

# Tekuća biopsija u limfomima

---

**Matošina, Ivana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:815749>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Ivana Matošina**

# **Tekuća biopsija u limfomima**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Marije Grdić Rajković.

*Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Mariji Grdić Rajković na suradnji, strpljenju i stručnom vodstvu tijekom izrade ovog rada.*

*Hvala mojoj obitelji i dragim prijateljima, a posebno tati, bratu i zaručniku, što su mi pružili bezuvjetnu podršku i studiranje učinili ljepšim i lakšim.*

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Limfomi</b> .....	1
1.1.1. Podjela limfoma.....	1
1.1.2. Epidemiologija.....	4
1.1.3. Klinička slika.....	4
<b>1.2. Tekuća biopsija</b> .....	5
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	7
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	8
<b>4. RASPRAVA</b> .....	9
<b>4.1. Patogeneza i etiologija limfoma</b> .....	9
4.1.1. Stečeni genski čimbenici .....	9
4.1.2. Nasljedni genski čimbenici.....	12
4.1.3. Čimbenici okoliša .....	12
<b>4.2. Dijagnoza i liječenje</b> .....	13
<b>4.3. Tekuća biopsija u limfomima – općenito</b> .....	16
4.3.1. Cirkulirajuće tumorske stanice (CTC).....	16
4.3.2 Cirkulirajuća tumorska DNA (engl. <i>circulating tumor DNA</i> , ctDNA).....	17
4.3.3. MikroRNA (miRNA).....	21
4.3.4. Duga nekodirajuća RNA (engl. <i>long non-coding RNA</i> , lncRNA).....	24
4.3.5. Egzosomi .....	24
<b>4.4. Difuzni B-velikostanični limfom (engl. <i>diffuse large B-cell lymphoma</i>, DLBCL)</b> ..	27
4.4.1. CtDNA u neinvazivnom genotipiziranju DLBCL-a.....	28
4.4.2. ctDNA kao početni prognostički biljeg u DLBCL-u.....	31
4.4.3. ctDNA kao biljeg odgovora na liječenje u DLBCL-u .....	32
4.4.4. ctDNA nakon terapije u DLBCL-u.....	33
4.4.5. CtDNA za praćenje klonalne evolucije u DLBCL-u .....	34
4.4.6. Epigenetske modifikacije cfDNA i potencijal u prognozi DLBCL-a.....	34
4.4.7. MiRNA u dijagnozi, prognozi i praćenju DLBCL-a .....	35
4.4.8. LncRNA u dijagnozi, prognozi i terapijskom praćenju DLBCL-a.....	37
4.4.9. Egzosomi u dijagnozi, prognozi i terapijskom praćenju DLBCL-a .....	38
<b>4.5. Primarni B-velikostanični limfom središnjeg živčanog sustava (engl. <i>primary central nervous system lymphoma</i>, PCNSL)</b> .....	39
4.5.1. CtDNA u likvoru i plazmi pacijenata s PCNSL-om.....	40

4.5.2. MiRNA u likvoru i serumu pacijenata s PCNSL-om .....	41
<b>4.6. Folikularni limfom (engl. <i>follicular lymphoma</i>, FL).....</b>	<b>42</b>
4.6.1. CtDNA i cfDNA u prognozi i praćenju terapije FL-a .....	43
4.6.2. CtDNA u predviđanju transformacije FL-a .....	44
4.6.3. CTC u FL-u .....	45
4.6.4. Egzosomi u praćenju terapijskog odgovora i transformacije FL-a.....	45
4.6.5. MiRNA kao potencijalni biljeg FL-a.....	46
<b>4.7. Limfom plaštenih stanica (engl. <i>mantle cell lymphoma</i>, MCL).....</b>	<b>46</b>
4.7.1. CtDNA u praćenju MRD-a i procjeni terapijskog odgovora kod MCL-a .....	47
<b>4.8. Limfom marginalne zone (engl. <i>marginal zone lymphoma</i>, MZL).....</b>	<b>48</b>
4.8.1. CtDNA u prognozi MZL-a i praćenju rezistencije na terapiju .....	48
<b>4.9. Burkittov limfom (engl. <i>Burkitt lymphoma</i>, BL).....</b>	<b>49</b>
4.9.1. Potreba za studijama o ctDNA u dijagnozi i praćenju liječenja BL-a .....	49
<b>4.10. Hodgkinov limfom (engl. <i>Hodgkin lymphoma</i>, HL) .....</b>	<b>50</b>
4.10.1. CtDNA u genotipizaciji i diferencijalnoj dijagnozi cHL-a.....	51
4.10.2 CtDNA u prognozi, paćenju MRD-a i odgovora na terapiju u cHL-u .....	52
4.10.3. MiRNA u praćenju odgovora na terapiju kod cHL-a .....	53
4.10.4. Egzosomi i mikrovezikule u praćenju cHL-a i odgovora na terapiju.....	53
<b>4.11. Zreli NK/T-stanični limfomi (engl. <i>NK/T-cell lymphomas</i>, NKTCL).....</b>	<b>54</b>
4.11.1. Ekstranodalni NK/T-stanični limfomi (engl. <i>extranodal NK/T-cell lymphomas</i> , ENKTCL) .....	54
4.11.1.1. CtDNA u prognozi ENKTCL-a .....	55
4.11.1.2. MiRNA u dijagnozi i prognozi ENKTCL-a.....	55
4.11.1.3. EBV miRNA u dijagnozi i prognozi ENKTCL-a .....	56
4.11.2. EBV DNA u praćenju MRD-a u EBV-pozitivnom NKTCL-u .....	56
4.11.3. Ostali zreli NK/T-stanični limfomi .....	57
4.11.3.1. CtDNA u dijagnozi, prognozi i praćenju terapije ostalih zrelih NKTCL-a ...	57
4.11.3.2. EBV DNA u prognozi ostalih zrelih NKTCL-a.....	58
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>59</b>
<b>6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA .....</b>	<b>61</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>67</b>
<b>8. SAŽETAK/SUMMARY .....</b>	<b>83</b>
8.1. Sažetak.....	83
8.2. Summary .....	84

# 1. UVOD

## 1.1. Limfomi

### 1.1.1. Podjela limfoma

Limfomi su heterogena skupina zloćudnih tumora limfocitne loze. Prezentiraju se kao čvrste tumorske mase koje prvenstveno zahvaćaju limfne organe (limfne čvorove, tonzile, slezenu, timus te limfno tkivo gastrointestinalnog sustava i drugih organa). Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) je 2022. godine objavila peto izdanje klasifikacije hematolimfoidnih tumora prema kojem se limfomi mogu svrstati u dvije glavne skupine: B-stanične i T/NK-stanične limfome. Daljnja klasifikacija temelji se na stadiju sazrijevanja, fenotipskim karakteristikama, histomorfološkim obilježjima, kliničkim informacijama i citogenetičkim ili molekularno-genetičkim nalazima. B-stanični limfomi dijele se u tri velike obitelji, a to su prekursori B-stanični tumori, zreli B-stanični tumori i Hodgkinov limfom, dok se T/NK-stanični limfomi dijele u prekursorske i zrele T/NK-stanične tumore. U svakoj obitelji nalazi se velik broj različitih entiteta/tipova i podtipova limfoma (Slika 1.). U ovu klasifikaciju, u nastojanju da se spriječi pretjerana dijagnoza limfoma i poboljša prepoznavanje kliničko-patološki različitih entiteta, po prvi puta su uključene ne-neoplastične bolesti koje oponašaju limfome ili su važne u diferencijalnoj dijagnozi. Ove bolesti svrstane su u dvije nove obitelji: tumoru slične lezije s B-staničnom i T-staničnom dominacijom (Alaggio i sur., 2022.; Li, 2022.). Hodgkinov limfom (engl. *Hodgkin lymphoma*, HL) je izdvojen u posebnu skupinu, a svi ostali nodalni i ektranodalni tumori T i B-limfocita nazivaju se ne-Hodgkinovi limfomi (engl. *non-Hodgkin lymphoma*, NHL). Limfomi i leukemije nerijetko se pojavljuju istovremeno ili prelaze iz jednog oblika u drugi. U tom slučaju razlika između limfoma i leukemije nije u potpunosti jasna te se takva bolest klasificira kao leukemija/limfom (Labar i sur., 2017.; McKenzie i sur., 2020.).

Prema SZO i kliničkom tijeku bolesti, svi zreli zloćudni tumori T i B-loze mogu se podijeliti u tri skupine: indolentne, agresivne i vrlo agresivne. Indolentni limfomi napreduju sporo i s njima bolesnik može živjeti godinama, čak i bez liječenja (npr. limfom malih limfocita, folikularni limfom, itd.). Nasuprot tome, agresivni i vrlo agresivni limfomi karakterizirani su brzim porastom tumorske mase. Kod agresivnih limfoma (npr. HL, difuzni B-velikostanični limfom, itd.) bolesnik umire u roku od nekoliko mjeseci, a kod vrlo agresivnih limfoma (Burkittov limfom) u roku nekoliko dana ili tjedana (Mugnaini i Ghosh, 2016; Labar i sur., 2017).

Prema mjestu najveće tumorske mase i pretpostavljenom mjestu nastanka mogu se podijeliti na nodalne i ektranodalne. U nodalnim limfomima tumor nastaje u limfnim čvorovima, a u ektranodalnim u ekstralimfatičkim i ekstramedularnim tkivima (npr. probavom sustavu, koži, adneksima oka, središnjem živčanom sustavu, krajnicima, plućima, kostima, glavi, vratu, itd.). Limfomi se mogu smatrati ektranodalnima ako se tijekom dijagnostičkog postupka utvrdi da nema zahvaćenosti limfnih čvorova ili se nađe minimalna zahvaćenost zajedno s klinički dominantnom ektranodalnom komponentom prema kojoj treba usmjeriti inicijalno liječenje (Labar i sur, 2017). Ako limfom zahvati koštanu srž i limfoidne stanice se nađu u perifernoj cirkulaciji, prisutna je leukemijska faza limfoma (McKenzie i sur., 2020). Otprilike 30% limfoma nastaje na mjestima koja nisu limfni čvorovi, slezena i koštana srž (Yang i sur., 2023).

B-stanične limfoidne proliferacije i limfomi	T/NK-stanične limfoidne proliferacije i limfomi
<b>Tumoru slične lezije s B-staničnom dominacijom</b>	<b>Tumoru slične lezije s T-staničnom dominacijom</b>
Reaktivne limfoidne proliferacije bogate B-stanicama koje mogu imitirati limfom	Kikuchi-Fujimoto bolest
Bolest povezana s imunoglobulinom G4 (IgG4)	Indolentna T-limfoblastična proliferacija
Unicentrična Castlemanova bolest	Autoimuni limfoproliferativni sindrom
Idiopatska multicentrična Castlemanova bolest	
Multicentrična Castlemanova bolest povezana s KSHV/HHV8	
<b>Prekursori B-stanični tumori</b>	<b>Prekursori T/NK-stanični tumori</b>
B-limfoblastična leukemija/limfom	T-limfoblastična leukemija/limfom, bez posebnih obilježja
<ul style="list-style-type: none"> <li>Bez posebnih obilježja</li> <li>S visokom hiperdiploidijom</li> <li>S hipodiploidijom</li> <li>S iAMP21</li> <li>S BCR::ABL1 fuzijom</li> <li>S obilježjima sličnim BCR::ABL1</li> <li>S KMT2A preuređenjem</li> <li>S ETV6::RUNX1 fuzijom</li> <li>S obilježjima sličnim ETV6::RUNX1</li> <li>S TCF3::PBX1 fuzijom</li> <li>S IGH::IL3 fuzijom</li> <li>S TCF3::HLF fuzijom</li> <li>S drugim definiranim genskim poremećajima</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>T-limfoblastična leukemija/limfom</li> <li>Rana prekursora T-limfoblastična leukemija/limfom</li> </ul>
<b>Zreli B-stanični tumori</b>	<b>Zreli T/NK-stanični tumori</b>
Preneoplastične i neoplastične male limfocitne proliferacije	Zrele T/NK-stanične leukemije
<ul style="list-style-type: none"> <li>Kronična limfocitna leukemija/limfom malih limfocita</li> <li>Monoklonska B-stanična limfocitoza</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>T-prolimfocitna leukemija</li> <li>T-velika granularna limfocitna leukemija NK-velika granularna limfocitna leukemija</li> <li>T-stanična leukemija/limfom odraslih</li> <li>Sezaryjev sindrom</li> <li>Agresivna NK-stanična leukemija</li> </ul>
Splenični B-stanični limfomi i leukemije	Primarni kožni T-stanični limfomi
<ul style="list-style-type: none"> <li>Leukemija vlastitih stanica</li> <li>Splenični limfom marginalne zone</li> <li>Diffuzni limfom malih B-stanica crvene pulpe</li> <li>B-stanični limfom/leukemija slezene s izraženim nukleolima</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Primarna kožna CD4-pozitivna limfoproliferativna bolest malih ili srednjih T-stanica</li> <li>Primarna kožna akralna CD8-pozitivna limfoproliferativna bolest</li> <li>Mycosis fungoides</li> <li>Primarna kožna CD30-pozitivna T-stanična limfoproliferativna bolest: Limfomatoidna papuloza</li> <li>Primarna kožna CD30-pozitivna T-stanična limfoproliferativna bolest: Primarni kožni anaplastični velikostanični limfom</li> <li>Supkutani pankulitisu sličan T-stanični limfom</li> <li>Primarni kožni gama-delta T stanični limfom</li> <li>Primarni kožni CD8-pozitivan agresivni epidermotropni citotoksični T-stanični limfom</li> <li>Primarni kožni periferni T-stanični limfom, bez posebnih obilježja</li> </ul>
Limfoplazmatoidni limfom	Intestinalne T/NK-stanične limfoidne proliferacije i limfomi
Limfom marginalne zone	<ul style="list-style-type: none"> <li>Indolentni T-stanični limfom gastrointestinalnog trakta</li> <li>Indolentni limfoproliferativni poremećaj NK-stanica gastrointestinalnog trakta</li> <li>Enteropatski T-stanični limfom</li> <li>Monomorfni epitelotropni intestinalni T-stanični limfom</li> <li>Intestinalni T-stanični limfom, bez posebnih obilježja</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Ekstranodalni limfom marginalne zone limfnog tkiva vezanog za sluznice (MALTom)</li> <li>Primarni kožni limfom marginalne zone</li> <li>Nodalni limfom marginalne zone</li> <li>Pedijatrijski limfom marginalne zone</li> </ul>	Hepatosplenični T-stanični limfom
Folikularni limfom	Anaplastični velikostanični limfom
<ul style="list-style-type: none"> <li>In situ folikularna B-stanična neoplazma</li> <li>Folikularni limfom</li> <li>Pedijatrijski folikularni limfom</li> <li>Duodenalni folikularni limfom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ALK-pozitivni</li> <li>ALK-negativni</li> <li>Anaplastični velikostanični limfom povezan s implantatima grudi</li> </ul>
Kožni limfom stanica centra folikla	Nodalni limfom T-folikularnih pomagačkih (TFH) stanica
Primarni kožni limfom stanica centra folikla	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nodalni TFH stanični limfom, angioimunoblastičnog tipa</li> <li>Nodalni TFH stanični limfom, folikularnog tipa</li> <li>Nodalni TFH stanični limfom, bez posebnih obilježja</li> </ul>
Limfom plaštenih stanica	Ostali periferni T-stanični limfomi
<ul style="list-style-type: none"> <li>Neoplazma plaštenih stanica in situ</li> <li>Limfom plaštenih stanica</li> <li>Leukemijski nenodalni limfom plaštenih stanica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Periferni T-stanični limfom, bez posebnih obilježja</li> </ul>
Transformacije indolentnih B-staničnih limfoma	EBV-pozitivni T/NK-stanični limfomi
B-velikostanični limfomi	<ul style="list-style-type: none"> <li>EBV-pozitivni nodalni T/NK-stanični limfom</li> <li>Ekstranodalni NK/T-stanični limfomi</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Diffuzni B-velikostanični limfom, bez posebnih obilježja</li> <li>B-velikostanični limfom bogat limfocitima T/histiocitima</li> <li>Diffuzni B-velikostanični limfom/visoko stupanjski B-stanični limfom s MYC i BCL2 preuređenjima</li> <li>ALK-pozitivni B-velikostanični limfom</li> <li>B-velikostanični limfom s IRF4 preuređenjem</li> <li>Visoko stupanjski B-velikostanični limfom s 11q aberacijama</li> <li>Limfomatoidna granulomatoza</li> <li>EBV pozitivni difuzni B-velikostanični limfom</li> <li>Diffuzni B-velikostanični limfom povezan s kroničnom upalom</li> <li>B-velikostanični limfom povezan s fibrinom</li> <li>B-velikostanični limfom povezan s preopterećenjem tekućinom</li> <li>Plazmablastični limfom</li> <li>B-velikostanični limfom imunološki privilegiranih sijela</li> <li>Primarni kožni difuzni B-velikostanični limfom nožnog tipa</li> <li>Intravaskularni B-velikostanični limfom</li> <li>Primarni medijastinalni (timički) B-velikostanični limfom</li> <li>Medijastinalni limfom sine zone</li> <li>B-stanični limfom visokog stupnja, bez posebnih obilježja</li> </ul>	EBV-pozitivne T/NK-stanične limfoidne proliferacije i limfomi u dječjoj dobi
Burkittov limfom	<ul style="list-style-type: none"> <li>Teška alergija na ubode komaraca</li> <li>Hydroa vacciniforme limfoproliferativna bolest</li> <li>Sistemska kronično aktivna EBV bolest</li> <li>Sustavna EBV-pozitivna dječja T-stanična limfoproliferativna bolest</li> </ul>
B-stanične limfoidne proliferacije i limfomi povezani s KSHV/HHV8	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Primarni efuzijski limfom</li> <li>KSHV/HHV-pozitivan difuzni B-velikostanični limfom</li> <li>KSHV/HHV-pozitivan germinotropni limfoproliferativni poremećaj</li> </ul>	
Limfoidne proliferacije i limfomi povezani s imunodeficiencijom i disregulacijom	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Hiperplazije koje nastaju uslijed imunodeficiencije ili disregulacije</li> <li>Polimorfne limfoproliferativne bolesti koje nastaju uslijed imunodeficiencije ili disregulacije</li> <li>EBV-pozitivni mukokutani ulkus</li> <li>Limfomi koji nastaju uslijed imunodeficiencije ili disregulacije</li> <li>Limfoidne proliferacije i limfomi povezani s urođenim pogreškama imuniteta</li> </ul>	
<b>Hodgkinov limfom</b>	
Klasični Hodgkinov limfom	
Nodularna limfocitna predominacija	
<b>Neoplazme plazma stanica i druge bolesti s paraproteinima</b>	
Monoklonske gamopatije	
Bolesti s taloženjem monoklonskih imunoglobulina	
Bolest teških lanaca	
Neoplazme plazma stanica	

