJKA	BROJ BOLESNIKA (n=29)
<b>Demografske značajke</b>	
Dob (medijan,raspon) [godine]	32 (18-74)
Spol (m/ž)	13 / 16
<b>Značajke bolesti</b>	
Stadij I,II	17
III, IV	12
Povoljni rizik	6
Nepovoljni rizik	23
<b>Odgovor na liječenje</b>	
KR, nKR	27
NR	2
relaps	3

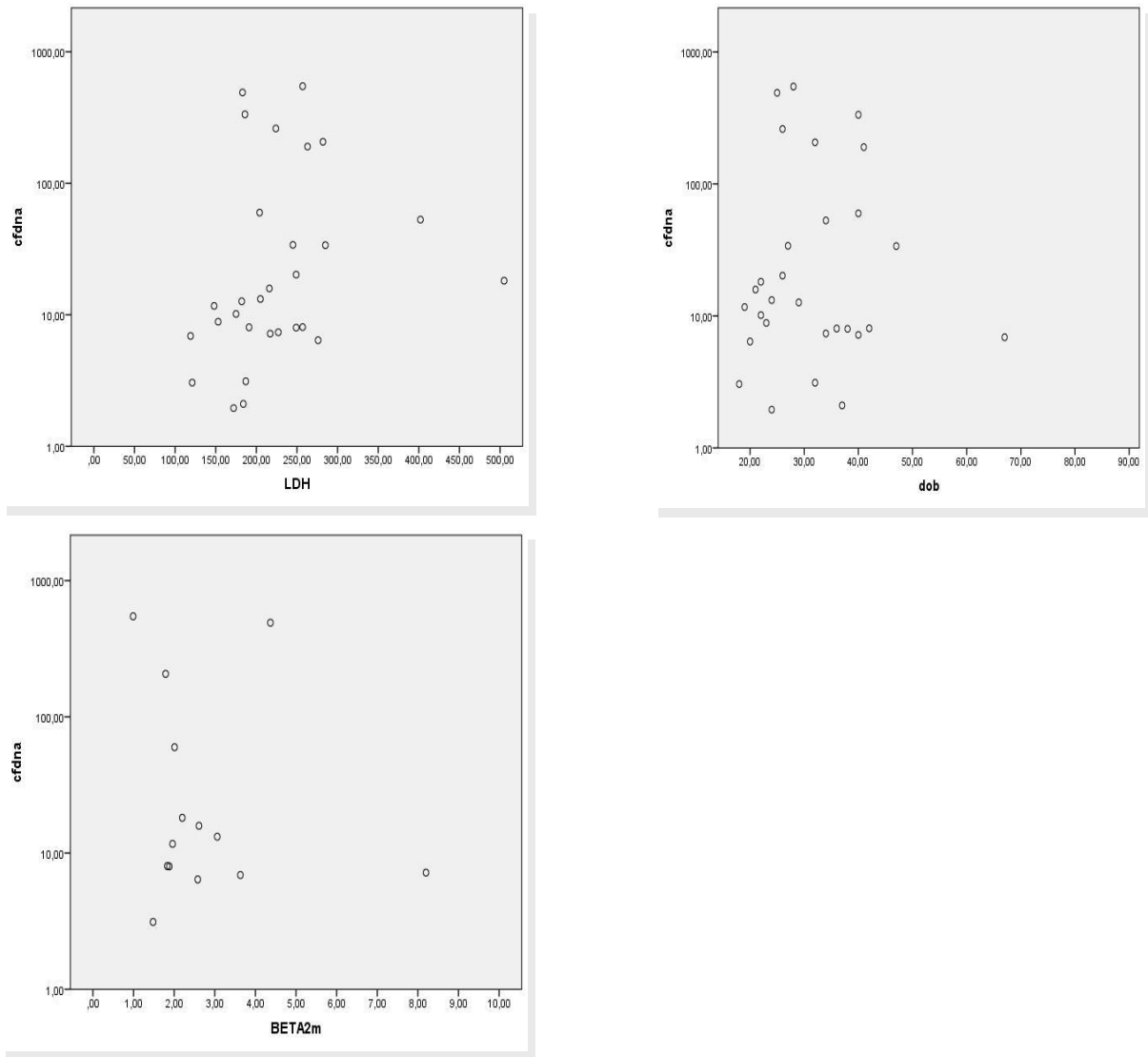
Dvogodišnje OS je bilo 97%, a EFS 86 % (sl. 28).

SLIKA 28 OS i EFS bolesnika s HL



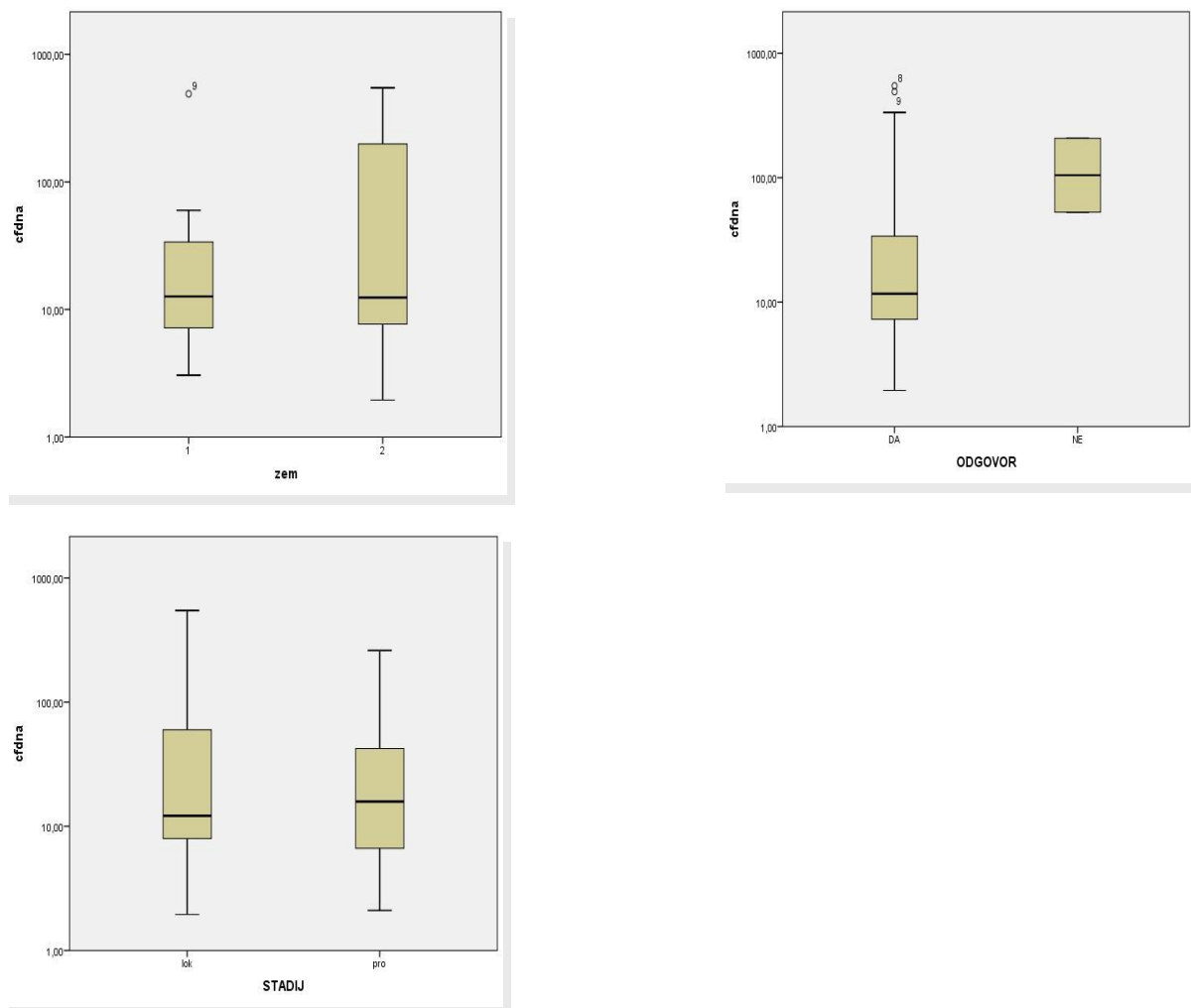
Koncentracija cfDNA je korelirala s LDH ( $p=0.03$ ), ali ne s dobi ( $p=0,63$ ) ni beta 2 mikroglobulinom ( $p=0.61$ ) niti Ki-67 ( $p=0.977$ ) (sl. 29).