**Slika 1.** Podjela zloćudnih tumora limfocita prema SZO-u (preuzeto i prilagođeno prema Alaggio i sur., 2022.)



### 1.1.2. Epidemiologija

U 2022. godini, NHL je bio deseti po redu najčešći oblik karcinoma u svijetu (<https://gco.iarc.who.int/today>). Prema podacima Hrvatskog registra za rak, u Hrvatskoj je 2021. godine na 100.000 stanovnika bilo 16,91 novooboljelih s NHL-om, 2,55 novooboljelih s HL i 7,76 s limfatičnim leukemijama. Najveću stopu incidencije imaju ne-folikularni limfomi, od kojih je najučestaliji difuzni B-velikostanični limfomi (engl. *diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL), a najmanju ostale i nespecificirane vrste NHL-a ([www.hzjz.hr](http://www.hzjz.hr)). Limfomi su češći u muškaraca nego u žena. Prema podacima Europske komisije, 2022. godine je u 27 država članica Europske Unije na 100.000 stanovnika bilo 24 novooboljelih muškaraca i 15,4 novooboljelih žena s NHL-om te 3,3 novooboljelih muškarca i 2,2 žene s HL-om. Učestalost limfoma je u porastu te se procjenjuje da će u razdoblju od 2022. do 2040. godine stopa incidencije NHL-a u 27 država članica Europske Unije porasti za 18,9%, a HL-a za 2,6% (<https://ecis.jrc.ec.europa.eu>). To je posljedica bolje dijagnostike i liječenja limfoma, rasta i starenja stanovništva, onečišćenja okoliša te povećanja broja ljudi s kroničnim infekcijama (npr. Epstein-Barrov virus, *Helicobacter pylori*) i imunosupresivnim terapijama (Cai i sur., 2021.).

### 1.1.3. Klinička slika

Nodalni limfomi najčešće se manifestiraju palpabilnom limfadenopatijom, obično na vratu, a manje na preponama i pazusima. Limfni čvorovi su veći od 1 cm u promjeru, tvrdi, fiksirani i bezbolni. Limfadenopatija nije dovoljno osjetljiv i specifičan pokazatelj bolesti i u većini slučajeva ima benignu etiologiju (Paquin i sur., 2023.).

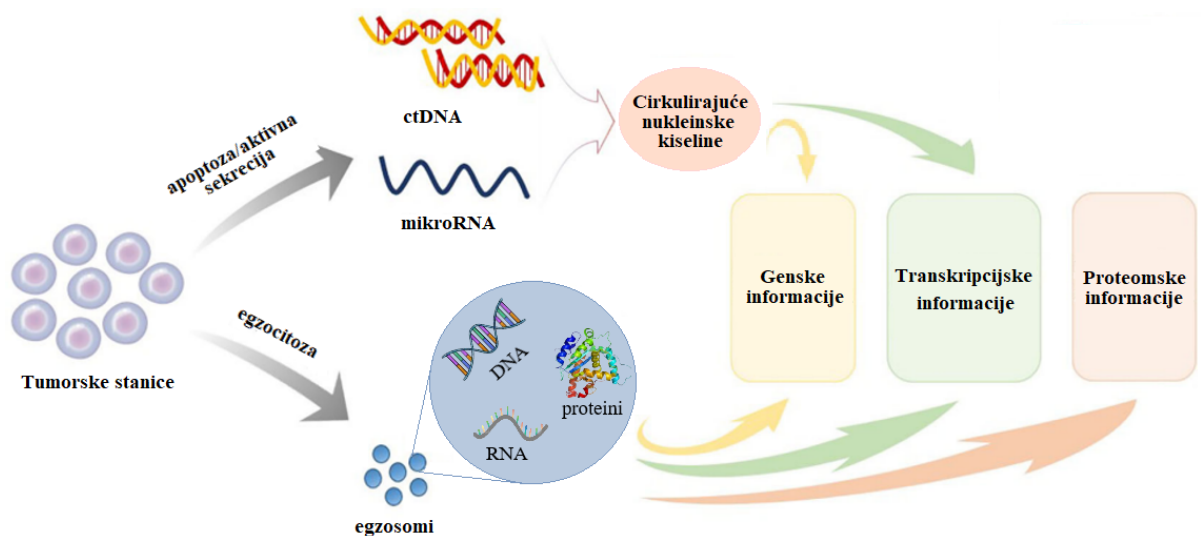
Ekstranodalni limfomi prezentiraju se kao tumori ekstralimfatičkih organa. Uobičajena mjesta ekstranodalnih limfoma uključuju gastrointestinalni sustav (GIS), glavu i vrat, kožu i meko tkivo te središnji živčani sustav (SŽS) pa se mogu prezentirati simptomima GIS-a, SŽS-a, kožnim simptomima i drugim simptomima specifičnim za organ (Yang i sur., 2023.).

Leukemijska faza limfoma može se prezentirati limfocitozom te prisutnosti limfoblasta u perifernoj krvi i koštanoj srži. Agresivne leukemije mogu se manifestirati samo blagim povećanjem broja leukocita, dok su neki indolentni oblici često popraćeni dramatičnom leukocitozom (Grigoropoulos i sur., 2013.).

Najteža posljedica zloćudnih novotvorina je zatajenje hematopoeze. Kako se populacija neoplastičnih limfocita povećava, broj normalnih stanica se smanjuje što rezultira citopenijom (anemija, trombocitopenija i granulocitopenija). Ako se neoplazma ne liječi, povećava se sklonost infekcijama kao posljedica granulocitopenije ili krvarenjima kao posljedica trombocitopenije. Otpuštanjem citokina iz tumora i stanica imunskog sustava koje reagiraju na tumor javljaju se opći simptomi, a to su svrbež, umor, slabost, gubitak težine, vrućica i noćno znojenje (Paquin i sur., 2023; McKenzie i sur., 2020.). Opći simptomi koji su važni u dijagnostici i klasifikaciji proširenosti limfoma su: svrbež uz ekzorijacije, izraženi gubitak na težini više od 10% u posljednjih 6 mjeseci (uz normalan unos hrane), vrućica viša od 38,5°C bez infekcije te intenzivno noćno znojenje (Labar i sur., 2017.).

## 1.2. Tekuća biopsija

Tekuća biopsija je neinvazivna metoda kojom se iz biološkog materijala (krv, urin, likvor, i dr.) izoliraju cirkulirajuće tumorske stanice (CTC, engl. *circulating tumour cells*), slobodna cirkulirajuća DNA (cfDNA, engl. *cell-free DNA*), egzosomi ili različite vrste cirkulirajuće RNA, kao što su mikroRNA (miRNA) i duga nekodirajuća RNA (engl. *long non-coding RNA*, lncRNA) (Siravegna i sur., 2017.; Periša i sur., 2017.). Navedeni elementi otpuštaju se u cirkulaciju iz tumorskog tkiva, a njihovim otkrivanjem te genomskim i proteomskim profiliranjem dobiva se informacija o molekulskim događajima u tumorima (mutacije DNA, varijacije broja kopija, kromosomska preraspodjela, epigenetske promjene, itd.) pružajući tako više detalja o karakteristikama tumora kao što su podtip, progresija, stadij, heterogenost, odgovor na terapiju i ostalo (Siravegna i sur., 2017.; Lone i sur., 2022.).



Slika 2. Značaj tekuće biopsije u limfomima (preuzeto i prilagođeno prema Lv i Liu, 2021.)

Tekuća biopsija je manje invazivna u odnosu na tkivnu biopsiju. Tkivna biopsija zahtijeva kirurški zahvat (često i pod općom anestezijom) za uzimanje bioptata tkiva i često dolazi do poteškoća u dobivanju dovoljne količine uzorka. Stoga je tekuća biopsija puno ugodnija za pacijente i ima manji rizik od komplikacija tijekom postupka, posebice za one pacijente kod kojih je teško doći do tumorskog tkiva ili koji nisu u stanju podnijeti kirurške zahvate. Osim toga, tekuća biopsija je jednostavnija i pouzdanija, pacijenti se brže oporavljaju, lako se ponavlja, a troškovi postupka su manji (Connal i sur., 2023).

Genetski sastav karcinoma vrlo je heterogen i molekularni profil dinamički se mijenja tijekom vremena. Terapijsko liječenje, osobito ciljanim lijekovima, također može modificirati molekularni profil tumora. Nadalje, metastatski solidni tumori su heterogeni te uzorkovanje različitih dijelova tumora i različitih mjesta bolesti može dati različit genomski profil. Jedna aspiracija iglom tijekom tkivne biopsije teško može prikupiti sve vrste tumorskih stanica, a ponekad je potrebna i ponovna aspiracija. (Periša i sur., 2017.; Siravegna i sur., 2017). Smatra se da bi tekuća biopsija mogla ponuditi bolju karakterizaciju heterogenosti tumora i njegove evolucije od tkivne biopsije. Ove prednosti čine tekuću biopsiju vrijednim alatom u modernoj onkologiji, posebno za kontinuirano praćenje i personalizirano liječenje pacijenata s karcinomom (Poulet i sur., 2019.).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Limfomi predstavljaju heterogenu skupinu malignih bolesti limfocitne loze koji se prema SZO mogu svrstati u dvije glavne skupine: B-stanične i T/NK-stanične limfome. Svaka skupina sadrži nekoliko obitelji, entiteta/tipova i podtipova bolesti. Postoji preko 50 različitih podtipova limfoma od kojih svaki ima svoje histološke, genske, imunološke i kliničke karakteristike te zahtjeva drugačiji pristup liječenju. Takva heterogenost komplicira dijagnostiku limfoma i odabir prikladne terapije što posljedično može dovesti do krivog liječenja, komplikacije i prolongacije bolesti, a u nekim slučajevima i smrtnog ishoda. Simptomi bolesti uglavnom su izrazito nespecifični (povećani limfni čvorovi, svrbež, umor, slabost, gubitak težine, vrućica i znojenje) te se vrlo lako mogu zamijeniti s drugim hematološkim ili nehematološkim bolestima što otežava ranu i točnu dijagnozu i povećava rizik od komplikacija i smrtnog ishoda bolesti. Nadalje, standardne dijagnostičke metode uključuju vrlo invazivne i tehnički izazovne biopsije tkiva te histopatološku i imunohistokemijsku analizu koje zahtijevaju specijalizirano znanje i visoku razinu stručnosti. Tekuća biopsija predstavlja jednostavnu, inovativnu i minimalno invazivnu metodu uzimanja periferne krvi za detekciju i analizu CTC-a, cfDNA, miRNA i egzosoma, koje su odraz molekulskih događaja u tumorskim stanicama i tkivima. Ova tehnologija zbog svoje minimalne invazivnosti, bolje karakterizacije heterogenosti tumora, dinamičkom praćenju tumorskih biljega tijekom vremena i prikladnosti za različite skupine pacijenata ima značajan potencijal u dijagnostici, praćenju i liječenju limfoma u usporedbi s tradicionalnim metodama tkivne biopsije.

Cilj ovog diplomskog rada je na temelju znanstvene i stručne literature dati pregled o primjeni tekuće biopsije kod bolesnika s limfomima, odnosno istražiti mogućnosti primjene tekuće biopsije u dijagnozi, prognozi i liječenju limfoma. Kritički će se raspraviti i o prednostima i nedostacima tekuće biopsije u limfomima te će se razmotriti izazovi koji moraju biti riješeni prije njezine integracije u rutinsku kliničku praksu.

### 3. MATERIJALI I METODE

Istraživanje u okviru ovog diplomskog rada je teorijskog karaktera i uključuje pregled dostupne znanstvene i stručne literature o predloženoj temi. Pritom su korištene stručne knjige iz područja patofiziologije i dijagnostike hematoloških bolesti koje daju pregled o limfomima te je pregledan velik broj članaka objavljenih u stručnim i znanstvenim časopisima od 2010. do 2024. godine. Pri pretraživanju članaka na temu primjene tekuće biopsije u limfomima, literaturni izvori ograničeni su na one objavljene u zadnjih 5 godina. Znanstveni članci pronađeni su online u bibliografskim bazama podataka PubMed, Science Direct, BMC Journals i Hrčak. Pretraživanje literature provedeno je po ključnim riječima: *lymphoma*, *lymphoma diagnosis*, *liquid biopsy*, *circulating tumor DNA*, *microRNA*, *exosomes*, *circulating tumor cells*, *liquid biopsy in lymphoma*, *liquid biopsy in non-Hodgkin lymphoma*, *liquid biopsy in Hodgkin lymphoma*, *diffuse Large B-cell Lymphoma*, *follicular lymphoma*, *mantle cell lymphoma*, *Hodgkin lymphoma*, *primary CNS lymphoma*, *Burkitt lymphoma*, *NK/T-cell lymphomas*, itd. Najnoviji epidemiološki podatci pronađeni su na mrežnim stranicama Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, Međunarodne agencije za istraživanje raka i Europske komisije. Literatura je obrađivana od općih prema specijaliziranim člancima, s težištem na one vrste limfoma koji su najzastupljeniji i najviše istraženi u literaturi.

## 4. RASPRAVA

### 4.1. Patogeneza i etiologija limfoma

Klonalnom proliferacijom B i T-stanica limfocita te stanica prirodnih ubojica (engl. *natural killer cells*, NK stanice) u različitim stadijima njihovog sazrijevanja nastaju nezrele (prekursorske) i zrele limfoidne neoplazme. Takve neoplazme mogu nastati zbog stečenih genskih, nasljednih genskih i okolišnih čimbenika (McKenzie i sur., 2022.).

#### 4.1.1. Stečeni genski čimbenici

Do danas je većina podtipova B i T-staničnih limfoma okarakterizirana na genomskoj razini (Elenitoba-Johnson i Lim, 2018.). Promjene genotipa uključuju kromosomske translokacije, promjene broja kromosoma te točkaste mutacije u onkogenima ili tumor supresorskim genima koje dovode do deregulacije unutarstaničnih signalnih putova uključenih u ontogenezu i sazrijevanje B i T-limfocita, kao što su signali putovi B i T-staničnih receptora (engl. *B-cell receptor*, BCR; engl. *T-cell receptor*, TCR), nuklearni faktor kappa B (NF- $\kappa$ B), JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR i ostali signalni putovi (Panda i sur., 2022.). Osim toga, u nekim vrstama limfoma detektirane su mutacije gena regulatora epigenetike. Ti geni kodiraju proteine i enzime koji reguliraju metilaciju i acetilaciju DNA i histona, a genskim profiliranjem limfoma najviše mutacija otkriveno je u DNMT, TET, KMT2, DOT2L, EZH2, LSD, PRMT, CREBBP, EP300 i HDAC6 genima. Takve mutacije dovode do abnormalne metilacije DNA i histona te acetilacije histona u limfomima što je povezano s različitim malignim transkripcijskim fenotipovima (Liu i sur., 2022.; Tan i sur., 2024.). Patofiziologija pojedinih tipova limfoma ima dosta razlika, ali i sličnosti.

HL se prepoznaje po karakterističnim multinuklearnim Reed-Sternbergovim stanicama (RS) ili mononuklearnim Hodgkinovim stanicama (HSt). Riječ je o klonalnim zrelim B-limfocitima koji su izbjegli negativnu selekciju unutar germinativnog centra limfnog čvora. Za vrijeme selekcijskog procesa u preustroju gena za imunoglobuline dolazi do somatske mutacije. Limfociti koji sadrže povoljne mutacije izražavaju BCL2 gen (engl. *B-cell lymphoma 2*) koji inhibira apoptozu. Upravo ovi B-limfociti pokazuju klonalnu ekspanziju nakupljanjem dodatnih mutacija koje povećavaju afinitet za njihovo protutijelo. Smatra se da je za

proliferaciju RS i HSt stanica ključna aktivacija signalnog transkripcijskog puta NF- $\kappa$ B. Njegova konstitutivna aktivacija održava visoku ekspresiju BCL2 proteina (Jardin, 2022). Istraživanja klasičnog HL-a otkrila su rekurentne somatske mutacije u komponentama NF- $\kappa$ B puta (TNFAIP3, NFKBIA, NFKBIA, REL) i JAK/STAT puta (SOCS1, PTPN1, STAT6, STAT3, CSF2RB) (Sánchez-Beato i sur., 2024.).

NHL mogu nastati zbog mutacija u gotovo svakoj fazi diferencijacije limfocita. Značajka određenih podtipova zrelih B-staničnih limfoma je kromosomska translokacija u kojima se različiti protoonkogeni (npr. BCL2, BCL6, c-Myc, MALT1, CCND1) postavljaju uz promotor IGH lokusa kromosoma 14q32, što rezultira prekomjernom ekspresijom proteina koje kodiraju (npr. Bcl2, Bcl6, ciklin D1, itd.). Rezultat takvih događaja je blokiranje diferencijacije, sprječavanje apoptoze i/ili poticanje proliferacije B-stanica limfocita što u konačnici dovodi do maligne transformacije B-stanice u tumorsku stanicu (Kos i sur., 2021; McKenzie i sur., 2020). Nedavna istraživanja mutacijskih događaja u B-stanicama tijekom somatske hipermutacije i promjene klase imunoglobulina pokazala su da aberantna aktivnost aktivacijom inducirane citidin deaminaze (engl. *activation induced cytidine deaminase*, AID) daje predispoziciju za razvoj mutacija i kromosomskih aberacija koje se nalaze u mnogim B-staničnim limfomima (Rifai i sur., 2023). Brojne genske mutacije i aberacije uključene su u patogenezi zrelih B-staničnih limfoma, a neke od njih izdvojene su u tablici 1.

U zrelim T-staničnim limfomima kromosomske translokacije javljaju se samo u anaplastičnom velikostaničnom limfomu (gen ALK) i T-prolimfocitnoj leukemiji (gen TCL1). Ostale onkogene promjene su točkaste mutacije (najčešće insercije i delecije) te varijacije u broju kopija. T-stanični limfomi često nose mutacije koje dovode do konstitutivne aktivacije signalnih putova T-staničnog receptora, kostimulacijskih proteina i citokinskih receptora, pospješujući tako staničnu proliferaciju i preživljavanje. Deregulirana signalizacija JAK/STAT puta sveprisutan je događaj u T-staničnim limfomima (Arnam i sur., 2018).

Najčešći genetski poremećaji povezani s prekursorskim (nezrelim) tumorima su translokacije, hipodiploidija i visoka hiperdiploidija. Primjeri aberacija u B-limfoblastičnoj leukemiji/limfomu navedeni su na slici 1. U T-limfoblastičnoj leukemiji/limfomu molekularni događaji uključuju mutacije u genu NOTCH1 i aktivaciju regulatornih gena HOX preko kromosomskih preuređenja u kojima se ciljni onkogen dovodi u blizinu pobuđivača TCR-a što dovodi do aberantne ekspresije T-staničnog klona (Luca, 2021.).

Tablica 1. Genske mutacije i aberacije u zrelim B-staničnim limfomima (preuzeto i prilagođeno prema Sánchez-Beato i sur., 2024.)

B-stanični limfom	Genetske mutacije i aberacije
DLBCL bez posebnih obilježja	NOTCH2, BCL10, TNFAIP3, UBE2A, CD70, CCND3, DTX1, BCL2, EZH2, CREBBP, TNFRSF14, KMT2D, IRF8, EP300, GNA13, MYD88, CD79B, PIM1, PIM2, PRDM1, BTG1, CD58, NOTCH1, SGK1, SOCS1, TET2, STAT3, TP53; MYC preuređenje, BCL2, BCL6
Folikularni limfom (engl. <i>follicular lymphoma</i> , FL)	T(14;18); KMT2D, EZH2, CREBBP, EP300, MEF2B, ARID1A, FOXO1, CARD11, NOTCH2, DTX1, UBE2A, HIST1H1E, MYC, TP53, CCND3, GNA13, S1PR2, P2RY8, POU2AF1
Limfom marginalne zone (engl. <i>marginal zone lymphoma</i> , MZL)	Splenični: KLF2, NOTCH2, TP53, NOTCH1, MLL2, ARID1A, SIN3A, TNFAIP3, MYD88, CARD11, trisomije 3, 18, Del(7q) Nodalni: KLF2, NOTCH2, KMT2D, PTPRP, trisomije 3, 18, 7, 12 Ekstranodalni: trisomije 3, 18, 12, T(11;18), T(1;14), T(3;14), T(14;18) (IGH-MALT1); TNFAIP3, CD79A, CD79B, CARD11, BIRC3, TRAF3, TNFRSF11A
Limfom plaštenih stanica (engl. <i>mantle cell lymphoma</i> , MCL)	T(11;14), CCND2 i CCND3 preuređenje, IGVH aberantna somatska hipermutacija, Del(17p)/TP53, ATM, NOTCH1/2, KMT2D
Burkittov limfom (engl. <i>Burkitt lymphoma</i> , BL)	EBV-pozitivan: MYC preuređenje, MYC aberantna somatska hipermutacija, CDKN2A, DDX3X, TP53 EBV-negativan: MYC preuređenje, TCF3, ID3, CDKN2A, DDX3X, TP53
Limfoplazmocitoidni limfom	MYD88 (L265P), CXCR4



### 4.1.2. Nasljedni genski čimbenici

Nasljedni sindromi imunodeficijencije povezani su s povećanom učestalošću limfoma, uključujući ataksiju telangiektaziju, Wiskott-Aldrichov sindrom, tešku kombiniranu imunodeficijenciju (SCID), X-vezani limfoproliferativni poremećaj i autoimuni limfoproliferativni sindrom (ALPS) (McKenzie i sur., 2020.). Također, neki podtipovi limfoma češće su povezani s određenim autoimunim bolestima (npr. osobe s reumatoidnim artritisom i Sjörgenovim sindromom imaju povećan rizik od DLBCL-a) (Khanmohammadi i sur. 2020).

### 4.1.3. Čimbenici okoliša

Virusne i bakterijske infekcije mogu igrati ulogu u nastanku limfoma (McKenzie i sur., 2020.). Epstein – Barrov virus (EBV) inficira B-limfocite gdje ostaje latentan pod kontrolom imunološkog sustava. Reaktivacija EBV-a dovodi do transformacije i besmrtnost B-limfocita (Frontzek i sur., 2023.). Drugi infektivni agens povezan s razvojem NHL-a je *Helicobacter pylori*. Pojedinci s kroničnom upalom želuca uzrokovanom *H. pylori* imaju visoku incidenciju gastričnog tipa ektranodalnog limfoma marginalne zone limfnog tkiva vezanog uz sluznice (engl. *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma*, MALT). Kronična upala uzrokuje proliferaciju T i B-stanica limfocita zbog prezentacije antigena. Maligna transformacija događa se u malom postotku B-stanica i rezultira limfomom, a čini se da je maligni proces u velikoj mjeri potaknut kroničnom infekcijom *H. pylori* jer njezina eradikacija uzrokuje regresiju limfoma u većini slučajeva (McKenzie i sur., 2020.; Park i Koo, 2014). Ostale virusne infekcije povezane s limfomima su humani T-limfotropni virus tipa 1 (HTLV-1), humani herpes virus 8 (HHV-8), virus humane imunodeficijencije (HIV) i hepatitis C virus (HCV) (Tablica 2.) (Thandra i sur., 2021.).

Tablica 2. NHL povezani s infekcijama (preuzeto i prilagođeno prema Thandra i sur., 2021.)

INFEKCIJA	TIP LIMFOMA
EBV	BL
HIV	DLCBL, primarni B-velikostanični limfom SŽS-a
HTLV-1	DLBCL
HHV-8	Primarni efuzijski limfom
HCV	DLBCL, splenični MZL
<i>H. pylori</i>	MALT

Nastanak i razvoj limfoma povezan je i s neravnotežom epigenetske regulacije. Najčešće epigenetske modifikacije su modifikacije histona i metilacija DNA na petom ugljikovom atomu citozinskih ostataka u citozin-gvanin dinukleotidima (CpG). Metilacija DNA i deacetilacija histona rezultiraju gustim konformacijama kromatina, što dovodi do utišavanja transkripcije gena. Nasuprot tome, demetilacija DNA i acetilacija histona dovode do rahle konformacije kromatina i aktivne transkripcije gena. Epigenetski čimbenici mogu dovesti do abnormalne regulacije transkripcije gena i signalnih putova (npr. signalnih putova tumor supresorskih gena) što naposljetku može potaknuti tumorigenezu (Liu i sur., 2022.; Tan i sur., 2024.).

## 4.2. Dijagnoza i liječenje

Ciljevi dijagnostičke obrade bolesnika su postavljanje dijagnoze, određivanje proširenosti bolesti (engl. *staging*) te procjena prognoze, aktivnost bolesti i prikladnosti terapije.

Prvi korak u dijagnostici limfadenopatija je citološka punkcija povećanih limfnih čvorova. Ukoliko nalaz citološke punkcije upućuje na limfom, potrebno je učiniti biopsiju jer se dijagnoza ne može postaviti isključivo na temelju citomorfoloških karakteristika stanica (Labar i sur., 2017.). Ekscizijska biopsija (EB) limfnog čvora smatra se zlatnim standardom za dijagnosticiranje malignih limfoma. EB-om se dobiva dovoljna količina uzoraka tkiva za patohistološku analizu, koja uključuje fiksaciju tkiva u formalinu, ugrađivanje u parafin, bojanje hematoksilinom i eozinom, G-pruganje kromosoma, fluorescentnu in situ hibridizaciju (engl. *fluorescence in situ hybridisation*, FISH) i molekularne genetičke testove (RT-PCR,

NGS, mikročip tehnologija) (Hastings i sur., 2016.; Ito i sur., 2021.). Dijagnostičke smjernice SZO-a za maligne limfome i smjernice kliničke prakse preporučuju EB kao primarnu metodu za dijagnostiku limfoma. Ukoliko EB nije preporučljiva (npr. ako postoji povećan rizik za komplikacije ili pogoršanja stanja pacijenta zbog invazivnosti), može se koristiti i biopsija širokom iglom (tzv. core biopsija) koja je manje invazivna. Ovisno o kliničkoj slici, biopsiju treba provesti i na drugim organima za koje se sumnja da su zahvaćeni bolešću (Ito i sur., 2021.).

Nakon potvrde dijagnoze limfoma biopsijom tkiva, daljnja evaluacija uključuje određivanje proširenosti bolesti slikovnim tehnikama. Stupanj proširenosti za HL i NHL određuje se prema modificiranoj Ann Arborskoj klasifikaciji (Tablica 3.) (Jamil i Mukkamalla, 2024.). Ultrazvuk može pomoći u ispravnom prepoznavanju malignog limfnog čvora parenhimskih organa trbuha i zdjelice, ali uglavnom se koristi za navođenje tijekom punkcije i biopsije (Aurer i sur., 2013.). Kompjutorizirana tomografija (CT) je najdostupniji i najčešće korišteni alat za određivanje stadija limfoma, odnosno za morfološku analizu limfnih čvorova medijastinuma, trbuha i zdjelice (Cronin i sur., 2010.). Kao alternativa može se koristiti i magnetska rezonancija (MR) koja je metoda izbora za procjenu zahvaćenosti SŽS-a. Glavno ograničenje CT-a je to što se prepoznavanje zahvaćenosti limfnih čvorova tumorom temelji isključivo na veličini i anatomskim detaljima. Morfološki normalna, ali funkcionalno abnormalna tkiva ne mogu se otkriti ovim tehnikama. Zato CT ima manju osjetljivost za otkrivanje ektranodalne bolesti i zahvaćenosti koštane srži kod kojih morfološke promjene mogu biti vrlo suptilne. Stoga se preporuča pozitronska emisijska tomografija (PET) s intravenskom aplikacijom radiofarmaka 2-deoksi-2-(18F)-fluoro-D-glukoze (18F-FDG) u kombinaciji s CT-om (PET/CT). PET/CT ukazuje na metaboličku aktivnost limfoma. Većina stanica raka pojačano metabolizira glukozu pa se unos FDG-a u stanice raka povećava, a stupanj unosa FDG-a može se vidjeti na scintigramu. PET/CT ima veću osjetljivost za otkrivanje zahvaćenosti ektranodalnog tkiva uz istovremeno pružanje funkcionalnih i anatomskih informacija (Aurer i sur., 2013.; Kaur i Palot Manzil, 2024.). Osim PET/CT-om, proširenost limfoma na koštanu srž treba se procijeniti i biopsijom kosti (Labar i sur., 2017.). PET/CT može poslužiti i za lokalizaciju prikladnih mjesta biopsije u nedostatku klinički palpabilne limfadenopatije.

Tablica 3. Modificirana Ann Arborska klasifikacija proširenosti limfoma (preuzeto i prilagođeno prema Labar i sur., 2017.)

STADIJ	KARAKTERISTIKE
I	Zahvaćeno jedne regije limfnih čvorova ili jedan ekstralimfatični organ
II	Zahvaćeno više regija limfnih čvorova (odnosno jedna ili više regija i ekstralimfatični organ) s iste strane dijafragme
III	Zahvaćeno više regija limfnih čvorova s objiju strana dijafragme
IV	Difuzno zahvaćanje ekstralimfatičnih organa
Svakiom stadiju se mogu dodati oznake:	
A	Nema B-simptoma
B	Prisutan jedan ili više B-simptoma (gubitak >10% tjelesne mase unutar 6 mjeseci prije dijagnoze, vrućice >38°C, noćno znojenje)
E	Zahvaćena slezena
X	Fokalno zahvaćen ekstralimfatični organ

Laboratorijska dijagnostika korisna je za procjenu funkcije koštane srži, bubrega i jetre prije početka liječenja. Praćenjem laboratorijskih parametara moguće je procijeniti prognozu i aktivnost bolesti, a abnormalnost je proporcionalna tumorskom opterećenju organizma. Posljedica infiltracije bubrega je oslabljena bubrežna funkcija s povišenim serumskim kreatininom, fosfatima i uratima (Labar i sur., 2017.; McKenzie i sur., 2020.). Laktat dehidrogenaza (LDH) obično je povišena i služi kao važan prognostički biljeg i parametar aktivnosti bolesti za mnoge vrste limfoma. Povišena aktivnost LDH pokazala je snažnu negativnu korelaciju s preživljenjem kod pacijenata s HL-om i NHL-om. Hiperuricemija uz povišen LDH uobičajeni su pokazatelji staničnog obnavljanja. Infiltracija koštane srži može dovesti do resorpcije kosti i posljedično hiperkalcijemije u limfomima. Anemija, trombocitopenija i leukopenija/limfocitoza mogu biti negativan prognostički biljeg u nekim tipovima bolesti ili upućivati na komplikacije (Paquin i sur., 2023; Qi i sur., 2021). Kod nekih limfoma, povišene razine beta-2-mikroglobulina (B2M) ukazuju na intenzivnu obnovu stanica, dok niske razine nakon kemoterapije mogu ukazivati na postizanje remisije u slučajevima NHL-a (Davidson i sur., 2017.).

Limfomi su kemosenzitivni i radiosenzitivni tumori koji se liječe kemoterapijom samostalno ili u kombinaciji s radioterapijom ili imunoterapijom. HL se standardno liječi ABVD

kemoterapijskim protokolom (doksorubicin, bleomicin, vinblastin i dakarbazin), ali se mogu koristiti i drugi protokoli. Liječenje NHL-a varira ovisno o histologiji. Uglavnom se koristi CHOP kemoterapijski protokol (ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin i prednizon) ili R-CHOP protokol (rituksimab, ciklofosfamid, doksorubicin, vinkristin i prednizon). Dodavanje rituksimaba (monoklonsko protutijelo usmjereno protiv CD20 antigena B-limfocita) CHOP kemoterapijskom protokolu dovelo je do velikog preokreta u terapiji agresivnih NHL-a, značajno poboljšavajući ishode liječenja (Fernandes i sur., 2019.; Lewis i sur., 2020.).

### **4.3. Tekuća biopsija u limfomima – općenito**

#### **4.3.1. Cirkulirajuće tumorske stanice (CTC)**

CTC su intaktne tumorske stanice koje su se odvojile od primarnog tumora i/ili metastatskih lezija te putuju cirkulacijom u druge dijelove tijela. Odgovorne su za razvoj metastatskih tumora na udaljenim mjestima u tijelu jer mogu transformirati normalne stanice u tumorske. Imaju kratko vrijeme poluživota u krvi (1-2,4 sata) i nalaze se u malom broju (manje od 10 stanica/mL krvi), čak i u metastatskim uvjetima, a broj varira ovisno o vrsti tumora (Poulet i sur., 2019.; Lone i sur., 2022.). Broj CTC-a može se koristiti za predviđanje agresivnosti bolesti i praćenje terapijskog odgovora, a njihova prisutnost povezana je s lošijim ukupnim preživljenjem i prognozom karcinoma (Castro-Giner i Aceto, 2020.). Cirkulirajuće tumorske stanice pružaju rani uvid u primarni tumor, kao što su genske mutacije i profili ekspresije gena koji karakteriziraju tumorske stanice (Huang i sur., 2024.). Najčešće tehnike za karakterizaciju CTC-a su CellSearch® test i protočna citometrija (FCM).