SLIKA 29 Korelacija koncentracije cfDNA s koncentracijom beta-2 mikroglobulina, dobi i LDH u bolesnika s HL



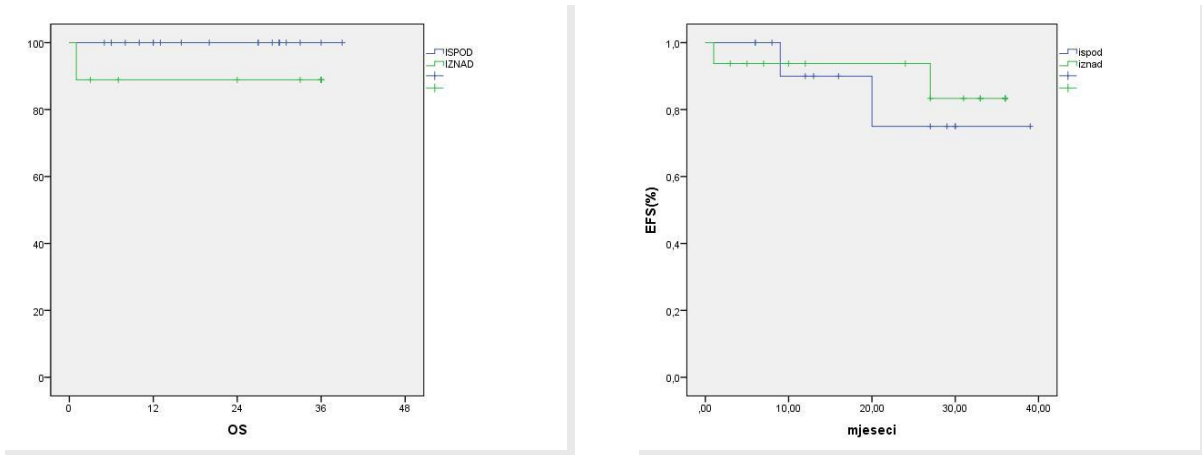
Nije bilo razlike u koncentraciji cfDNA prema spolu, proširenosti bolesti niti IPS. Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji cfDNA između bolesnika koji jesu i onih koji nisu odgovorili na liječenje (sl. 30).

SLIKA 30 Koncentracija cfDNA u bolesnika s HL prema spolu, odgovoru na liječenje i stadiju.



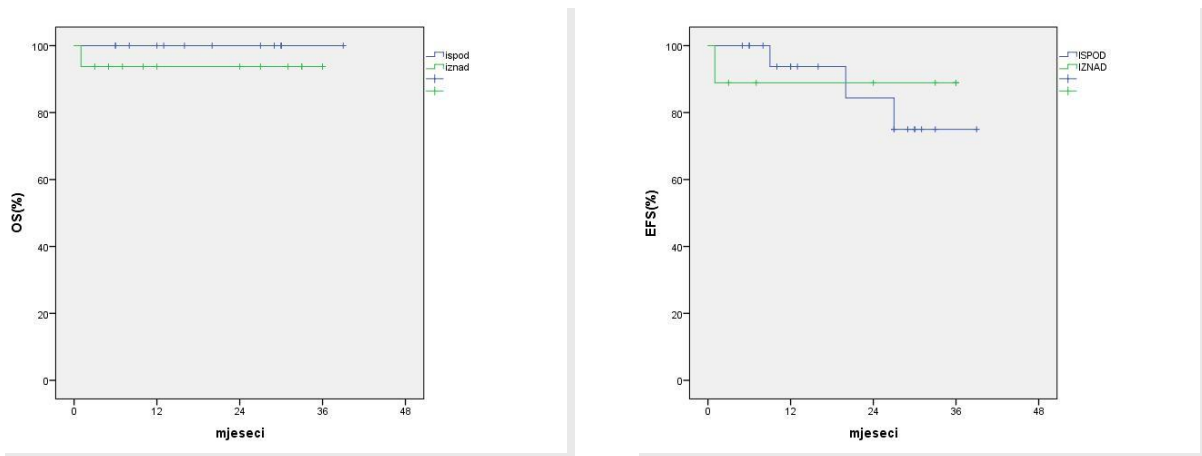
Nije bilo razlike u odgovoru na terapiju između bolesnika s normalnim i povišenim koncentracijama cfDNA. U tim skupinama nije bilo statistički značajne razlike niti u OS i EFS (dvogodišnji OS: 100% naprema 90+-10%,  $p=0.13$ ; dvogodišnji EFS: 94+-6% naprema 90+-10%,  $p=0.73$ ) (sl. 31).

SLIKA 31 OS i EFS bolesnika s HL s normalnom i povišenom koncentracijom cfDNA



Isto tako, nije bilo statistički značajne razlike u odgovoru na terapiju između bolesnika s koncentracijama cfDNA ispod i iznad medijana. U tim skupinama nije bilo razlike niti u OS i EFS (dvogodišnji OS: 100% naprema 94+-6%,  $p=0.36$ ; dvogodišnji EFS: 90+-10% naprema 94+-6%,  $p=0.7$ ) (sl. 32).

SLIKA 32 OS i EFS bolesnika s HL prema koncentraciji cfDNA

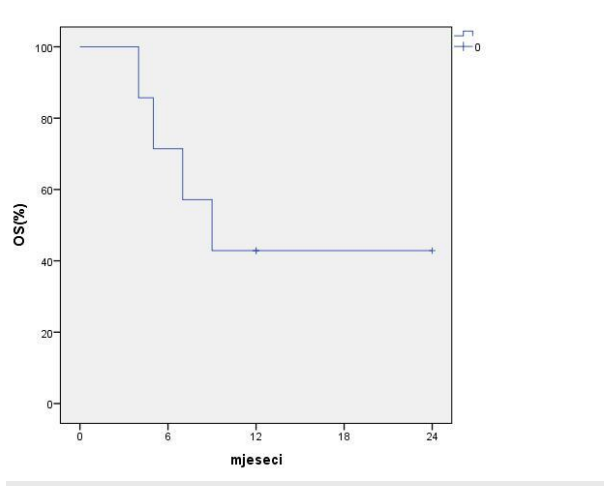


Multivarijatna analiza nije rađena zbog malog broja bolesnika.