CellSearch® test je zlatni standard za otkrivanje i analizu CTC-a. CTC se izoliraju iz pune krvi miješajući ih s ferrofluidom koji se sastoji od magnetskih čestica obloženih antitijelima na adhezijsku molekulu epitelnih stanica (EpCAM). Nakon magnetske ekstrakcije CTC-a primjenjuje se multipleksno bojenje s imunofluorescentno obilježenim monoklonskim protutijelima za epitelne stanice (citokeratin 8/18/19), leukocite (CD45) i nuklearnu boju (DAPI). Konačno, poluautomatski fluorescentni mikroskop vizualizira stanice te se CTC identificiraju kao stanice s jezgrom koje izražavaju citokeratine i EpCAM, a ne izražavaju CD45 (Dirix i sur., 2022.). Međutim, ova tehnika nije prikladna za karakterizaciju CTC-a u limfomima zbog nedostatka EpCAM pozitivnosti (Wang i sur., 2016.).

U protočnoj citometriji, CTC koje su fluorescentno obilježene protutijelima prolaze pojedinačno kroz kolonu. Prolaskom kroz kolonu prekidaju snop laserske svjetlosti, pri čemu dolazi do raspršenja svjetlosti i fluorescentne ekscitacije koje se mogu koristiti za određivanje veličine, oblika i granuliranosti stanice te ekspresije staničnih biljega. Na taj način se omogućuje karakterizacija CTC-a (Lowes i Allan, 2018.). FCM postaje sve privlačnija tehnika za otkrivanje CTC-a u nekim vrstama T-staničnog limfoma, prvenstveno za identifikaciju imunofenotipski abnormalnih staničnih populacija. Osim toga, studije su pokazale da CTC kvantifikacija pomoću FCM-a nadmašuje CTC kvantificiranje temeljeno na tkivnoj biopsiji (Huang i sur., 2024.).

Analiza CTC-a moguća je samo u nekim limfomima kod kojih je količina CTC-a dostatna, kao što je MCL, FL, MZL, BL i mali limfocitni limfom. Nasuprot tome, DLBCL i klasični HL obično ne sadrže dovoljno CTC-a (Cirillo i sur., 2020.). Budući da velik broj limfoma nema CTC-a u dovoljnoj količini, istraživanja o ulozi CTC-a u tekućoj biopsiji limfoma nisu atraktivna te se više važnosti u literaturi, a i u ovom diplomskom radu, pridaje ostalim biljezima tekuće biopsije.

#### **4.3.2 Cirkulirajuća tumorska DNA (engl. *circulating tumor DNA*, ctDNA)**

Nakon apoptoze ili nekroze, normalne i tumorske stanice otpuštaju fragmente DNA veličine do 166-167 bp u cirkulaciju. Cirkulirajuća DNA koja nije vezana za stanice naziva se cfDNA (engl. *cell-free DNA*), a sastoji se od normalne DNA i tumorske DNA (ctDNA). Tumorske stanice oslobađaju male fragmente DNA putem mehanizama apoptoze, nekroze, lize CTC-a ili direktnim otpuštanjem DNA iz tumorskih stanica u cirkulaciju (Lv i Liu, 2021.). U zdravoj populaciji, cfDNA se primarno otpušta apoptozom stanica hematopoetske loze, uz minimalan doprinos drugih tkiva, te cirkulira u koncentracijama od 1 do 10 ng/mL plazme. U osoba s limfomom, dio cfDNA potječe iz tumorskih stanica i naziva se cirkulirajuća tumorska DNA. Studije su pokazale da je ukupna količina cfDNA u bolesnika koji boluju od limfoma veća u odnosu na zdravu populaciju iste dobi i spola, s prosječnom koncentracijom od 30 ng/mL plazme. Količina otpuštene ctDNA varira među različitim podtipovima limfoma, a veća je u agresivnih limfoma nego u indolentnih limfoma. Osim vrste limfoma, volumen tumora također utječe na količinu ctDNA, koja je viša u uznapredovalom stadiju bolesti nego u ograničenom stadiju te u progresivnoj bolesti nego u bolesti koja klinički odgovara na liječenje. Može se

izolirati iz uzorka seruma ili plazme. Iz seruma se mogu izolirati veće koncentracije ukupne cfDNA nego u plazmi, međutim, cfDNA u serumu kontaminirana je velikim fragmentima genomske DNA koji se oslobađaju lizanjem stanica tijekom pripreme uzoraka *in vitro*. Zbog toga je plazma postala preferirani uzorak za analizu cfDNA i ctDNA iz periferne krvi (Poynton i Okosun, 2021.).

ctDNA u limfomima može se razlikovati od normalne cfDNA korištenjem poznatog mutacijskog profila tumora ili preraspodjele gena teškog lanca imunoglobulina u određenim podtipovima limfomima (Rossi i sur., 2019.). ctDNA je obično kraća od normalne cfDNA, a njezin udio u cfDNA je između 0,01% i 93% (medijan je oko 0,4%) (Lv i Liu, 2021.; Melani i sur., 2019.). Ona nosi genske i epigenetske promjene porijeklom iz primarnog tumora te omogućuje molekularnu analizu mutacija nakon izolacije iz plazme. ctDNA se može koristiti za otkrivanje novih mutacija, procjenu tumorske mase na bilo kojem mjestu, praćenje klonske evolucije limfoma i pojave klonova otpornih na terapiju te otkrivanje minimalne ostatne bolesti (engl. *minimal residual disease*, MRD) (Rossi i sur., 2019.). S obzirom da udio ctDNA u cfDNA može biti vrlo nizak, pogotovo u ranim stadijima limfoma, važno je koristiti visoko osjetljive metode za detekciju i kvantifikaciju ctDNA (Cirillo et al. 2020). Takve metode moraju potisnuti tehnički šum (tj. smanjiti pozadinske pogreške) i biološku smetnju (tj. potisnuti prave mutacije koje potječu iz klonalne hematopoeze neodređenog potencijala). Trenutačne metode koje se koriste su lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) i sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next-generation sequencing*, NGS), a epigenetske promjene (metilacije DNA) mogu se otkriti i pirosekvenciranjem (Poynton i Okosun, 2021.).

Najčešće PCR tehnologije u tekućim biopsijama su PCR u stvarnom vremenu (engl. *quantitative PCR*, qPCR), digitalni kapljični PCR (engl. *digital droplet PCR*, ddPCR) i BEAMing (engl. *beads, emulsion, amplification, magnetics*, BEAM). Metodama koje se temelje na PCR-u mogu se detektirati pojedinačne somatske mutacije koje se javljaju kod većine pacijenata i karakteriziraju određene tipove limfoma (npr. mutacija MYD88 L265P u limfoplazmocitnom limfomu i primarnom limfomu središnjeg živčanog sustava) (Rossi i sur., 2019.). ddPCR je novija verzija kvantitativnog PCR-a koja se temelji na podjeli uzorka u nekoliko tisuća kapljica (individualnih reakcija) na način da se u jednoj kapljici nalazi jedan fragment ctDNA. Fragmenti DNA u kapljici se umnažaju te se detektiraju pomoću fluorescentnih sonda koje razlikuju mutirane i divlje sekvence (Remon i sur., 2020.). Odgovarajući softver broji kapljice koje sadrže umnožene produkte te broj kapljica s umnoženom DNA dijeli s ukupnim brojem kapljica dajući apsolutni postotak. ddPCR je

osjetljiviji od qPCR-a i ne zahtjeva izradu standardne referentne krivulje. Analiza je brza, jednostavna, jeftina i lagana za korištenje u usporedbi s NGS-om, ali je primjenjiva samo na nekoliko poznatih mutacija (Galimberti i sur., 2022.; Shirai i sur., 2023.). BEAMing je tehnika koja kombinira PCR i protočnu citometriju te je uspješno korištena u kontekstu tekuće biopsije, ali zahtjeva složenu eksperimentalnu proceduru koja ograničava široku upotrebu u klinikama (Huang i sur., 2024.; Rifai i sur., 2023.). Nakon izolacije DNA, regije od interesa se amplificiraju PCR-om. Amplificirane DNA sekvence vežu se na magnetske kuglice impregnirane specifičnim oligonukleotidima i rasprše u milijune vodenih kapljica u emulziji ulja i vode. Svaka kapljica sadrži samo jednu DNA molekulu i jednu magnetsku kuglicu. DNA fragmenti se umnažaju koristeći oligonukleotide na kuglicama kao početnice, nakon čega se kuglice pročišćavaju pomoću magneta. Fluorescentne sonde hibridiziraju s DNA tako da razlikuju mutirane i divlje sekvence na temelju različite fluorescencije, a protočnom citometrijom se sortiraju kuglice koje sadrže određenu mutaciju (Remon i sur., 2020.; Huang i sur., 2024.).

U većini limfoma mutacije su heterogene. Stoga se preporuča korištenje NGS-a koji omogućuje masivno paralelno sekvenciranje velikog broja genetskih lokusa istovremeno. Ova metoda može prevladati ograničenja testova koji detektiraju pojedinačne somatske varijante otkrivanjem širokog spektra genetskih promjena u genomu ili egzomu, uključujući varijante jednog nukleotida, insercije i delecije, kromosomska preuređenja i promjene broja kopija (Lv i Liu, 2021.; Talotta i sur., 2023.).

Personalizirano profiliranje karcinoma dubokim sekvenciranjem (engl. *cancer personalized profiling by deep sequencing*, CAPP-seq) vrlo je osjetljiva i specifična ciljana NGS metoda za otkrivanje ponavljajućih tumor-specifičnih mutacija u ctDNA u molekularno heterogenim limfomima (npr. u DCBCL-u) (Rossi i sur., 2019.). CAPP-seq koristi sveobuhvatan ciljani dizajn panela gena za otkrivanje varijanti jednog nukleotida (engl. *single nucleotide variants*, SNV), promjena broja kopija (engl. *copy number alterations*, CNV) i strukturnih varijanti (engl. *structural variations*, SV) povezanih s limfomom. Dizajn panela gena prilagođen je specifičnom limfomu i obuhvaća niz egzonskih i intronskih meta odabranih da pokriju genske lokuse za koje se zna da su rekurentno mutirani za određeni podtip limfoma (Rossi i sur., 2019.; Poynton i Okosun, 2021.).

Osim toga, nedavni napredak u NGS tehnikama omogućuje sekvenciranje klonski preuređene sekvence V(D)J genskih segmenta koji kodiraju varijabilnu regiju teškog lanca



imunoglobulina. Visokoprotočno sekvenciranje lokusa teškog lanca imunoglobulina (engl. *immunoglobulin high throughput sequencing*, Ig-HTS) je novija, vrlo učinkovita metoda za praćenje minimalne rezidualne bolesti nekih leukemija i limfoma (Levy i sur., 2022.). ClonoSEQ je Ig-HTS dijagnostički test koji koristi multipleks PCR i NGS metode za otkrivanje i kvantificiranje preuređenih sekvenci gena receptora IgH (VDJ), IgH (DJ), IgK i IgL, kao i IgH/BCL1 i IgH/BCL2 translokacije u genomskoj DNA, koristeći početnice usmjerene na V, D i J gene IgH, IgK, IgL, BCL1/IgH i BCL2/IgH lokusa. Knjižnica amplicona zatim se podvrgava ultra-dubokom NGS-u (Monter i Nomdedéu, 2019.; Ching i sur., 2020.). Ovaj test odobrila je Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) za otkrivanje MRD-a u bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom (CLL), multiplim mijelomom i B-staničnom akutnom limfoblastičnom leukemijom (B-ALL), a u zadnje vrijeme sve je više istraživanja čiji podatci upućuju na to da je ClonoSEQ test učinkovit za praćenje MRD-a putem ctDNA kod pacijenata s DLBCL-om i MCL-om (Sarkozy i sur., 2017.; Simmons i sur., 2023.). Međutim, ove metode za detekciju imunoglobulinske preraspodjele hvataju samo jedan pojedinačni molekularni biljeg te zbog visokih stopa somatske hipermutacije ne uspijevaju detektirati klonalne V(D)J preraspodjele u oko 20% limfoma (Scherer i sur., 2017.; Shukla i sur., 2024.).

Osim ciljanih NGS metoda, u upotrebi su i sekvenciranje cijelog genoma (engl. *whole genome sequencing*, WGS), sekvenciranje cijelog egzoma (engl. *whole exome sequencing*, WGS) i bisulfitno sekvenciranje cijelog genoma (engl. *whole-genome bisulfite sequencing*, WGBS-Seq). WGS omogućava analizu cijelog genoma tumora i CNV-ova. Iako pruža sveobuhvatnu procjenu svih mutacija u tumoru, ograničen je čimbenicima kao što su osiguranje kvalitete, etička razmatranja, vrijeme i trošak. WES detektira sve egzone ljudskog genoma (egzom), omogućujući identifikaciju potencijalnih onkogenih i tumor supresorskih gena, te CNV-ove. Posljedično, WES ima troškovnu prednost u usporedbi s WGS-om, ali osjetljivost može biti niža od WGS-a. WGBS-Seq se smatra zlatnim standardom za analizu metilacije DNA te pruža vrlo precizna mjerenja pojedinačnih citozina (Rifai i sur., 2023.; Huang i sur., 2024.).

Kako bi se procijenila kvaliteta genotipizacije cfDNA u tekućoj biopsiji, uspoređivale su se mutacije detektirane tekućom biopsijom i genotipizacijom tkiva nakon tkivne biopsije. Nekoliko studija je procijenilo da je podudarnost genotipizacije limfoma na temelju tkivne i tekuće biopsije veća od 80%. Nadalje, u mnogim su se studijama iz tekuće biopsije detektirale varijante koji prije nisu bile identificirane u tumorskom tkivu. Ovo naglašava sposobnost

tekuće biopsije da identificira subklonove tumora koji bi mogli biti propušteni u tkivnoj biopsiji gdje se biotat tkiva uzima samo s jednog mjesta (Cirillo i sur., 2020.).

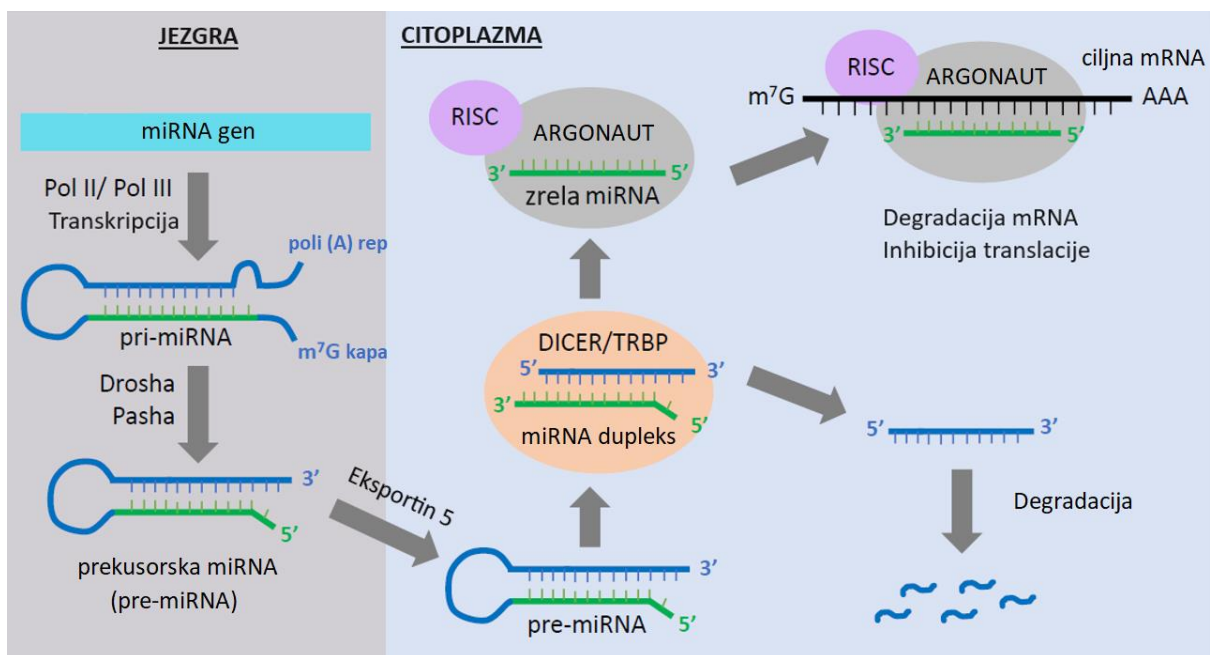
Osim analize mutacija gena, tekuća biopsija može se iskoristiti i za proučavanje epigenetskih obrazaca u cfDNA te obrazaca fragmentacije ctDNA koji dodatno poboljšavaju molekularnu karakterizaciju različitih podtipova limfoma. Nedavno je pokazano da duljine fragmenata ctDNA u pacijenata s limfomom mogu varirati kod svakog pojedinca ovisno o stadiju bolesti. Analiza obrazaca fragmentacije pruža uvid u nukleosomsku organizaciju i dostupnost kromatina koji se mogu koristiti za procjenu aktivnosti gena. Stoga se obrasci fragmentacije DNA mogu koristiti kao dijagnostički i prognostički alat za otkrivanje molekularne podloge limfoma, osobito u kontekstu epigenetskih promjena tijekom razvoja limfoma (Talotta i sur., 2023.; Wong i sur., 2024.).

Metilacija DNA glavna je epigenetska modifikacija koja igra ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena i genomske stabilnosti. Obično se metiliraju CpG dinukleotidi čime se stvara 5-metilcitozin (5mC) i na taj način utišava ekspresija gena. Posljednjih godina, dosta se pažnje posvećuje oksidaciji 5mC-a, pri čemu nastaje 5-hidroksimetilcitozin (5hmC) koji je intermedijer u procesu aktivne demetilacije DNA. Abnormalni obrasci metilacije otkriveni u cfDNA pokazali su se kao loši prognostički čimbenici za 5-godišnje ukupno preživljenje u nekim vrstama limfoma, kao što je DLBCL (Talotta i sur., 2023.; Wong i sur., 2024.; Schroers-Martin i sur., 2023.). WGBS-Seq metoda koristi se za analizu epigenetskih promjena u cfDNA. Prvi korak uključuje tretman cfDNA s bisulfitom, koji pretvara nemetilirane citozine u uracile, dok 5mC ostaju nepromijenjeni. Ovo omogućuje razlikovanje metiliranih i nemetiliranih citozina tijekom NGS-a. Podatci sekvenciranja analiziraju se pomoću specijaliziranih bioinformatičkih alata koji rekonstruiraju metilacijski status svakog citozina u genomu pružajući sveobuhvatnu analizu uzoraka metilacije DNA na razini cijelog genoma (Wong i sur., 2024.; Gao i sur., 2022.). Ovo područje postaje sve popularnije te se smatra da je integracija epigenetskih analiza cfDNA i mutacijskih analiza ctDNA obećavajući pristup boljem karakteriziranju tumora (Talotta i sur., 2023.; Wong i sur., 2024.; Schroers-Martin i sur., 2023.).

### **4.3.3. MikroRNA (miRNA)**

MikroRNA su najčešće nukleinske kiseline koje se koriste kao biljeg u tekućoj biopsiji. To su jednolančane, male, nekodirajuće RNA (engl. *non-coding RNA*, ncRNA), obično dugačke oko

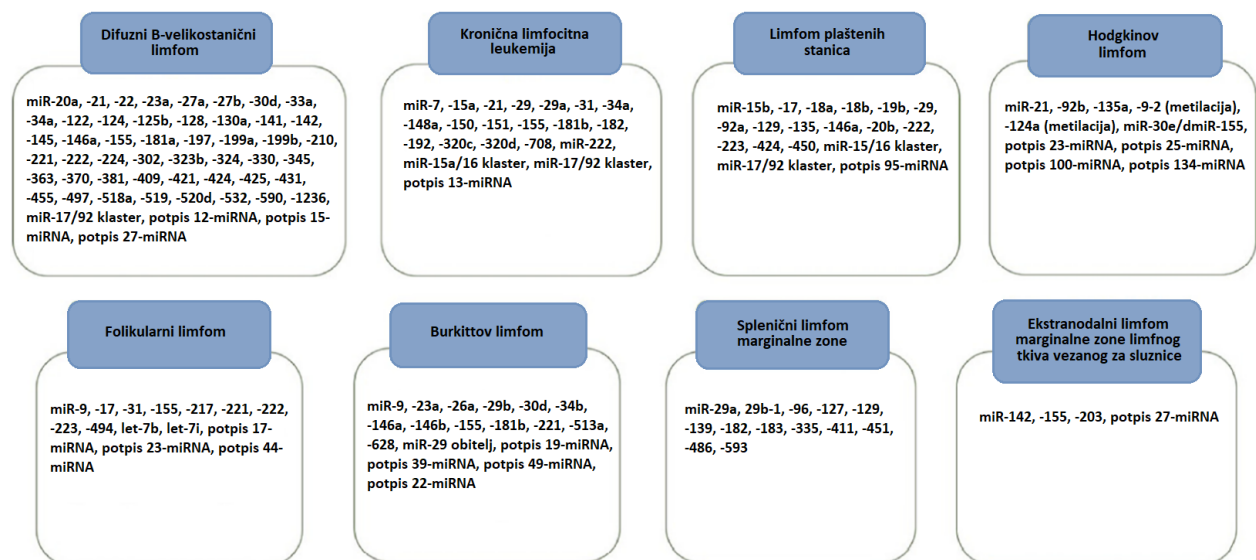
22 nukleotida, koje mogu negativno regulirati ekspresiju gena na posttranskripcijskoj razini vezujući se na ciljne molekule glasničke RNA (engl. messenger RNA, mRNA), što rezultira povećanom degradacijom ili inhibicijom translacije ciljane mRNA (Slika 3.). Pokazalo se da miRNA imaju i onkogenu i tumor-supresivnu ulogu u određenim podtipovima limfoma. Cirkulirajuće miRNA povezane s tumorom mogu se detektirati u perifernoj krvi te imaju bitnu ulogu u dijagnozi, tipizaciji, praćenju odgovora na liječenje i prognostičkom predviđanju limfoma, a posebice B-staničnih limfoma (Lv i Liu, 2021.). Mogu se ugraditi u izvanstanične vezikule (egzosome i mikrovezikule, engl. extracellular vesicles, EV), lipoproteine (HDL, LDL) i RNA-vezujuće proteine poput proteina argonaut (AGO), olakšavajući njihov ulazak u cirkulaciju. Inkapsulacija miRNA prije otpuštanja u cirkulaciju povećava stabilnost miRNA i štiti od razgradnje RNazama (Felekis i Papanephtou, 2024.).



**Slika 3.** Sinteza, struktura i funkcija mikroRNA. U jezgri, RNA polimeraza II (Pol II) prepisuje miRNA gene i tvori primarnu miRNA (pri-miRNA). Pri-miRNA zatim precizno reže endoribonukleaza Drosha i nastaje prekursorska miRNA u obliku ukosnice (pre-miRNA) koja odlazi u citoplazmu pomoću molekule eksportin 5. Endoribonukleaza Dicer kida ukosnicu na pre-miRNA pri čemu nastaje miRNA-miRNA dupleks. Dupleks miRNA povezuje se s argonaut (AGO) proteinima, tvoreći mRNA-inducirani kompleks za utišavanje (mRISC) koji razdvaja dvolančanu miRNA, a jedan od lanaca se razgrađuje. RISC kompleks dovodi do degradacije mRNA ili inhibira translaciju mRNA (preuzeto i prilagođeno prema Kumar i sur., 2020.).

Detaljna analiza ekspresije miRNA na razini cijelog genoma provedena je u različitim podtipovima malignih limfoma, što je dovelo do otkrića promjena miRNA specifičnih za određeni podtip limfoma (Tagawa, 2015.). Neke od miRNA koje posreduju u patogenezi određenih limfoma i limfoidnih malignost prikazane su na slici 4. (Drillis i sur., 2021.). Prva onkogeni miRNA za koju je prijavljeno da igra ulogu u limfomu je miR-155. Ova miRNA je visoko izražena u Hodgkinovom limfomu, primarnom medijastinalnom B-staničnom limfomu i difuznom B-velikostaničnom limfomu (Kluiver i sur., 2013.). U zadnje vrijeme, posebnu važnost pridaje se miR-142 koja je povezana s brojnim vrstama limfoma zbog svoje preferirane ekspresije u hematopoetskim stanicama (Huang i sur., 2024.).

Ključne prednosti miRNA su njihova velika stabilnost (čak i u ekstremnim uvjetima, uključujući pH, temperaturne promjene i cikluse smrzavanja i odmrzavanja), rano otkrivanje bolesti (mogu ukazivati na bolest prije pojave kliničkih simptoma), specifičnost (specifične miRNA povezane su sa specifičnim podtipom limfoma, pomažući u ciljanoj dijagnozi) te dinamični odgovor (profil miRNA može varirati ovisno o stupnju i težini bolesti te liječenju, što ih čini posebno vrijednima za procjenu stadija limfoma i praćenju terapije) (Felekkis i Papanephytou, 2024.).



**Slika 4.** Sažetak miRNA koje su povezane s različitim vrstama limfoma (preuzeto i prilagođeno prema Drillis i sur., 2021.).

Za kvantificiranje razina ekspresije nukleinskih kiselina najčešće se koriste metode reverzne transkripcije s lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*, qRT-PCR), NGS i mikročip tehnologija (Yu i sur., 2022.). Mikročip tehnologija omogućuje istovremenu analizu desetaka tisuća gena. DNA čip se sastoji od tisuće mikroskopskih točaka koje sadrže poznatu DNA sekvencu (oligonukleotide). MiRNA izolirana iz zdravih i oboljelih pacijenata koristi se kao kalup za sintezu cDNA sonde koje se zatim obilježavaju različitim fluorescentnim bojama. Pomiješane dvije različite cDNA hibridiziraju s DNA mikročipom, koji se tada analizira laserskim čitačem visoke rezolucije. Relativni omjeri transkripcije određenog gena u zdravih i bolesnih pacijenata odgovaraju omjeru crvene i zelene fluorescencije u odgovarajućim točkicama na DNA-mikročipu (Cooper i Hausman, 2010.).

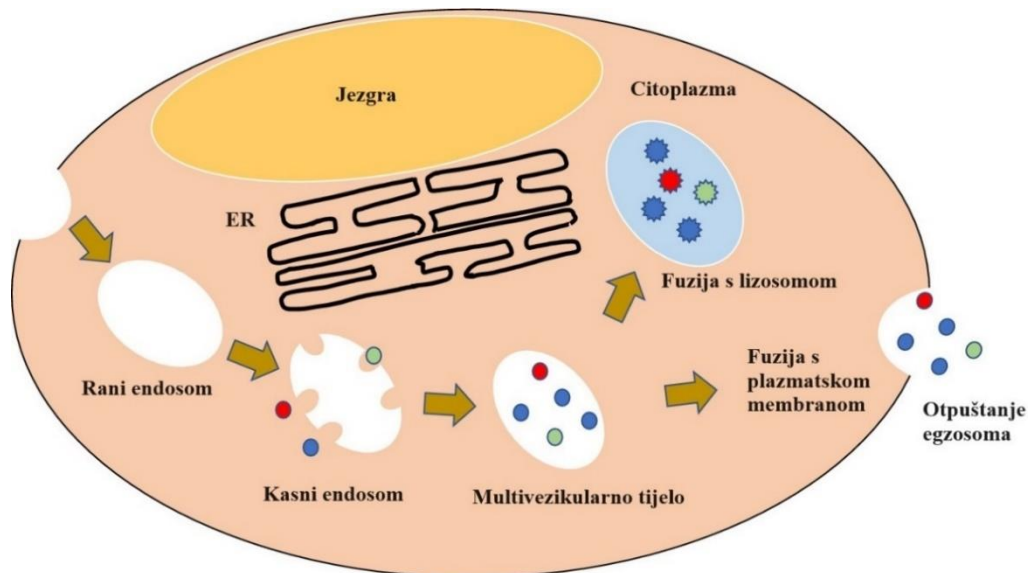
#### **4.3.4. Duga nekodirajuća RNA (engl. *long non-coding RNA*, lncRNA)**

Osim miRNA, u novije vrijeme provode se istraživanja i o lncRNA kao biljegu tekuće biopsije u limfomima. LncRNA su nekodirajuće RNA duge preko 200 bp, koje su nedavno dobile značajnu pozornost kao glavni posrednici ekspresije gena. LncRNA su vrlo važne u karcinogenezi limfoma jer utječu na apoptozu, staničnu proliferaciju, stanični ciklus, odgovor na kemoterapiju te migraciju i invaziju stanica limfoma što predviđa ponašanje tumora, prognozu bolesti i odgovor na liječenje. Promijenjena ekspresija lncRNA može dovesti do transformacije normalnih limfocita u stanice limfoma (Gholami i sur., 2022.). Inicijalni podatci sugeriraju da lncRNA igraju ključnu ulogu u limfangiogenezi, budući da je veliki broj njih dereguliran u malignim tumorima B-stanica, uključujući HL i većinu NHL-a. Važno je napomenuti da mnoge lncRNA ciljaju miRNA kako bi utjecale na gore spomenute stanične i molekularne mehanizme. Međutim, područje primjene lncRNA u limfomima zahtjeva daljnja istraživanja (Nobili i sur., 2017.; Drillis i sur., 2021.).

#### **4.3.5. Egzosomi**

Egzosomi su izvanstanične vezikule promjera od 40 do 160 nm. Nastaju endocitičkim procesom te se otpuštaju u krvotok (i ostale tjelesne tekućine) gdje stabilno cirkuliraju (Slika 5.) (Yu i sur., 2022.). Razlikuju se ovisno o staničnom porijeklu, a sadržaj i ekspresija egzosoma

koje izlučuju zdrave stanice razlikuju se od egzosoma koje izlučuju tumorske stanice (engl. *tumor-derived exosomes*, TDE). Obično sadrže nukleinske kiseline (DNA, mRNA, miRNA, lncRNA), proteine, lipide i metabolite koje prenose među stanicama i tako sudjeluju u prijenosu informacija u mikrookruženju limfoma (engl. *lymphoma microenvironment*, LME).



**Slika 5.** Unutarnjim pupanjem plazmatske membrane nastaje rani endosom koji sazrijeva u citoplazmi. Membrana kasnog endosoma se invaginira hvatajući citoplazmatski sadržaj u procesu i stvarajući vezikule unutar lumena te postaje multivezikularno tijelo (MVB). MVB se tada može stopiti natrag s plazmatskom membranom, oslobađajući svoj sadržaj izvan stanice u obliku egzosoma (preuzeto i prilagođeno prema Ofori i sur., 2021.).

LME ima važnu ulogu u nastanku, progresiji i terapijskom liječenju limfoma jer potiče proliferaciju tumorskih stanica, izbjegavanje stanične smrti, izbjegavanje supresora rasta, terapijsku otpornost i osigurava mehanizme izbjegavanja imunskog odgovora. Sastoji se od imunskih i stromalnih stanica, citokina, krvnih žila i komponenti izvanstaničnog matriksa, a u novije vrijeme, egzosomi se smatraju izrazito bitnim elementima LME-a. Egzosomi imaju ulogu u isporuci staničnog sadržaja (DNA, mRNA, proteina) između stanica limfoma i njihovog mikrookruženja sudjelujući tako u međustaničnoj komunikaciji. Na taj način tumorske stanice limfoma mogu modulirati okolne i udaljene normalne stanice i stvoriti imunosupresivni okoliš čime će dodatno pospješiti progresiju tumora i metastaze (Navarro-Tableros i sur., 2019.). TDE prenose egzosomsku DNA (egzoDNA) u okolne stanice gdje se

ona lokalizira i ulazi u jezgru. U jezgri, egzoDNA regrutira transkripcijske faktore, spaja se s njima i potiče transkripciju. Također, TDE u normalne stanice mogu prenijeti i egzosomalnu miRNA koja može inducirati fenotipske promjene i modulirati aktivnost normalnih stanica reguliranjem njihove mRNA i ekspresije proteina. Dokazano je da egzosomske miRNA igraju ulogu tijekom limfomageneze NHL-a, angiogeneze, progresije i metastaziranja limfoma te razvoja rezistencije na kemoterapiju (Fernandes i sur., 2019.; Lv i Liu, 2021.). Iz tog razloga, tekuća biopsija temeljena na egzosomima može dati podatke o genetskim, transkripcijskim i proteomskim promjenama korisnim za dijagnozu, prognozu i terapijsko liječenje pacijenta s limfomom u različitim stadijima bolesti.

Egzosomi su bolji biljezi u tekućoj biopsiji u usporedbi s CTC i ctDNA jer ih izlučuju žive stanice (a ne apoptotične ili nekrotične), njihov broj u cirkulaciji je veći (oko  $10^9$  egzosoma po mL krvi) i prirodno su stabilni zbog lipidnog dvosloja. Budući da TDE predstavljaju samo mali dio svih egzosoma, potrebna je visoko osjetljiva metoda detekcije za dijagnostiku limfoma temeljenu na egzosomima. Najčešće metode za detekciju egzosoma su ultracentrifugiranje, ultrafiltracija, precipitacija s polietilenglikolom te izolacija imunoafinitetnim ili imunomagnetskim obogaćivanjem (Yu i sur., 2022.).

Kao posljedica endosomskog podrijetla, svi egzosomi sadrže membranske transportne i fuzijske proteine (GTPaze, aneksine, flotilin), transmembranske proteine tetraspanin porodice (CD9, CD63, CD81, CD82), proteine toplinskog šoka (HSP70, HSP90), proteine povezane s MVB-om (Alix, TSG101), proteine povezane s lipidima i fosfolipaze (Xu i Wang, 2017.). Identificirani su i neki antigeni koji su povezani s tumorom (npr. CD19 u B-staničnim limfomima, CD30 u HL-u) te pokazuju potencijal egzosoma kao biljega u limfomima (Fernandes i sur., 2019.). Iako navedeni markeri igraju ključnu ulogu u pročišćavanju i identifikaciji egzosoma, oni nisu specifični samo za egzosome već se nalaze i na mikrovezikulama (Xu i Wang, 2017.). Mikrovezikule su veće EV od egzosoma, veličine od 100 do 1000 nm, koje nastaju pupanjem plazmatske membrane (Velasco-Suelto i sur., 2024.). Nedostatak biljega za razlikovanje različitih populacija EV-a predstavlja problem u tekućoj biopsiji egzosoma (Xu i Wang, 2017.).