## 5.4 T-NON HODGKINOVIM LIMFOMI

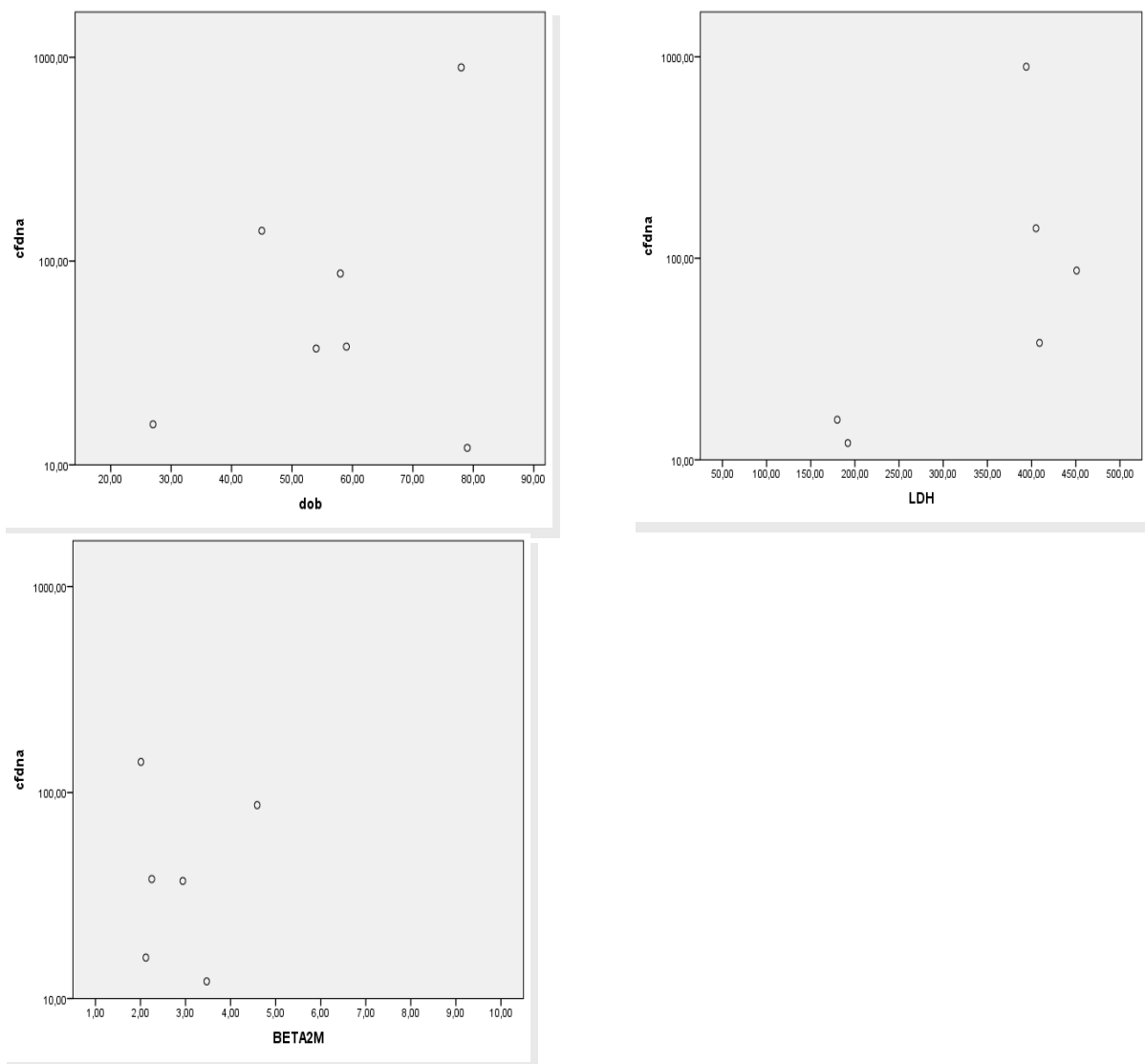
U ispitivanje je uključeno 7 bolesnika s T-NHL. Radi se u heterogenoj skupini od kojih su 4 imala PTCL, dva ALCL, a jedan LBL. Medijan preživljavanja je iznosio 9 mj (sl. 33).

SLIKA 33 OS bolesnika s T-NHL



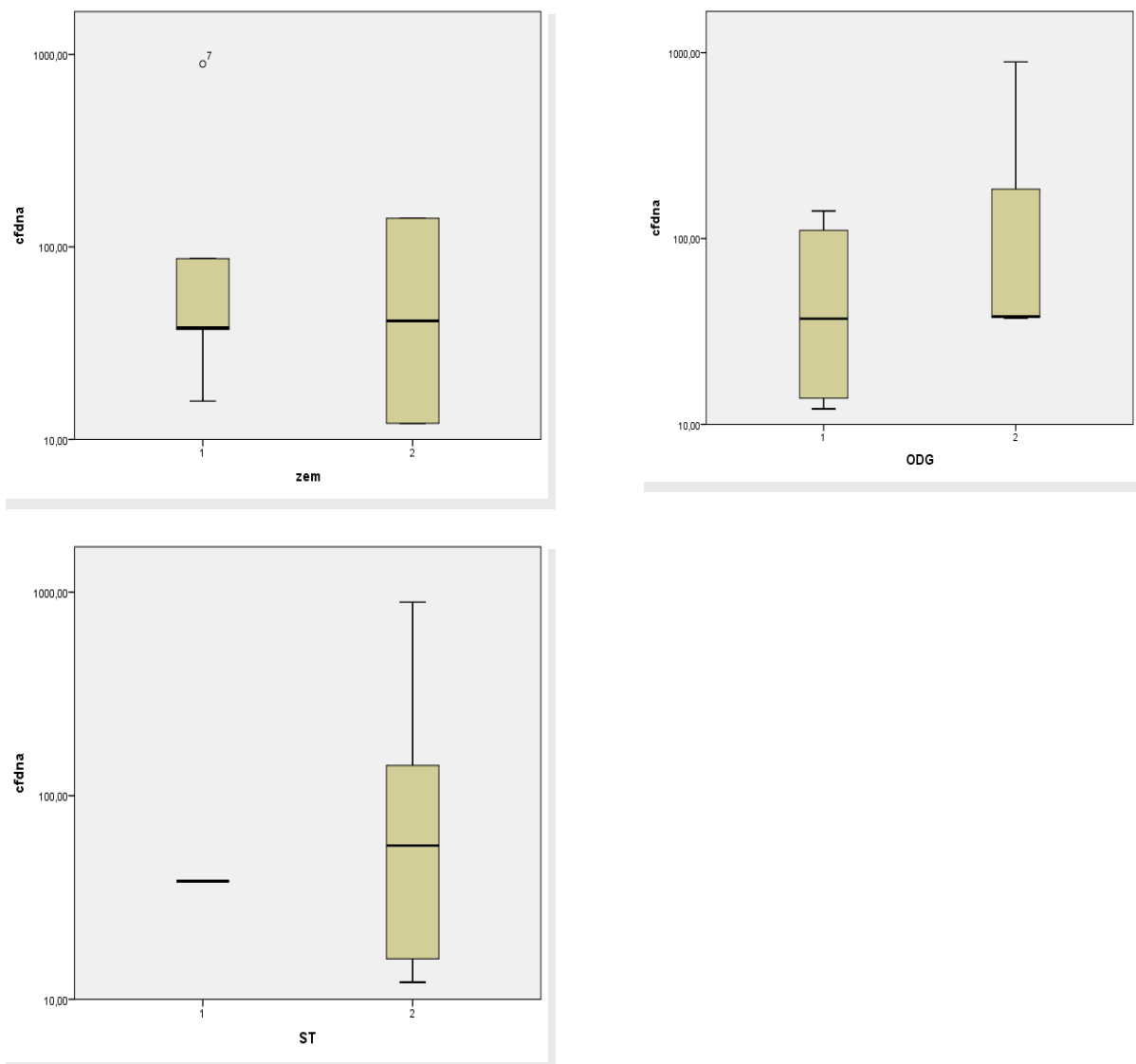
Raspon koncentracije cfDNA je iznosio od 12.12 ng/ml do 892.36 ng/ml s medijanom 38 ng/ml. Koncentracija cfDNA korelira s dobi ( $p=0.01$ ), ali ne s LDH ( $p=0.86$ ) ni beta 2 mikroglobulinom ( $p=0.42$ ) niti Ki-67 ( $p=0,188$ ) (sl. 34).