Analiza egzosoma uključuje i detekciju egzosomskih nukleinskih kiselina. MiRNA predstavlja najobilniji i najraznovrsniji sastavni dio egzosomalnih molekula. Budući da su pakirane u egzosomima, egzosomalne miRNA izrazito su stabilne, a njihova koncentracija i sastav u egzosomima razlikuju se između bolesnih i zdravih osoba te između različitih podtipova

limfoma. Također se mijenjaju tijekom koraka karcinogeneze, što ukazuje da bi mogle biti važan dijagnostički i prognostički biljeg u limfomima. Doista, identificiran je široki spektar egzosomalnih miRNA koje se razlikuju ovisno o vrsti limfoma, stadiju bolesti, terapijskom liječenju te prisutnosti relapsirajuće bolesti. Stoga se sve više proučava moguća upotreba egzosomalne miRNA u limfomima (Fernandes i sur., 2019.).

Naposlijetku, osim miRNA, potencijal u dijagnostici i praćenju limfoma ima i mRNA u egzosomima. Pakiranjem u egzosome povećava se stabilnost mRNA koja se obično vrlo brzo razgrađuje djelovanjem RNaza kada je u cirkulaciji. Međutim, o važnosti egzosomalne mRNA kao potencijalnog biljega limfoma ne zna se puno. Postoje studije koje su pokazale da je prisutnost BCL-6 i c-MYC mRNA povezana s lošijim preživljenjem bez progresije bolesti (engl. *progression-free survival*, PFS) i ukupnim preživljenjem (engl. *overall survival*, OS) u B-staničnim limfomima. Štoviše, prisutnost AKT mRNA povezana je s izostankom odgovora na liječenje rituksimabom (Fernandes i sur., 2019.). Za razliku od miRNA, cirkulirajuća mRNA se pojavljuje u vrlo niskim koncentracijama te je manje stabilna od miRNA.

#### **4.4. Difuzni B-velikostanični limfom (engl. *diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL)**

Od svih podtipova limfoma, primjena tekuće biopsije najbolje je ispitana u DLBCL-u. DLBCL je najčešći podtip NHL-a te čini približno 30% svih NHL-a. Prema kliničkom tijeku bolesti spada u agresivne limfome te je neizlječiv za oko 40% pacijenata. (Poynton i Okosun, 2021.; Huang i sur., 2024.). DLBCL je heterogena skupina tumora sastavljenih od nakupina velikih neoplastičnih stanica B-limfocitne loze. Molekularna raznolikost DLBCL-a prvotno je prepoznata iz studija profiliranja ekspresije gena mikročip tehnologijom čime su identificirani podtipovi DLBCL-a na temelju pretpostavljenog podrijetla stanice (engl. *cell of origin*, COO). Identificirana su dva glavna molekularno različita podtipa: GCB podtip (podtip sličan B-stanicama germinalnog centra) i ABC podtip (podtip sličan aktiviranim B-stanicama). ABC tip DLBCL-a ima lošiji ishod nego GCB tip, a COO klasifikacija koristi se u procjeni prognoze bolesnika s DLBCL-om. Za razlikovanje ABC i GCB tipa koristi se Hansov imunohistokemijski algoritam koji se temelji na ekspresiji CD10, BCL6 i IRF4/MUM1 biljega (McKenzie i sur., 2020.). U novije vrijeme, tekuća biopsija predstavlja zanimljiv alat za neinvazivnu klasifikaciju ABC i GCB podtipova DLBCL-a.

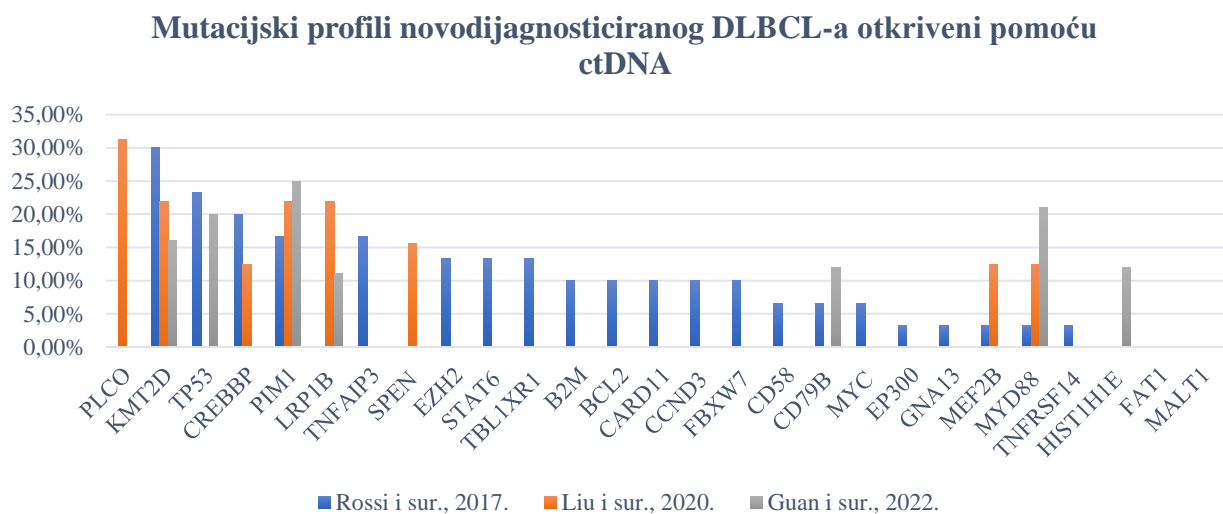


U 5-15% slučajeva DLBCL-a prisutna je translokacija t(8;14)(q24.1;q32) c-MYC gena (engl. *myelocytomatosis viral oncogene homolog*). U tom slučaju, protoonkogen c-MYC stavljen je pod kontrolu promotora za IGH gen što rezultira povećanom ekspresijom c-Myc proteina. C-Myc protein je ključni transkripcijski faktor koji potiče stanični ciklus i tumorsku proliferaciju. Translokacija t(14;18)(q32;q21) s preuređenjem BCL2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) protoonkogena na IGH lokus prisutna je u približno 20-30% slučajeva DLBCL-a. Translokacije BCL6 (engl. *B-cell lymphoma 6*) protoonkogena na kromosomskom lokusu 3q27 dovode BCL6 gen pod kontrolu IGH gena i predstavljaju najčešću kromosomsko preuređenje u DLBCL-u te su prisutne u oko 30% slučajeva (Nguyen i sur., 2017.). Bcl2 ima važnu ulogu u kontroli apoptoze stanica, dok Bcl6 sudjeluje u različitim mehanizmima popravka DNA, regulaciji staničnog ciklusa, apoptozi, staničnoj proliferaciji i diferencijaciji, a kontrolira i brojne druge gene važne za stanično preživljenje kao što su BCL2 i TP53 (Dotlić, 2012.). Znanje o BCL2, BCL6 i MYC translokacijama, ali i ostalim mutacijama u DLBCL-u, primjenjuje se u tekućoj biopsiji DLBCL-a te može pomoći u neinvazivnoj identifikaciji pacijenata s visokim rizikom od neuspjeha liječenja, otkrivanju mehanizama rezistencije i razvoju terapija prilagođenih rizičnim bolesnicima.

#### **4.4.1. CtDNA u neinvazivnom genotipiziranju DLBCL-a**

Zbog toga što su CTC u DLBCL-u vrlo rijetko prisutne, velik broj istraživanja posvećen je ctDNA kao biljegu u tekućoj biopsiji DLBCL-a. Histopatološka procjena tkiva limfoma dobivenog invazivnim kirurškim postupcima zlatni je standard za dijagnozu limfoma. Međutim, neinvazivna genotipizacija pomoću ctDNA iz periferne krvi mogla bi biti nadopunjujući alat u situacijama u kojima je tumorsko tkivo nedostupno ili ga nije moguće ponovno dobiti tijekom tijeka bolesti. Također, zbog genomske heterogenosti unutar tumora, biopsija tkiva možda ne predstavlja cjelokupnu sliku o genetici DLBCL-a. Različite studije su pokazale da se genetske promjene povezane s limfomom mogu otkriti iz ctDNA, a CAPP-seq se pokazao kao najbolja dostupna tehnologija za genotipizaciju DLBCL-a (Rossi i sur., 2020.; Roschewski i sur., 2023.). Analizom ctDNA iz plazme pomoću CAPP-Seq-a identificirano je između 91% i 99% mutacija (SNV-ova, delecija i insercija te BCL2, BCL6 i c-MYC translokacija) prethodno identificiranih FISH metodom iz tumorskog tkiva, a stopa detekcije bila je izravno povezana s koncentracijama ctDNA (Talotta i sur., 2023.; Roschewski i sur., 2022.; Scherer i sur., 2016.). Štoviše, tekuća biopsija može otkriti dio mutacija (otprilike 15%

do 20%) koje se inače ne identificiraju u biopsiji limfnog čvora, što potvrđuje da profiliranje ctDNA obuhvaća prostornu heterogenost tumora. S druge strane, vrlo je mali udio mutacija (od 1% do 5%) koje su identificirane biopsijom limfnog čvora, a nisu detektirane u ctDNA i uglavnom su niske alelne zastupljenosti (Talotta i sur., 2023.). Stoga ctDNA može poslužiti za praćenje ponavljajuće mutiranih gena u DLBCL-u. Nekoliko studija proučavalo je gene koji su rekurentno pogođeni somatskim mutacijama kod pacijenata s novodijagnosticiranim DLBCL-om u vrijeme dijagnoze, što je prikazano na slici 6. (Rossi i sur., 2017; Liu i sur., 2020.; Guan i sur., 2022.).

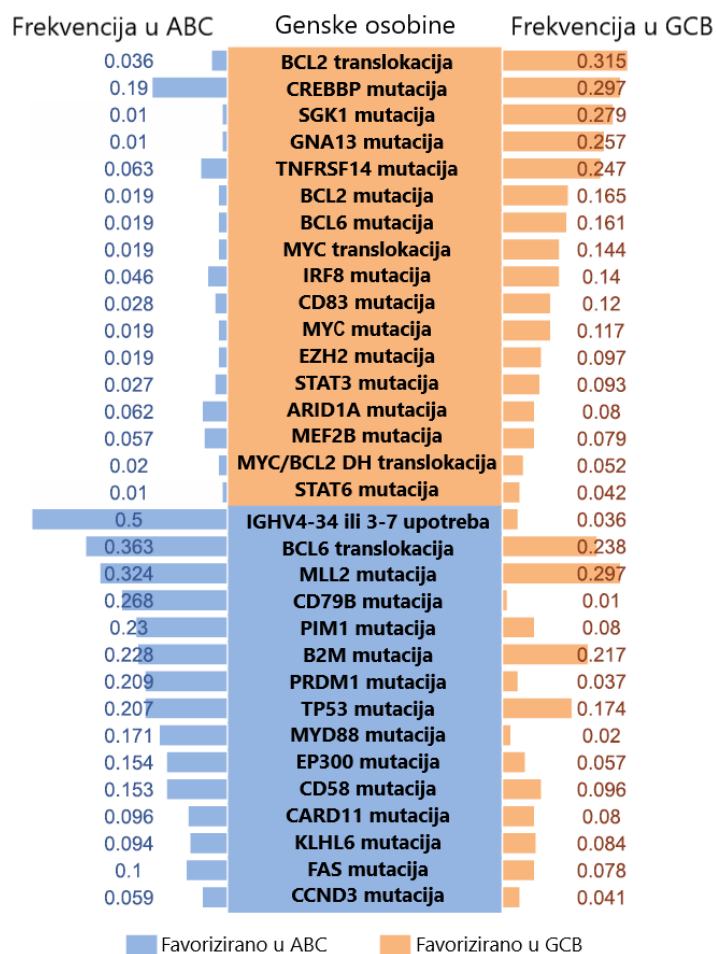


Slika 6. Mutacijski profili novodijagnosticiranog DLBCL-a otkriveni pomoću ctDNA (prilagođeno prema Rossi i sur., 2017; Liu i sur., 2020.; Guan i sur., 2022.)

Osim toga, proučavani su i mutacijski profili ctDNA kod pacijenata s novodijagnosticiranim DLBCL-om i pacijenata s relapsiranim i/ili refraktornim DLBCL (rrDLBCL). Utvrđeno je značajno preklapanje mutacijskih profila između dviju skupina, ali učestalost nekih mutacija se razlikovala. Mutacije KMT2D, PIM1 i PCLO gena bile su jednako zastupljene u obje skupine sudionika. Nasuprot tomu, učestalost mutacija LRP1B, SPEN i CREBBP gena veća je u novodijagnosticiranom DLBCL-u, dok je učestalost mutacija TP53, CCND3, RET i NOTCH1 značajno veća u pacijenata s rrDLBCL-om. Mutacije PIK3CA i XPO1 gena detektirane su isključivo u novodijagnosticiranom DLBCL-u i nisu bile prisutne u pacijentima s rrDLBCL-om (Liu i sur., 2020.). Ovi rezultati upućuju na razlike u ctDNA genotipizaciji

između novodijagnosticiranih pacijenata i onih s relapsom ili refraktornom bolešću te demonstriraju uporabu tekuće biopsije kao alata za dublje razumijevanje spektra somatskih promjena kod pacijenata s novodijagnosticiranim i rrDLBCL-om.

Također, genotipizacijom ctDNA pomoću NGS-a pokazano je da GCB i ABC podtipovi DLBCL-a imaju različite profile mutacija. Prema literaturi, BCL2 translokacije i mutacije u EZH2, CREBBP, KMT2D, MEF2B, ZMYM3, GNA13, TCF3, MYC i drugim genima uglavnom su otkrivene u GCB tipu, dok su BCL6 translokacije i mutacije u MYD88, CD79A/B, CARD11, PIM1, TNFAIP3 i drugim genima često prisutne u ABC podtipu (Guan i sur., 2022.; Scherer i sur., 2016.; Kim i sur., 2024.). Neke od navedenih mutacija prikazane su na slici 7. Zbog toga, ctDNA može poslužiti i u klasifikaciji COO podtipova što naposljetku može pomoći u identifikaciji pacijenata s visokim rizikom pri dijagnozi, usmjeravanju izbora terapije i poboljšanju odluka o liječenju pacijenata s DLBCL-om.



Slika 7. Mutacijski profili ABC i GCB podtipova DLBCL-a otkriveni pomoću ctDNA (preuzeto i prilagođeno prema Scherer i sur., 2016.)

Nadalje, neinvazivna genotipizacija mutacija koje se mogu ciljano liječiti mogla bi biti važan alat u personaliziranoj medicini u budućnosti, ali potencijal za kliničku primjenu uvelike će ovisiti o razvoju ciljane terapije specifične za DLBCL. Genotipizacija ctDNA pomoću CAPP-seq-a omogućuje otkrivanje 100% EZH2, MYD88, CD79B mutacija potvrđenih biopsijom tumora. Pokazano je da pacijenti s DLBCL-om koji imaju EZH2 mutacije identificirane u tkivu limfoma ili ctDNA pokazuju bolji odgovor na EZH2 inhibitor tazemetostat nego pacijenti s divljim tipom EZH2. Nadalje, istovremene mutacije u MYD88 i CD79B genima mogle bi pomoći u identificiranju pacijenata s DLBCL-om koji će najvjerojatnije imati dobar odgovor na BTK inhibitor ibrutinib. U ovim slučajevima, genotipizacija pomoću ctDNA mogla bi pomoći u donošenju odluka o liječenju DLBCL-a u nekim slučajevima gdje je tumorsko tkivo nedostupno. Međutim, potrebna je standardizacija CAPP-seq-a prije uvođenja ovog testa u rutinsku dijagnostičku praksu za DLBCL (Rossi i sur., 2019.; Lauer i sur., 2022.).

#### **4.4.2. ctDNA kao početni prognostički biljeg u DLBCL-u**

Tumorsko opterećenje organizma prije liječenja utvrđeni je čimbenik rizika NHL-a i općenito je povezano s lošijim ishodima. Postoje parametri tumorskog opterećenja koji izravno odražavaju opterećenje organizma limfomom, a to su ukupni metabolički/radiografski volumen tumora (TMTV/TRTV) iz PET/CT snimaka ili MR-a, serumski LDH, Ann Arbor stadij i međunarodni prognostički indeks (engl. *international prognostic index*, IPI) (Lauer i sur., 2022.). IPI se koristi za procjenu prognoze agresivnih B-stanični limfoma, a sastoji se od pet parametara (dob, opće stanje, stadij, broj zahvaćenih ekстранodalnih organa i LDH) kojima se dodjeljuje određeni broj bodova. Što je broj bodova veći to je bolest većeg rizika i ima lošiju prognozu (Labar, 2017.; Jelacic i sur., 2023.).