SLIKA 34 Korelacija koncentracije cfDNA s dobi, LDH i koncentracijom beta-2 mikroglobulina u bolesnika s T-NHL



Nije bilo razlike u koncentraciji cfDNA prema spolu. Bolesnici s proširenom bolesti imaju višu koncentraciju cfDNA od onih s lokaliziranom ( $p=0.019$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji cfDNA između bolesnika koji jesu i onih koji nisu odgovorili na liječenje (sl. 35).

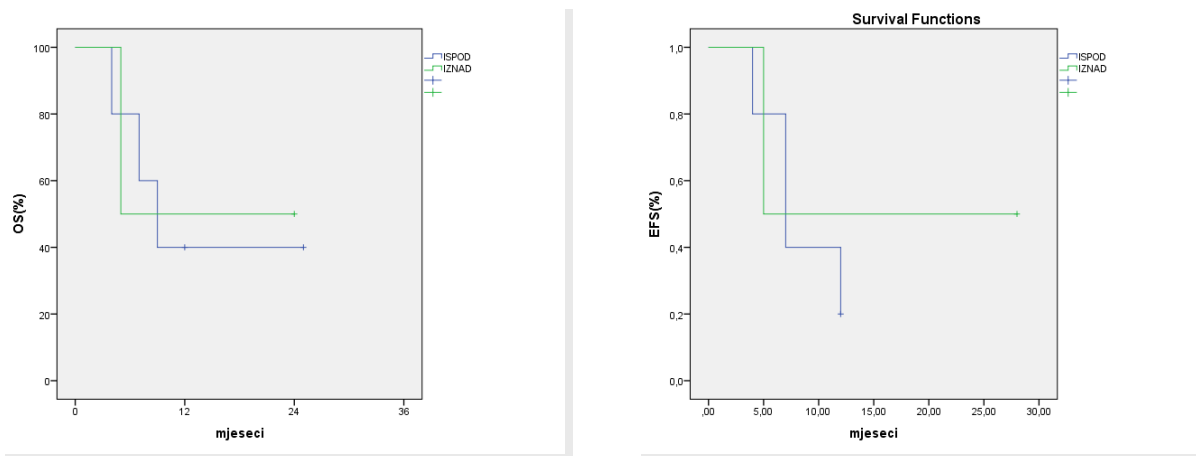
SLIKA 35 Koncentracija cfDNA u bolesnika s T-NHL prema spolu, odgovoru na liječenje i stadiju



Nije bilo statistički značajne razlike u odgovoru na liječenje ni OS (medijan 8 mj. naprema 5 mj,  $p=0.93$ ) niti EFS (medijan 7 mj. naprema 5 mj,  $p=0.7$ ) između bolesnika s normalnim i povišenim koncentracijama cfDNA (sl. 36).

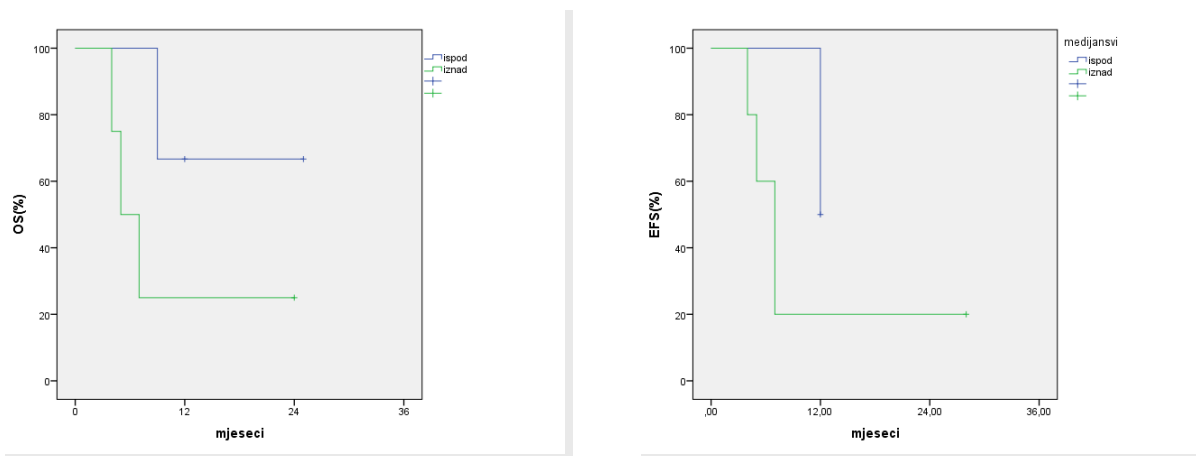


SLIKA 36 OS i EFS bolesnika s T-NHL s normalnom i povišenom koncentracijom cfDNA



Isto tako, nije bilo statistički značajne razlike u odgovoru na liječenje ni OS (medijan 12 mj. naprema 5 mj,  $p=0.18$ ) niti EFS (medijan 10 mj. naprema 5 mj,  $p=0.44$ ) između bolesnika s koncentracijama cfDNA ispod i iznad medijana (sl. 37).

SLIKA 37 OS i EFS bolesnika s T-NHL prema koncentraciji cfDNA



Multivarijatna analiza nije rađena zbog malog broja bolesnika.

## 5.5 DINAMIKA KONCENTRACIJE IZVANSTANIČNE DNA

Koncentracija cfDNA nakon završetka liječenja bila je značajno niža, nego na početku (medijan 6.71 ng/ml, raspon 0.35-45.35 ng/ml,  $p=0.005$ ) i bila je neovisna o tipu limfoma. Nije bilo značajne razlike u odgovoru, OS niti EFS između bolesnika s normalnom i onih s povišenom koncentracijom cfDNA kao niti između bolesnika s koncentracijama ispod i iznad medijana. Isto tako, nije bilo razlike u koncentraciji cfDNA između bolesnika koji jesu i onih koji nisu odgovorili na liječenje.

Omjer koncentracije cfDNA poslije i prije liječenje kretao se od 1.2% do 104.6% (medijan 11,5%) i bio je neovisan o tipu limfoma. Nije bilo značajne razlike u odgovoru ni OS niti EFS između bolesnika s koncentracijama ispod i iznad medijana. Isto tako, nije bilo razlike u omjeru koncentracije cfDNA poslije i prije liječenja između bolesnika koji jesu i onih koji nisu odgovorili na liječenje.

## 6. RASPRAVA

Iako nije najveće po broju bolesnika, ovo je prvo istraživanje cfDNA u bolesnika s tumorima limfoidne loze u kojem su zastupljene sve uobičajene, a ne samo češće vrste limfoma<sup>50,51</sup>. Limfomi su heterogena skupina zloćudnih bolesti, s velikim brojem nozoloških entiteta<sup>17</sup> zbog čega su rjeđe dijagnoze zastupljene malim brojem bolesnika. Iako to smanjuje statističku značajnost nalaza u pojedinim podskupinama, daje bolji pregled koncentracije cfDNA u čitavoj populaciji bolesnika s ovim bolestima. Učestalost pojedinih podtipova limfoma u ispitivanoj populaciji odgovara očekivanju<sup>8,17</sup>, s razlikama koje su posljedica kriterija za uključivanje, prvenstveno onog po kome se u istraživanje ne uključuju bolesnici s morfološki vidljivim cirkulirajućim tumorskim stanicama. Zbog toga je u istraživanje uključen manji broj bolesnika s indolentnim B-NHL, prvenstveno SLL i MZL te onih s LBL. Ispitivana populacija prema ostalim značajkama odgovara uobičajenoj populaciji bolesnika pa predstavlja adekvatan uzorak za ovakvo istraživanje.

Metodologija određivanja koncentracije cfDNA je robustna i pouzdana. Metoda određivanja koncentracije DNA lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu se upotrebljava rutinski, a laboratorij u kojem je test rađen to radi redovito, ima veliko iskustvo i međunarodni ugled, tako da su rezultati pouzdani<sup>67</sup>. Isključivanjem bolesnika koji mogu imati druge uzroke porasta koncentracije cfDNA, poput onih s drugim teškim bolestima, operacijom ili na terapiji glukokortikoidima (steroidi djeluju limfolitički na stanice limfoma pa povećavaju koncentraciju cfDNA) izbjegnuti su utjecaji drugih čimbenika, nevezanih za bolest, koji bi mogli povećati koncentraciju cfDNA i tako otežati ili onemogućiti interpretaciju rezultata<sup>47</sup>. Iako su druge skupine koristile druge gene za kvantifikaciju cfDNA<sup>50,51</sup>, tehničke značajke metode su takve da to ne utječe bitno na rezultate, pogotovo što su glavne razlike u svim istraživanjima opažene između skupina bolesnika s višim i nižim koncentracijama od medijana, a ne između bolesnika s koncentracijom cfDNA usporedivom s i višom od one u zdravih osoba.

Rezultati liječenja bolesnika su u najmanju ruku onakvi kakvi se prema podacima iz literature očekuju. Štoviše, rezultati liječenja nekih limfoma, prvenstveno B-LCL i HL, su i bolji nego što bi se očekivalo. U našem centru je terapija ovih bolesnika prilagođena riziku, tako da bolesnici mlađi od 60 godina s visokorizičnim limfomima dobivaju R-CHOEP14, odnosno eBEACOPP. Takav izbor terapije bi mogao objasniti dvogodišnje EFS od oko 80%, odnosno preko 90% u ovih bolesnika. I dok su takvi rezultati povoljni za bolesnike, otežavaju identifikaciju mogućih prognostičkih čimbenika.

Sveukupno nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji cfDNA između pojedinih skupina limfoma. Mogući izuzetak čine bolesnici s intermedijarnim limfomom sa značajkama između B-LCL i BL te oni s EMZL u kojima je značajan udio bolesnika imao vrlo visoke koncentracije cfDNA (2 od 3, odnosno 2 od 5). Obzirom na mali broj bolesnika ovaj nalaz treba shvatiti isključivo kao poticaj za daljnja istraživanja, no zanimljivo je da se radi o entitetima s dijametralno različitim biologijama i prognozama. Prvi su agresivni i spadaju u B-limfome s najlošijom prognozom, dok su potonji vrlo indolentne bolesti od kojih se rijetko umire. Tako je bolesnik s najvišom koncentracijom cfDNA iz EMZL skupine dobro i bez liječenja preko 2 godine. Isto tako, nismo našli niti trend koji bi ukazivao na postojanje korelacije između agresivnosti limfoma i koncentracije cfDNA. Medijan koncentracija cfDNA bio je među najnižima u bolesnika s najbrže rastućim limfomom, BLom. EMZL, iako najindolentniji, je od svih indolentnih NHL imao najviši medijan koncentracije cfDNA, a LBL, iako najagresivniji, najniži od svih T-NHL.

Koncentracije cfDNA u naših bolesnika su slične onima iz talijanske studije<sup>51</sup>. Postoje manje razlike u NHL, kod nas su nešto niži medijani koncentracije kod svih bolesnika (20.57 ng/ml naprema 24.1 ng/ml) i B-LCL (24.8 ng/ml naprema 26.9 ng/ml), a nešto viši kod bolesnika s FL (16.84 ng/ml naprema 14.7 ng/ml) i MCL (36.62 ng/ml naprema manje od 30 (u tekstu rada nema brojčanog podatka, samo graf s medijanom)). Veća razlika postoji u bolesnika s HL gdje naši bolesnici imaju dva puta manji medijan koncentracije cfDNA (12.65 ng/ml naprema 25,7 ng/ml).

U pedijatrijskoj studiji su koncentracije cfDNA bile niže u zdravih, a više u djece s limfomima<sup>50</sup>. To vrijedi za ukupnu populaciju bolesnika, kao i za sve ispitivane vrste limfoma (HL, B-LCL, BL i LBL) s izuzetkom ALCLa. Obzirom da koncentracija cfDNA korelira s dobi, vjerojatnije je da je ova razlika posljedica razlike u biologiji tumora limfoidne loze u dječjoj i odrasloj dobi, nego razlika u metodologiji. Što se ALCL tiče, u našoj studiji je medijan koncentracije cfDNA bio viši nego u pedijatrijskoj, ali imali smo samo dva bolesnika pa je značenje ovog nalaza dvojbeno.

Koncentracija cfDNA u bolesnika s NHL u našem istraživanju je korelirala s dobi, LDH, koncentracijom beta 2 mikroglobulina i stadijem. To su listom čimbenici koji ukazuju na veću tumorsku masu i agresivniju bolest. Čini se da je u većini slučajeva korelacija bila jača s beta 2 mikroglobulinom, koji bolje korelira s tumorskom masom, nego s LDH, koja bolje korelira s brojem stanica u ciklusu<sup>68</sup>. Slični su bili i nalazi druga dva objavljena istraživanja, s tim da oni nisu ispitivali korelaciju s koncentracijom beta 2 mikroglobulina. U pedijatrijskoj studiji nije pokazana korelacija između LDH i koncentracije cfDNA, vjerojatno zato što su LDH

analizirali kao kategorijsku varijablu (manje ili više od 1000), a ne kontinuiranu kvantitativnu kao u našem i talijanskom istraživanju.

Nije stoga neobično da su sve tri studije našle da bolesnici s NHL s višim vrijednostima cfDNA lošije odgovaraju na liječenje i imaju lošiju prognozu od onih s nižim. Izgleda da pri tome nije toliko važno imaju li bolesnici koncentraciju cfDNA višu od najviše u zdravih, već je važnija usporedba s nalazom u drugih bolesnika, tj. iznad i ispod medijana koncentracije. Navedeni zaključci nisu statistički značajni u svim skupinama, no i u onima u kojima nisu (poput indolentnih NHL i T-NHL) čini se da postoji takav trend, tako da se razlika može objasniti kratkim praćenjem (za indolentne limfome) i malim brojem bolesnika (za T-NHL).