Ključna karakteristika ctDNA kao neinvazivnog biljega je točno odražavanje opterećenja organizma tumorom prilikom dijagnoze. Početna koncentracija ctDNA za sekvence gena imunoglobulinskih receptora korelira s opisanim kliničkim parametrima tumorskog opterećenja (serumski LDH, Ann Arbor stadij, TMTV/TRTV i IPI) te se ova korelacija može izravno prevesti u prognostički učinak. Pacijenti s ranim stadijem DLBCL-a imali su značajno niže srednje koncentracije ctDNA od onih s uznapredovalom bolesti (Lauer i sur., 2022.). Najveća studija o ctDNA u DLBCL-u koristila je pristup ciljanog sekvenciranja CAPP-seq i analizirala prognostičku ulogu početnih razina ctDNA u 217 pacijenata iz 6 različitih centara

za liječenje. Autori su pokazali da je koncentracija ctDNA prije liječenja bila prognostička za preživljenje bez događaja (engl. *event-free survival*, EFS) i ukupnim preživljenjem (OS) u pacijenata koji su primali terapiju neovisno o prognostičkim parametrima IPI i TMTV, što sugerira da bi ctDNA mogla poboljšati stratifikaciju rizika prije liječenja (Kurtz i sur., 2018.).

#### **4.4.3. ctDNA kao biljeg odgovora na liječenje u DLBCL-u**

Kod pacijenata s novodijagnosticiranim DLBCL-om, glavni tretman sastoji se od R-CHOP kemoterapije. Približno 60%-70% pacijenata koji su primili standardnu R-CHOP terapiju postiglo je izlječenje. Međutim, kod više od 30%-40% pacijenata nakon prve linije liječenja bolest postaje refraktorna ili recidivira, a većina tih pacijenata ima izuzetno loše ishode preživljenja. Za pacijente je cilj izbjeći relaps predviđanjem progresije bolesti. Odgovor na liječenje tijekom kemoterapije uglavnom ovisi o slikovnim alatima kao što je PET/CT. Međutim, slikovni alati dostupni u kliničkoj praksi ne mogu otkriti MRD tijekom ili nakon liječenja i rezultati nisu konzistentni s konačnim ishodom bolesti kod značajnog dijela pacijenta. Na primjer, IPI, COO fenotip ili TMTV uglavnom nisu pokazali korisnost za usmjeravanje liječenja kod DLBCL-a. Također, biopsija tkiva tijekom liječenja praktički je nemoguća (Lauer i sur., 2022.; Kim i sur., 2024.).

S druge strane, brojna istraživanja pokazuju da se koncentracija ctDNA brzo mijenja tijekom liječenja limfoma. Kvantitativna procjena ctDNA za sekvence gena imunoglobulinskih receptora u različitim vremenskim periodima tijekom liječenja i na kraju terapije pokazala se visoko prognostičkom u različitim serijama DLBCL-a te bi mogla prevladati navedena ograničenja konvencionalnih tehnika i poboljšati stratifikaciju rizika pacijenata (Alcoceba i sur., 2024.). Nekoliko većih studija, koristeći serijsko praćenje ctDNA pomoću CAPP-Seq, definiraju dvije referentne točke za procjenu takozvanog molekularnog odgovora tijekom standardne imunokemoterapije kod pacijenata s DLBCL-om. Navedene točke su smanjenje ctDNA za 2 logaritma nakon jednog ciklusa terapije, odnosno rani molekularni odgovor (engl. *early molecular response*, EMR) i smanjenje ctDNA za 2,5 logaritma nakon dva ciklusa terapije, odnosno značajni molekularni odgovor (engl. *major molecular response*, MMR). Pacijenti koji su postigli EMR i MMR imali su značajno bolji EFS i OS nego pacijenti bez smanjenja ctDNA za 2 ili 2,5 logaritma. Međutim, EMR i MMR i dalje su pogrešno klasificirali određene pacijente s DLBCL-om (Lauer i sur., 2022.; Kurtz i sur., 2018.). Kako bi se adresirao

složeni međuodnos prognostičkih varijabli prisutnih prije terapije s varijablama koje nastaju tijekom terapije, razvijen je sofisticirani personalizirani model predviđanja ishoda bolesti nazvan "kontinuirani individualizirani indeks rizika" (CIRI). U ovom matematičkom modelu dizajniranom za predviđanje kliničkih ishoda, standardne početne varijable (IPI, TMTV i COO fenotip) te istraživačke varijable (EMR, MMR) predviđaju pretretmansku vjerojatnost preživljenja. U usporedbi s svakom pojedinačnom komponentom, CIRI je pokazao superiornu sposobnost predviđanja ishoda bolesti nakon 24 mjeseca u usporedbi s konvencionalnim prognostičkim markerima. Ovi podatci naglašavaju potencijal ctDNA kao dinamičnog biljega koji može pratiti MRD tijekom terapije (Roschewski i sur., 2022.).

Osim toga, ctDNA ima potencijal biti koristan prognostički biljeg u novim terapijama DLBCL-a. CAR-T stanična terapija, odnosno terapija T-stanicama s kimernim antigenskim receptorom (engl. *chimeric antigen receptor T-cell*, CAR-T) pojavila se kao nova strategija za liječenje B-staničnih limfoma te je uvela nove izazove za stratifikaciju rizika i procjenu odgovora. Broj studija o ovoj ulozi ctDNA je mali, a najnovije studije pokazale su da koncentracija ctDNA prije i tijekom CAR-T stanične terapije može predvidjeti ishode liječenja, pri čemu je procjena četiri tjedna nakon liječenja najbolje predviđala ishode (Zou i sur., 2024.; Sworder i sur., 2023.). Visoke razine ctDNA prije liječenja bile su u korelaciji s lošijim PFS-om i OS-om. Ovi nalazi naglašavaju korisnost profiliranja ctDNA prije liječenja za stratifikaciju rizika pacijenata koji se razmatraju za CAR-T staničnu terapiju. Dinamika uklanjanja ctDNA tijekom CAR-T terapije imala je značajnu prediktivnu vrijednost za preživljenje, a povratak bolesti nakon terapije bio je povezan s trajnim otkrivanjem ctDNA jedan mjesec nakon infuzije stanica ili kasnije (Zou i sur., 2024.; Frank i sur., 2021.). Međutim, primjenu ctDNA u novim terapijama DLBCL-a potrebno je dalje istraživati.

#### **4.4.4. ctDNA nakon terapije u DLBCL-u**

Nadzorno praćenje DLBCL-a nakon terapije uz CT ili PET/CT nije se pokazalo učinkovitim za poboljšanje kliničkih ishoda niti isplativim kada se primjenjuje na sve pacijente u prvoj remisiji. Stoga se slikovne tehnike ne preporučuju za rutinsko praćenje limfoma nakon bolesti. Nasuprot tome, ctDNA omogućuje neinvazivno i serijsko praćenje MRD-a i limfoma nakon završetka terapije bez izlaganja zračenju. Prognostička vrijednost ctDNA i uloga u predviđanju ili detekciji relapsa istražene su u raznim studijama. Nekoliko neovisnih studija pokazale su da

serijsko praćenje pacijenata s DLBCL-om u potpunoj remisiji (engl. complete remission, CR), bilo IgHTS-om ili CAPP-Seq-om, olakšava detekciju ponovnog javljanja DLBCL-a u velikoj većini slučajeva, s prednošću od oko 3 do 6 mjeseci prije radiografskog snimanja. Također, neke studije izvijestile su o povoljnim kliničkim ishodima kod pacijenata s neotkrivenom ctDNA nakon završetka terapije DLBCL-a, koristeći tehnike temeljene na NGS-u (Lauer i sur., 2022.; Roschewski i sur., 2022.).

#### **4.4.5. CtDNA za praćenje klonalne evolucije u DLBCL-u**

U mnogim slučajevima, pojava novih subklonova tijekom vremena odražava proces klonalne selekcije pod pritiskom liječenja, posebno s ciljanim agensima. Različite studije otkrile su da se molekularni mehanizmi rezistencije u limfomu mogu neinvazivno otkriti profiliranjem ctDNA. Npr. genotipiziranjem ctDNA u DLBCL-u, koristeći ciljane NGS panele, detektirane su nove mutacije poput BTK C481S rezistencijske mutacije kod pacijenata koji su primali ibrutinib monoterapiju te mutacije u CD19, PAX5 i TP53 genima kod pacijenata koji su doživjeli relaps bolesti nakon CAR T-stanične terapije. Ovi podatci ističu važnost praćenja ctDNA nakon terapije u svrhu proučavanja klonalne evolucije limfoma i boljoj karakterizaciji rezistentne bolesti (Roschewski i sur., 2022.; Lauer i sur., 2022.).

#### **4.4.6. Epigenetske modifikacije cfDNA i potencijal u prognozi DLBCL-a**

Abnormalni obrasci metilacije otkriveni u cfDNA pokazali su se lošim prognostičkim čimbenikom za ukupno 5-godišnje preživljenje u DLBCL-u (Cirillo i sur., 2020.). Istraživanja pokazuju da gotovo 90% pacijenata s DLBCL-om ima metilirani supresorski gen DAPK1 (engl. death-associated protein kinase 1) pri čemu dolazi do njegovog utišavanja tijekom procesa tumorigeneze. Također, uočeno je da su pacijenti koji su preživjeli DLBCL, a imali su DAPK1 metiliranu cfDNA u vrijeme dijagnoze, izgubili aberantnu metilaciju nakon početka liječenja. Nasuprot tome, pacijenti koji su zadržali ili ponovno stekli aberantnu metilaciju DAPK1 ubrzo su umrli. Stoga se smatra da bi se kod pacijenata s aberantnom metilacijom DAPK1 gena u plazmatskoj cfDNA u vrijeme dijagnoze trebala i dalje pratiti metilacija DAPK1 tijekom liječenja. Ukoliko se razina metilacije poveća, potencijalno se mogu odabrati za liječenje relapsa. Od svih epigenetskih modifikacija, DAPK1 hipermetilacija predstavlja

najsnažniji prognostički faktor. Međutim, ovi rezultati trebaju biti potvrđeni studijama prije nego što se testiranje za metilaciju DAPK1 u cfDNA uvrsti u rutinsku kliničku praksu. Osim DAPK1, postoje i drugi tumor supresorski geni koji su često metilirani u DLBCL-u, poput DBC1, MIR34A i MIR34B/C (Kristensen i sur., 2014.; Kristensen i sur., 2016.). Također je pokazano da se kod pacijenata s DLBCL-om metilacija promotora prethodno navedenih gena često se javlja u kombinaciji s globalnom hipometilacijom. U tom istraživanju, globalna hipometilacija procijenila se analizom metilacije retrotranspozona LINE1 (engl. *long interspersed nuclear element-1*) pirosekvenciranjem. Mjerenje metilacije LINE1 je validirani marker globalne metilacije s potencijalom za jednostavnu kliničku primjenu (Wedge i sur., 2017.). Postoji indikacija za kombiniranje analize globalne hipometilacije i DAPK1 metilacije u prognostičkoj procjeni pacijenata s DLBCL-om jer prisutnost globalne hipometilacije identificira pacijente s posebno lošom prognozom, dok DAPK1 hipermetilacija, uz normalnu globalnu hipometilaciju, predstavlja srednju razinu rizika (Wedge i sur., 2017.). Nedavni nalazi prognostičkog značaja 5hmC-a u cfDNA kod pacijenata s DLBCL-om sugeriraju da 5hmC također može imati važnu ulogu u progresiji DLBCL-a te da buduće epigenetske studije trebaju uključiti i 5hmC kao stabilan i važan epigenetski biljeg u prognozi DLBCL-a (Chiu i sur., 2019.).

#### **4.4.7. MiRNA u dijagnozi, prognozi i praćenju DLBCL-a**

Postoje mnogi dokazi da specifične miRNA karakteriziraju DLBCL te bi se mogle koristiti za njegovu dijagnozu. Abnormalna ekspresija miRNA česta je u DLBCL-u te ova vrsta limfoma pokazuje najheterogenije profile miRNA među svim proučavanim limfomima. Trenutno je proučeno više različitih cirkulirajućih miRNA u DLBCL-u, a devet specifičnih miRNA ispitano je u više studija, uključujući miR-21, miR-155, miR-210, miR-15a, miR-29c, miR-494, miR-34a, miR-145 i miR-379. Studije potvrđuju da su dvije miRNA povišene u slučajevima DLBCL-a u usporedbi s njihovim koncentracijama kod zdravih ljudi, a to su miR-21 i miR-155. Stanice u DLBCL-u pokazale su 10 do 30 puta više kopija miR-155 nego normalne cirkulirajuće B-stanice. S druge strane, koncentracije miR-145 i miR-379 bile su smanjene kod pacijenata s DLBCL-om. Također, miR-21, miR-155 i miR-221 imale su povećanu ekspresiju u ABC podtipu DLBCL-a u odnosu na GCB podtip što ukazuje da bi ove miRNA mogle biti potencijalni dijagnostički i prognostički biljeg kod DLBCL-a. Iako su ovi rezultati obećavajući, objavljeni dokazi o ekspresiji miRNA u DLBCL-u vrlo su ograničeni i potrebne su daljnje



studije. Trenutno je samo miR-21 postigla konzistentne rezultate te je jedino ona prepoznata kao potencijalni dijagnostički biljeg za DLBCL (Lopez-Santillan i sur., 2018.; Shi i sur., 2020.; Jørgensen i sur., 2020.).

MiRNA je proučavana i u kontekstu prognoze DLBCL-a. U jednoj studiji, visoka razina ekspresije miR-21 bila je povezana s duljim preživljenjem bez relapsa (engl. *relapse-free survival*, RFS). Nadalje, u nekoliko različitih studija pokazano je da su prekomjerne ekspresije miR-155, miR-125b, miR-146a, miR-18a, miR-222 bile povezane s lošom prognozom, a prekomjerne ekspresije miR-20a/b, miR-93 i miR-106a/b povezane su s višim mortalitetom kod DLBCL-a. Također, povećane ekspresije miR-224, miR-34a, miR-199a i miR-497 i smanjene ekspresije miR-27b, miR-146b-5p i miR-320d, miR-197 povezane su s lošijom prognozom bolesti. Iako je identificiran niz prognostičkih miRNA, njihova prognostička učinkovitost i pitanje može li se primijeniti na prognostički model za točno razvrstavanje pacijenata ostaju nejasni (Lopez-Santillan i sur., 2018.; Shi i sur., 2020.; Lv i Liu, 2021.).

MiRNA je proučavana i kao prediktivni biljeg odgovora na R-CHOP terapiju kod DLBCL pacijenata. Povećana ekspresija miR-455-3p i miR-33a bila je povezana s kemosenzitivnošću, dok je povećana ekspresija miR-224, miR-1236 i miR-520d-3p bila povezana s kemorezistencijom. Stoga su visoka ekspresija miR-224, miR-1236 i miR-520d-3p te niska ekspresija miR-455-3p i miR-33a bile pojedinačno povezane s nepovoljnim ishodom i lošom prognozom DLBCL-a te je predložen rezultat temeljen na ovih pet miRNA za predikciju kliničkog ishoda pacijenata liječenih R-CHOP terapijom, neovisno o IPI rezultatu. Ovi rezultati trebaju biti potvrđeni dodatnim studijama (Lopez-Santillan i sur., 2018.; Shi i sur., 2020.).

O ulozi miRNA u MRD-u prisutan je vrlo mali broj informacija. U nekim studijama, među pacijentima s DLBCL-om u CR, visoke razine miR-19b, miR-20a i miR-451 mogle su razlikovati pacijente s ostatnom bolesti od pacijenata bez ostatne bolesti. Osim toga, studije su otkrile da je moguće detektirati promjene u razinama serumske miR-130a i miR-125b kod pacijenata s DLBCL-om u kliničkoj dijagnozi recidiva ili tijekom napredovanja bolesti (Lv i Liu, 2021.).

Naposlijetku, DLBCL je povezan s virusnim infekcijama kao što je EBV i HIV. EBV infekcija utječe na profil miRNA, a miR-155 je se najviše proučavani biljeg u EBV-pozitivnom DLBCL-u. Ekspresija miR-155 bila je veća u EBV-pozitivnom DLBCL-u te su EBV-pozitivni pacijenti pokazali više razine serumske miR-155 nego EBV-negativni pacijenti. U jednoj studiji, najveću ekspresiju imala je miR-424, dok su kod starijih pacijenata, miR-146b i miR-222 pokazale

visoku specifičnost za identificiranje pacijenata s EBV-pozitivnim DLBCL-om. Također, DLBCL je najčešći limfom povezan s HIV-infekcijom, odnosno sindrom stečene imunodeficijencije (AIDS). Javlja se u uznapredovalom stadiju AIDS-a, uglavnom zbog imunokompromitiranosti pacijenta, te zahvaća ektranodalna tkiva. MiRNA imaju ključnu ulogu u razvoju i progresiji HIV-povezanog DLBCL-a. Istraživanja su pokazala prekomjernu ekspresiju miR-17-92 klastera kod pacijenata s HIV-povezanim DLBCL-om. Naknadne studije podržavaju određivanje koncentracija cirkulirajućih miR-21, miR-122 i miR-223 za razlikovanje HIV-pozitivnih i negativnih osoba, a više koncentracije serumske miR-222 također mogu služiti kao dijagnostički biljeg za ranije otkrivanje HIV-povezanog DLBCL-a (Shi i sur., 2020.).

#### **4.4.8. LncRNA u dijagnozi, prognozi i terapijskom praćenju DLBCL-a**

Četrdeset i jedna studija istraživala je profil lncRNA kod pacijenata s DLBCL-om. U nekim studijama ekspresija lncRNA PEG10 i LUNAR1 bila je povišena, dok je ekspresija lncRNA PANDA bila značajno snižena. U istraživanju je zaključeno da ove tri lncRNA mogu biti dijagnostički biljezi za razlikovanje pacijenata s DLBCL-om od zdravih pojedinaca (Shi i sur., 2020.; Khanmohammadi i Fallahtafti, 2023.).