U našem istraživanju, u multivarijantnoj analizi koncentracija cfDNA nije bila neovisan prognostički čimbenik, što ukazuje na to da se njen učinak na prognozu može objasniti korelacijom s drugim, dobro poznatim nepovoljnim prognostičkim čimbenicima, poput dobi, LDH i koncentracijom beta 2 mikroglobulina. Ne znamo odgovara li ovaj nalaz onima iz druga dva istraživanja jer su u njima objavljeni rezultati multivarijantne analize samo za populacije bolesnika s pojedinim vrstama limfoma.

Rezultati u skupini bolesnika s B-LCL, iako svi nisu statistički značajni, pokazuju isti trend korelacije koncentracije cfDNA s dobi, LDH, beta 2 mikroglobulinom, IPI, proširenosti bolesti i nepovoljnim ishodom. Po tome su naši rezultati slični onima talijanske studije, a eventualne razlike se mogu objasniti razlikom u broju bolesnika.<sup>51</sup> U našoj skupini, međutim, koncentracija cfDNA nije bila neovisan prognostički čimbenik, već samo IPI, dok je u talijanskoj studiji ona bila skoro neovisna ( $p=0.06$ ). Moguće su dvije interpretacije ove razlike. Prva je da  $p=0.06$  nije statistički značajan pa koncentracija cfDNA niti u talijanskoj studiji nije bila neovisan prognostički čimbenik, bez obzira na drugačiju interpretaciju rezultata od strane autora. Drugo objašnjenje je da su naši rezultati glede OS i EFS oko 10% bolji pa da je bolja terapija poništila prognostički učinak koncentracije cfDNA.

Rezultati dobiveni u skupini bolesnika s HL bitno odudaraju od onih u bolesnika s NHL. Medijan koncentracije cfDNA u naših bolesnika je više nego dva puta niži nego u talijanskoj studiji, dok je razlika prema pedijatrijskoj skupini još veća<sup>50,51</sup>. Nema očiglednog objašnjenja za to, značajke bolesnika su slične, moguće u našoj studiji ima razmjerno više onih s nepovoljnom prognozom. Kod nas, kao i u talijanskoj studiji, koncentracija cfDNA korelira s LDH (u pedijatrijskoj studiji nema podataka o LDH u bolesnika s HL), no kod nas nema niti trenda korelacije s dobi, prognostičkim indeksom ili ishodom. Za razliku od toga, u obadvije objavljene studije su bolesnici s HL s višom koncentracijom cfDNA imali lošije prognostičke značajke i lošije ishode od onih s nižim koncentracijama. Iako je moguće da je razlika

posljedica manjeg broja bolesnika s HL u našoj studiji, nedostatak trenda govori protiv toga. Ponovno, naši rezultati su za oko 10% bolji od talijanskih pa je moguće da bolja terapija, u ovom slučaju češće korištenje eBEACOPPa, poništava nepovoljan prognostički utjecaj koncentracije cfDNA. To međutim, ne objašnjava činjenicu da naši bolesnici imaju nižu koncentraciju cfDNA te da u nas taj nalaz ne korelira s nepovoljnim prognostičkim čimbenicima za HL. Za razjašnjavanje ovih diskrepancija bila bi potrebna dodatna istraživanja na većem broju slično dijagnostički obrađenih i slično liječenih bolesnika.

Ni jedno do sada objavljeno istraživanje u bolesnika s limfomima nije uspoređivalo udio Ki-67 pozitivnih limfomskih stanica i koncentraciju cfDNA. U našem istraživanju ova dva parametra nisu korelirala, s izuzetkom skupine agresivnih B limfoma, a i ta korelacija je granična. Prema tome, najvjerojatnije se radi o statističkom artefaktu, posljedici multiplih usporedbi. Ovaj podatak je važan jer ukazuje da cfDNA nije samo biljeg brzine proliferacije tumora i potvrđuje našu teoriju da veličina i vrsta tumora imaju važan utjecaj na njenu koncentraciju.

Do sada objavljena istraživanja u bolesnika s tumorima, limfomima ili solidnim tumorima, nisu ispitivala ni dinamiku koncentracije cfDNA. Stoga su naši rezultati prvi i stoga, iako negativni, posebno značajni. Koncentracija cfDNA pada tijekom liječenja limfoma, no ni konačna razina niti relativna veličina smanjenja koncentracije cfDNA ne koreliraju s ishodom liječenja ni u sveukupnoj istraživanoj populaciji niti u pojedinačnim skupinama limfoma. Jedini bolesnik koji je na kraju liječenja imao višu koncentraciju cfDNA nego na početku, odgovorio je na liječenje, živ je i u remisiji. Ovi nalazi govore za to da količina rezidualne tumorske mase nije jedina odrednica koncentracija cfDNA na kraju liječenja, već na nju utječu i neki drugi čimbenici, na primjer terapija. Moguće je zamisliti model po kojem terapija isprva dovodi do povećanja koncentracije cfDNA zbog pojačanog raspada kemosenzitivnih stanica da bi naposljetku ostale one koje su manje osjetljive na endogene i egzogene nokse pa oslobađaju manje cfDNA u krv. Isto tako, terapija može nepovoljno utjecati na normalne stanice i tako povisiti koncentraciju cfDNA i u bolesnika kod kojih više nema tumora. Bez obzira bila ova objašnjenja točna ili ne, dinamika koncentracije cfDNA ne može se koristiti kao prognostički parametar u bolesnika s limfomima.

## 7. ZAKLJUČCI

- Koncentracija cfDNA u bolesnika s limfomima je nešto viša nego u općoj populaciji, ali svega oko 1/3 bolesnika ima koncentracije iznad najviše gornje granice normale;
- Koncentracija cfDNA u NHL korelira s nepovoljnim prognostičkim čimbenicima: dobi, LDH, koncentracijom beta 2-mikroglobulina, IPI i stadijem bolesti. Najbolja je korelacija s koncentracijom beta 2 mikroglobulina što upućuje na to da je veličina tumorske mase najvažnija odrednica koncentracije cfDNA na početku liječenja;
- Bolesnici s NHL s koncentracijama cfDNA iznad medijana imaju u univarijantnoj analizi lošije ishode liječenja od onih s koncentracijama ispod medijana. Koncentracija cfDNA nije neovisan prognostički čimbenik, već se njen učinak može objasniti korelacijom s poznatim nepovoljnim prognostičkim čimbenicima;
- U bolesnika s HL, koncentracija cfDNA korelira s LDH, ali ne korelira s dobi, proširenosti bolesti, IPSom niti ishodima;
- Dinamika koncentracije cfDNA nije od prognostičke važnosti;
- Određivanje koncentracije cfDNA nije od prognostičkog značenja u bolesnika s limfomima;
- Određivanje koncentracije cfDNA nije od dijagnostičkog značenja u bolesnika sa češćim podtipovima limfoma. Nalaz izrazito viših koncentracija cfDNA u malim skupinama bolesnika s intermedijarnim agresivnim B-NHL između B-LCL i BL te s EMZL treba potvrditi u većim serijama;
- Nema jasne korelacije između agresivnosti tipa limfoma i koncentracije cfDNA.

## 8. SAŽETAK

Slobodna izvanstanična cirkulirajuća DNA (cfDNA) može se naći u malim količinama u plazmi zdravih pojedinaca, a povišene vrijednosti opisane su u različitim kliničkim stanjima kao što su maligne i autoimune bolesti, infarkt miokarda, trauma, upale te komplikacije trudnoće. cfDNA kod bolesnika s tumorom je tumorskog porijekla. Iako je dosta istraživana u solidnih tumora, postoji puno manje podataka o cfDNA u hematoloških malignih bolesti. Cilj ovog ispitivanja je bio odrediti razinu cfDNA u bolesnika s limfomima, njenu korelaciju s demografskim, biološkim i kliničkim značajkama bolesnika i tumora te istražiti može li se koristiti kao biljeg aktivnosti bolesti, prognostički biljeg ili kao biljeg odgovora na terapiju. Ispitivanje je provedeno na skupini od 129 bolesnika s limfomima liječenih na uobičajen način. Prosječna dob ispitanika bila je 56 godina, raspon 17-87, 66% su bili muškarci. Hodgkinov limfom (HL) je imalo 29, B-NHL 93, agresivni 66, a indolentni 27. Bolesnika s B-velikostaničnim limfomom (B-LCL) je bilo 47. Sedam bolesnika je imalo T-NHL. Koncentracija cfDNA određivana je kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu prije i po završetku liječenja.

Koncentracija cfDNA je nešto viša nego u općoj populaciji (medijan 20.57 ng/ml naprema 12.1 ng/ml), no svega 1/3 bolesnika ima koncentraciju cfDNA iznad gornje granice normale. Nema jasne korelacije između agresivnosti tipova limfoma i koncentracije cfDNA. U bolesnika s NHL koncentracija cfDNA korelira s nepovoljnim prognostičkim čimbenicima: dobi, LDH, koncentracijom beta 2 mikroglobulina, stadijem bolesti i IPI. Najjača je korelacija s koncentracijom beta 2 mikroglobulina. Bolesnici s koncentracijama cfDNA iznad medijana imaju u univarijantnoj analizi lošije ishode liječenja od onih ispod medijana. U multivarijantnoj analizi se koncentracija cfDNA nije pokazala neovisnim prognostičkim čimbenikom. U bolesnika s HL, koncentracija cfDNA korelira s LDH, ali ne korelira s drugim čimbenicima niti s ishodom liječenja. Koncentracija cfDNA na kraju liječenja je niža od one na početku u skoro svih bolesnika, no ni apsolutni niti relativni pad koncentracije ne koreliraju s ishodom liječenja.

Određivanje koncentracije cfDNA u bolesnika s limfomima nije ni od dijagnostičkog niti od prognostičkog značenja.



## 9. SUMMARY

Extracellular circulating DNA (cfDNA) can be found in small quantities in plasma of healthy persons; higher concentrations are found in various disorders including malignant and autoimmune diseases, myocardial infarction, trauma, inflammation and complications of pregnancy. In patients with tumors, cfDNA is of tumor origin. Although it has been studied extensively in solid cancers, there is a dearth of information on cfDNA in hematologic neoplasia. The goal of this study was to determine the concentration of cfDNA in patients with lymphoma, its relation to demographic, biologic and clinical patient and tumor characteristics and to investigate its potential role as a marker of disease activity, prognosis or response to treatment. The study was performed in 129 patients with lymphoma treated according to standard guidelines. Median age was 56 years, range 17-87; 66% were male. Twenty-nine had Hodgkin's lymphoma (HL), 93 B-NHL, 66 aggressive and 27 indolent. Forty-seven patients had B-large cell lymphoma (B-LCL). Seven had T-NHL. cfDNA concentration was determined using quantitative real-time PCR before any and at the end of treatment.

cfDNA concentration is somewhat higher than in the general population (median 20.57 ng/ml vs. 12.1 ng/ml), but only 1/3 of patients had cfDNA concentrations above the highest normal values. We found no clear correlation between lymphoma type aggressivity and cfDNA concentration. In patients with NHL, cfDNA concentration correlated with unfavorable prognostic characteristics: age, LDH, beta 2 microglobulin concentration, disease stage and IPI. Correlation with beta 2 microglobulin was the strongest. In univariate analysis, patients with cfDNA concentrations above the median had worse treatment outcomes than those below the median. In multivariate analysis, cfDNA concentration was not an independent prognostic factor. In patients with HL, cfDNA concentration correlated with LDH, but neither with other tested parameters nor with treatment outcomes. At the end of treatment cfDNA concentrations were lower than at the beginning in the vast majority of patients but neither the absolute nor relative decline correlated with treatment outcomes.

Measuring cfDNA concentrations in lymphoma patients does not seem to be neither of diagnostic nor of prognostic value.

## 10. LITERATURA

1. Hodgkin T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Medico-Chirurgical Transactions-London*, 1832; 17:68-114.
2. Stein H, Mason DY, Gerdes J i sur. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 1985; 66:848-858.
3. Stein H, Gerdes J, Kirchner H, Schaadt M, Diehl V. Hodgkin and Sternberg-Reed cell antigen(s) detected by an antiserum to a cell line (L428) derived from Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1981; 28:425-429.
4. [www.cancerresearchuk.org](http://www.cancerresearchuk.org)
5. Nogova L, Reineke T, Brillant C i sur. Lymphocyte predominant and classical Hodgkin's lymphoma: a comprehensive analysis from the German Hodgkin study group. *J Clin Oncol* 2008; 26:434-439.
6. Connors JM. State-of-the-art therapeutics: Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; 23:6400-6408.
7. Diehl V, Engert A, Re D. New strategies for the treatment of advanced stage Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007; 21:897-914.
8. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification project. *Ann Oncol* 1998; 9:717-720.
9. Bosga-Bowuer AG, van der Berg A, Haralambieva E i sur. Molecular, cytogenetic and immunophenotypic characterisation of follicular lymphoma grade 3B. *Hum Pathol* 2006; 37:528-533.
10. Harris NL, Nadler LM, Bhan AK. Immunohistologic characterisation of two malignant lymphomas of germinal center type with monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1984; 117:262-272.
11. A clinical evaluation of the international lymphoma study group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The non-Hodgkin's Lymphoma classification project. *Blood* 1997; 89:3909-3918.
12. Camacho FL, Garcia JF, Cigudosa JC i sur. Aberrant Bcl6 protein expression in mantle cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2004; 28:1051-1056.

13. Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood* 1997; 89:2067-2078.
14. Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E i sur. Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy and prognostic factors. *Cancer* 1998; 82:567-575.
15. Campo E, Raffeld M, Jaffe ES. Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol* 1999; 36:115-127.
16. Swerdlow SH, Williams ME. From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathological and molecular review of 3 decades. *Hum Pathol* 2002; 33:7-20.
17. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL i sur. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC, Lyon 2008, 4. izdanje.
18. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphoma. The non-Hodgkin's Lymphoma classification project. *J Clin Oncol* 1998; 16:2780-2795.
19. Loddenkemper C, Anagnostopoulos I, Hummel M i sur. Differential Eμ enhancer activity and expression and BOB.1/OBF.1, Oct2, PU.1 and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas and Hodgkin lymphomas. *J Pathol* 2004; 202:60-69.
20. Harris NL, Jaffe ES, Stein H i sur. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International lymphoma study group. *Blood* 1994; 84:1361-1392.
21. Coiffier B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* 2007; 26: 3603-3613.
22. Gavrilina OA, Gabeeva NG, Morozova AK, Sidorova AA, Zvonkov EE. Role of high-dose chemotherapy and autologous blood stem cell transplantation in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Ter Arkh* 2013; 85-97.
23. McClure RF, Dewald GW, Hoyer JD i sur. Adult B-cell lymphomas with Burkitt-like morphology are phenotypically and genotypically heterogeneous with aggressive clinical behaviour. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:1652-1660.
24. Rudiger T, Jaffe ES, Delsol G. Workshop report on Hodgkin's disease and related diseases (grey-zone lymphoma). *Ann Oncol* 1998; 9 Suppl 5: S31-S38.
25. Murphy SB. Childhood non-Hodgkin's lymphoma. *N Eng J Med* 1978; 299:1446-1448.
26. Burkitt DP. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* 1958; 46:218-223.

27. Wright DH. Burkitt's lymphoma: a review. *Pathology annual*, ed. Appleton-Century-Crofts: New York, pp 337-363.
28. Haralambiva E, Boerma EJ, van Imhoff Gw i sur. Clinical, immunophenotypic and genetic analysis of adult lymphomas with morphological features of Burkitt lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2005; 29:1086-1094.
29. Leoncini L, Raphael M, Stein H, Harris NL, Jaffe ES, Kluin PM. Burkitt lmyphoma. U: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL i sur, ur. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4. izd. Lyon, 2008, str. 262-4.
30. Dujmović D, Aurer I, Radman I i sur. Addition of rituximab to high-dose methotrexate-based chemotherapy improves survival of adults with Burkitt lymphoma/leukemia. *Acta Haematol.* 2012; 127:115-117.
31. Hallek M, Cheson BD, Cytovsky D i sur. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; 111:5446-5468.
32. Owen Rg, Treon SP, al Katib A i sur. Clinicopathological definiton of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol* 2003; 30:110-115.
33. Nathwani BN, Anderson JR, Armitage JO i sur. Marginal zone B-cell lymphoma: A clinical comparison of nodal and mucosa-associtated lymphoid tissue. *J Clin Oncol* 1999; 17:2486-2492.
34. Issacson PG, Norton AJ. *Extranodal Lymphomas*. Churchill Livingstone, 1994.
35. Radere M, Streubel B, Wohrer S i sur. High relapse rate in patients with MALT lymphoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11:3349-3352.
36. Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Malant L i sur. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood* 1998; 91:2076-2084.
37. Falini B, Pileri S, Zinzani PL i sur. ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood* 1999; 93:3509-3515.
38. Gasocyne RD, Aoun P, Wu D i sur. Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lmyphoma. *Blood* 1999; 11:3913-3921.
39. Savage KJ, Harris NL, Vose JM i sur. ALK negative anaplastic large cell lymphoma (ALCL) is clinically and immunophenotypically different from both ALK positive ALCL and peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: report from the International peripheral T-cell lymphoma project. *Blood* 2008; 111:5496-5504.
40. Rizvi MA, Evans AM, Tallsman MS, Nelson BP, Rosen ST. T-cell Non Hodgkins lymhoma. *Blood* 2006; 107:1255-1264.

41. Cuadros M, Dave SS, Jaffe ES i sur. Identification of a proliferation signatute related to survival in nodal peripheral T-cell lymphomas. *J Clin Oncol* 2007; 25:3321-3329.
42. Lopez Guillermo A, Cid J, Salar A i sur. Peripheral T-cell lymphomas: initial features, natural history, and prognostic factors in a series of 174 patients. *Ann Oncol* 1998; 9:849-855.
43. Chan JK. Natural killer cell neoplasms. *Anat Pathol* 1998; 3:77-145.
44. Wright DH. Enteropathy associated T cell lymphoma. *Canc Surv* 1997; 30: 249-261.
45. Cooke CB, Krenacs L, Stetler-Stevenson M i sur. Hepatosplenic T-cell lymphoma: a distinct clinicopathologic entity of cytotoxic gamma delta T-cell origin. *Blood* 1996; 88:4265-4274.
46. Gormally E, Caboux E, Vinesi P, Hainut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of caricnogenesis: practical aspects and biological significance. *Mut Res* 2007; 635:105-117.
47. Kohler C, Radpour R, Barekati Z i sur. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitohondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer* 2009; 8:105-113.
48. Scharzenbach H, Alix-Panabieres C, Muller I i sur. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15:1032-1038.
49. Bremnes RM, Sirera R, Camps C. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood. *Lung Cancer* 2005; 49:1-12.
50. Mussolin L, Burnelli R, Pillon M i sur. Plasma cell-free DNA in paediatric lymphomas. *J Cancer* 2013; 4:323-329.
51. Hohaus S, Giachelia M, Massini G i sur. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol* 2009; 20:1408-1413.
52. 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.
53. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M i sur. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 2007; 109:1857-1861.
54. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P i sur. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004; 104:1258-1265.
55. Hoster E, Dreyling M, Klapper W i sur. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 2008; 111:558-565.

56. Zander T, Wiedenmann S, Wolf J. Prognostic factors in Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2002; 13:67-74.
57. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1998; 339:1506-1514.
58. <http://www.nlm.nih.gov/>
59. Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S i sur. Prognostic significance of Ki-67 associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwestern Oncology Group trial. *Blood* 1994; 83: 1460-1466.
60. Koster A, Tromp HA, Raemaekers JMM i sur. The prognostic significance of the intra-follicular tumor cell proliferative rate in follicular lymphoma. *Haematologica* 2007; 92:184-190.
61. Katzenberger T, Petzold C, Holler S i sur. The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma. *Blood* 2006; 107:3407.
62. Hall PA, Richards MA, Gregory WM i sur. Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by monoclonal antibody Ki-67. *Blood* 1988; 71:1157-1160.
63. Aurer I, Dominis M, Štern-Padovan R, Huić D, Šantek F. Dijagnostika i liječenje limfoma – hrvatski konsenzus. *Liječ Vjesn* 2007; 129:111-117.
64. Aurer I, Gašparov S, Kralik M i sur. Dijagnostika i liječenje limfoma – drugi hrvatski konsenzus. *Liječ Vjesn* 2013; 135:63-76.
65. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B i sur. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1999; 17:1244-1253.
66. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME i sur. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 2007; 25:579-586.
67. Gornik I, Wagner J, Gasparović V, Lauc G, Gornik O. Free serum DNA is an early predictor of severity in acute pancreatitis. *Clin Biochem.* 2009; 42:38-43.
68. Child JA. Kushwaha MRS. Serum beta-2 microglobulin in lymphoproliferative and myeloproliferative diseases. *Hematol Oncol* 1984; 2:391-401.

## **11. KRATKA BIOGRAFIJA**

Rođen sam 25. ožujka 1981. godine u Zagrebu, gdje sam i završio Prirodoslovno-matematičku gimnaziju. Medicinski fakultet u Zagrebu upisao sam 1999. godine, a diplomirao 2006. godine.

Po zavšetku pripravničkog staža u KBC Zagreb, Državni ispit sam položio 2007. godine.

Iste godine sam izabran u zvanje znanstvenog novaka te naknadno upisao doktorski studij iz Biomedicine i zdravstva pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

2012. godine sam započeo specijalističko usavršavanje iz hematologije.