Velik broj lncRNA povezan je i s prognozom bolesti. Na primjer, u plazmi bolesnika s DLBCL-om, povećanu ekspresiju imale su lncRNA poput HOTAIR, HOTTIP, PEG10, LUNAR1, HULC, TUG1, TRIM52-AS1, TRERNA1, CACNA1G-AS1 i SNHG16 i ostale, dok su smanjenu ekspresiju imale NONHSAT120161, GAS5, OR2A1-AS1 i PANDA i ostale. LncRNA XIST imala je kontradiktorne rezultate. Navedene lncRNA povezane su s OS, PFS i preživljenjem bez bolesti (engl. *disease-free survival*, DFS) (Khanmohammadi i Fallahtafti, 2023.).

LncRNA bi mogle biti i biljezi odgovora na terapiju. Visoka ekspresija lncRNA TUC338, PEG10, HULC, HOTTIP i HOTAIR i niska ekspresija lncRNA GAS5 povezane su s lošim odgovorom na R-CHOP terapiju kod pacijenata s DLBCL-om (Khanmohammadi i Fallahtafti, 2023.). Naposljetku, bitno je naglasiti da je broj članaka koji proučavaju specifične profile lncRNA u DLBCL-u ograničen i rezultati studija su heterogeni. Stoga je lncRNA kao biljeg u DLBCL-u potrebno dodatno istražiti.

#### 4.4.9. Egzosomi u dijagnozi, prognozi i terapijskom praćenju DLBCL-a

Egzosomi mogu sadržavati velik broj informacija, uključujući nukleinske kiseline i proteine. Istraživanja su pokazala da je razina ekspresije miR-451a u serumskim egzosomima značajno smanjena u grupi s DLBCL-om u usporedbi s kontrolnom grupom te su razine ekspresije egzosomalne miR-451a imale umjerenu dijagnostičku učinkovitost u DLBCL-u (Lv i Liu, 2021.). Jedna studija identificirala je panel od pet miRNA u cirkulirajućim egzosomima (miR-379-5p, miR-135a-3p, miR-4476, miR-483-3p i miR-451a) koje se mogu koristiti kao neinvazivni biljezi za dijagnostiku DLBCL-a. Međutim, panel nije dobro razlikovao bolesnike s DLBCL-om od bolesnika s ostalim podtipovima limfoma (Cao i sur., 2022.).

Što se tiče prognoze, pokazalo se da je povećana ekspresija miR-99a-5p i miR-125b-5p u serumskim egzosomima pacijenata s DLBCL-om povezana s kraćim PFS-om, dok je smanjena ekspresija egzosomalnih miRNA-107 i miR-451a ukazivala na lošu prognozu DLBCL-a (Decruyenaere i sur., 2021.; Yazdanparast i sur., 2022.). Osim toga, povećana ekspresija proteina karboanhidraze 1 (CA1) u serumskim egzosomima povezana je s lošijim PFS-om i IPI vrijednošću (Lv i Liu, 2021.).

Neke studije pokazuju da bi miR-155 u egzosomima mogao biti potencijalni biljeg za predviđanje odgovora na terapiju jer su pacijenti koji su primali R-CHOP terapiju i razvili rrDLBCL imali više egzosoma i egzosomalne miR-155 od pacijenata koji su reagirali na terapiju. Stoga bi prekomjerna ekspresija egzosomalnog miR-155 kod pacijenata s rrDLBCL-om mogla biti povezana s agresivnijom bolešću, lošim odgovorom na R-CHOP terapiju i nepovoljnom prognozom (Lv i Liu, 2021.; Zare i sur., 2019.). Također, koncentracija egzosomalnih miR-99a-5p i miR-125b-5p bila je značajno viša kod kemorezistentnih pacijenata s DLBCL-om u usporedbi s kemosenzitivnim pacijentima. Smatra se da bi određivanje egzosomalne ekspresije miR-99a ili miR-125b-5p, u kombinaciji s IPI, moglo poslužiti u predviđanju odgovora na R-CHOP terapiju (Ofori i sur., 2021.). Egzosomalna miR-451a također je potencijalni biljeg u terapijskom praćenju. U nekoliko studija dokazano je da se njezina razina ekspresije postupno povećava kod pacijenata koji su postigli remisiju (Cao i sur., 2022.).

Također, analizirana je i mRNA u egzosomima kod pacijenata s DLBCL-om. Proučavane su razlike u detekciji mRNA između uzoraka prije i nakon terapije rituksimabom kod istog pacijenta. Kod uzoraka prije početka liječenja, pacijenti s prvim relapsom ili progresijom

bolesti imali su manju koncentraciju egzosomalnih PTEN i BCL-XL mRNA u trenutku dijagnoze DLBCL-a. Pacijenti koji su imali prisutne egzosomalne BCL-6 i c-MYC mRNA pri dijagnozi imali su kraće OS od pacijenata bez navedenih mRNA. Uspoređujući egzosomalne mRNA u uzorcima prije i nakon liječenja rituksimabom zaključeno je da su AKT i BCL-6 mRNA povezane s izostankom odgovora na liječenje. S druge strane, kod pacijenata koji su imali dobar odgovor na terapiju, prisutnost AKT mRNA bila je povezana s kraćim PFS-om, a prisutnost c-MYC i BCL-6 mRNA s lošijim OS-om. Ova saznanja pokazuju da bi se mRNA u egzosomima mogla koristiti kao prediktor prognoze DLBCL-a, ali i prediktor nemogućnosti postizanja potpunog odgovora s terapijom prve linije liječenja. Međutim, istraživanja egzosomalne mRNA u tekućoj biopsiji DLBCL-a su ograničena (Provencio i sur., 2017.).

Osim RNA, nedavne studije usredotočile su se i na potencijal egzoDNA kao biljega tekuće biopsije u DLBCL-u. Primijećena je prisutnost DNA u plazmatskim egzosomima pacijenata s DLBCL-om te je otkriveno da su CDKN2A i CDKN2B geni metilirani i u egzoDNA i u uzorcima primarnog tumorskog tkiva. Zaključeno je da plazmatski egzosomi pakiraju DNA iz primarnih tumora, a oni koji sadrže dvostruko metilirane DNA na CDKN2A i CDKN2B genima mogu doprinijeti patogenezi bolesti te bi se mogli koristiti kao neinvazivni biljezi u dijagnozi i progresiji DLBCL-a (Baris i sur., 2021.; Tatischeff, 2023.).

#### **4.5. Primarni B-velikostanični limfom središnjeg živčanog sustava (engl. *primary central nervous system lymphoma, PCNSL*)**

PCNSL je rijetka je bolest koja čini oko 4% primarnih tumora SŽS-a, a ograničena je na mozak, oči, leptomeninge i u rijetkim slučajevima leđnu moždinu, bez znakova zahvaćenosti limfnih čvorova i drugih organa. Češće se viđa u imunokompomitiranih pacijenata, posebice HIV pozitivnih (McKenzie i sur., 2020.; Baraniskin i Schroers, 2021.). Prema novoj klasifikaciji SZO-a iz 2022., PCNSL je obuhvaćen u B-velikostaničnom limfomu imunološki privilegiranih sijela (Alaggio i sur., 2022.). Česti simptomi PCNSL-a su povišen intrakranijalni tlak, fokalni neurološki deficit, neuropsihijatrijski simptomi, toničko-klonički grčevi i poremećaji vida (Labar i sur., 2017.). DLBCL je najčešći tip PCNSL-a (oko 95%), dok približno 5% čine T-stanični limfomi, MZL, BL i limfoblastični limfom. Opisani su različiti patogeni mehanizmi u PCNSL-u, uključujući disregulacije u signalnim putovima NF- $\kappa$ B, JAK/STAT, Toll-like receptorima i B-staničnim receptorima. Često patogenezi doprinose mutacije u specifičnim

genima, uključujući MYD88 (35-80%), PIM1 (69%), TBL1XR1 (24%), TRDM1 (24%), BTG2 (29%) i PRDM1 (24%) (Baraniskin i Schroers, 2021.).

U usporedbi DLBCL-om, PCNSL pokazuje invazivniji obrazac rasta i lošiju prognozu, posebice kod starijih pacijenata i pacijenata s relapsom ili refraktornom bolesti. Ako se PCNSL ne liječi unutar 6 tjedana od dijagnoze, obično nastupa smrtni ishod. Stoga je pravovremena dijagnostika PCNSL-a od iznimne važnosti (Labar i sur., 2017.; Baraniskin i Schroers, 2021.). MR SŽS-a je preferirana slikovna metoda u dijagnostici PCNSL-a, ali ne može dijagnosticirati PCNSL. Nadalje, citomorfologija i analiza cerebrospinalne tekućine (likvor) protočnom citometrijom dovoljne su za pouzdanu dijagnozu u samo oko 15% slučajeva. Za sve ostale slučajeve, konačna dijagnoza se još uvijek mora postići stereotaktičkom biopsijom mozga, uz histopatologiju i imunohistokemijsko bojenje. Stereotaktička biopsija je izazovna i traumatična, s prijavljenom stopom neuspjeha do 35%. Također, prijavljeno je da se u oko 1% postupka javljaju komplikacije uključujući hematome, konvulzije, cerebralni edem pa čak i smrtnost povezanu s biopsijom. Osim u dijagnozi, problem se javlja i u procjenu odgovora na liječenje koja se oslanja na slikovne tehnike, najčešće MR, koje nisu učinkovite u procjeni PCNSL-a. Zbog navedenih problema postoji potreba za neinvazivnim tehnikama poput tekuće biopsije koje bi pomogle u dijagnozi i procjeni odgovora na liječenje pacijenata s PCNSL-om (Baraniskin i Schroers, 2021.; Zhong i sur., 2024.).

#### **4.5.1. CtDNA u likvoru i plazmi pacijenata s PCNSL-om**

Za analizu ciljnih mutacija u ctDNA kod pacijenata s PCNSL-om najčešće su korištene visoko osjetljive metode ddPCR i NGS, a mutacije se mogu otkriti u ctDNA dobivenoj iz seruma, plazme ili likvora. Najčešća mutacija koja se javlja je MYD88 (*engl. myeloid differentiation primary response 88*) L265P, a prisutna je u više od 80% pacijenata s PCNSL-om te se smatra molekularnim biljekom za PCNSL (Poynton i Okosun, 2021.). MYD88 L265P mutacija povezana je s lošom prognozom, posebno kod starijih pacijenata. Ova mutacija je rjeđa u sistemskom DLBCL-u (čini oko 30% mutacija u DLBCL-u) i nikada nije pronađena u tkivnim biopsijama primarnih tumora mozga, posebno glioblastoma i metastazama mozga iz solidnih tumora. Stoga je MYD88 L265P mutacija osjetljiv i specifičan biljeg za razlikovanje PCNSL-a od drugih tumora mozga (Baraniskin i Schroers, 2021.; Nayak i sur., 2024.).

Važno pitanje u tekućoj biopsiji PCNSL-a jest je li za detekciju specifičnih mutacija u ctDNA bolji uzorak plazme ili likvora? Istraživanja pokazuju da je ctDNA iz SŽS-a prisutna u višim koncentracijama u likvoru u odnosu na plazmu kod pacijenata sa SŽS tumorima. Vjerojatno razlog leži u tome što je likvor u direktnom kontaktu s tumorskim stanicama (Baraniskin i Schroers, 2021.). Štoviše, krvno-moždana barijera sprječava oslobađanje ctDNA u krvotok pa je koncentracija ctDNA u krvi preniska da bi se detektirala. Također je prijavljena relativno niska frekvencija MYD88 mutacija u ctDNA iz plazme u usporedbi s tumorom tkiva. Nasuprot tome, osjetljivost za detekciju MYD88 L265P mutacije u likvoru općenito je viša (63,5%–92%) (Nayak i sur., 2024.). Analiza ctDNA u likvoru mogla bi dati korisne rezultate jer je u likvoru ona gotovo isključivo tumorskog podrijetla (ctDNA). Studije su pokazale da je detekcija ctDNA u likvoru osjetljivija od konvencionalne protočne citometrije za detekciju recidiva PCNSL-a. Zaključeno je da je likvor pouzdaniji izvor ctDNA od plazme za praćenje mutacija specifičnih za PCNSL, ali treba uzeti u obzir da su lumbalne punkcije invazivnije od rutinskog vađenja krvi (Baraniskin i Schroers, 2021.; Poynton i Okosun, 2021).

#### **4.5.2. MiRNA u likvoru i serumu pacijenata s PCNSL-om**

Unatoč rijetkosti bolesti, objavljeno je dosta studija koje se bave potencijalnom ulogom miRNA u PCNSL-u. U jednoj studiji pokazano je da su koncentracije miR-21, miR-19b i miR-92a bile značajno povišene u likvoru pacijenata s PCNSL-om u odnosu na koncentracije u likvoru kod pacijenata s drugim neurološkim poremećajima. U skladu s tim, predložen je dijagnostički model temeljen na analizi ove tri miRNA (miR-21, miR-19 i miR-92a). Ovakav model analiziranja triju miRNA u likvoru predstavljao je pouzdan dijagnostički biljeg za PCNSL, s dijagnostičkom osjetljivošću od 95,7% i specifičnošću od 96,7%. Ova otkrića potvrđena su i u drugim studijama s većom kohortom pacijenata. Štoviše, koncentracije gore spomenutih miRNA u likvoru bile su značajno povezane sa statusom PCNSL-a tijekom terapije i/ili praćenja bolesti, što pokazuje njihov potencijal kao biljega za praćenje bolesti i liječenja (Baraniskin i Schroers, 2021.). S druge strane, neke tumor supresorske miRNA (kao što su miR-199a, miR-214, miR-193b i miR-145) imale su sniženu ekspresiju u PCNSL-u (Steffanoni i Calimeri, 2021.).

Što se tiče uzorka periferne krvi, koncentracije miR-21 u serumu bile značajno više kod pacijenata s PCNSL-om u usporedbi sa serumom kontrolnih pacijenata (zdravi ljudi, pacijenti

s glioblastomom, upalom SŽS-a i metastazama mozga). Nadalje, povišene serumske koncentracije miR-21 mogle su točno razlikovati PCNSL od uobičajenih tumora mozga, uključujući glioblastom. Korelacijska analiza miR-21 u uparenim uzorcima seruma i likvora također je pokazala pozitivnu korelaciju ekspresije miRNA-21 u serumu i likvoru (Mao i sur., 2014.). Međutim, analiza miRNA iz uzorka krvi je kontroverza, s obzirom postoje studije koje nisu pronašle značajne razlike u serumskoj miRNA između pacijenata s PCNSL-om i kontrolnih pacijenata (Baraniskin i Schroers, 2021.). Stoga je serumsku miRNA kao specifični dijagnostički biljeg potrebno detaljnije istražiti.

#### **4.6. Folikularni limfom (engl. *follicular lymphoma*, FL)**

FL je drugi najčešći tip NHL-a, koji čini gotovo 30% svih limfoma. FL je spororastući B-stanični limfoproliferativni poremećaj i u većini slučajeva je prisutna translokacija t(14;18)(q32;q21) koja dovodi do povećane ekspresije antiapoptotičkog proteina BCL2. Oko 5% FL-a ima mutacije koje dereguliraju BCL-6 protein koji je neophodan za formiranje germinativnog centra. (Kaseb i sur., 2024.).

Najčešći je indolentni limfom s relativno povoljnim tijekom. Suvremene terapije često postižu duge remisije, s medijanom preživljenja koji se približava 20 godina. Međutim, 15-20% pacijenata pokazuje refraktornu bolest ili relaps tijekom prve dvije godine nakon prve linije liječenja. Ovi pacijenti imaju loš ishod, s petogodišnjim preživljenjem između 38% i 50% te zahtijevaju više linija liječenja. Osim toga, kod oko 3% pacijenata godišnje javlja se transformacija FL-a u različite agresivne oblike NHL-a (DLBCL, Burkittov limfom, akutnu limfoblastičnu leukemiju B-stanica itd.) (Kaseb i sur., 2024.; Jiménez-Ubieto i sur., 2023.). Histološka transformacija FL-a u DLBCL predstavlja klinički izazov jer transformirana bolest može biti radiografski nejasna ili neprikladna za biopsiju (Schroers-Martin i sur., 2023.). Zbog mogućnosti relapsa i refraktorne bolesti te transformacije u agresivni oblik limfoma, potrebna je točna stratifikacija rizika pacijenta i prepoznavanje onih s visokim rizikom što je ponekad vrlo teško. Stoga postoji stalni interes i rasprava o vrijednosti tekuće biopsije u prognostičkoj procjeni FL-a.

#### 4.6.1. CtDNA i cfDNA u prognozi i praćenju terapije FL-a

Koncentracija ctDNA u perifernoj krvi značajno je niža u FL-u u usporedbi s agresivnim limfomima poput DLBCL-a. Stoga se koriste visoko osjetljivi dijagnostički testovi kao što je clonoSEQ i ddPCR za njenu detekciju. Uglavnom se prate BCL2-IGH preuređenja i VDJ klonotipovi. Koristeći NGS za otkrivanje VDJ mutacija u uzorcima plazme, otkriveno je da su visoke koncentracije ctDNA u vrijeme dijagnoze povezane su s značajno kraćim PFS-om kod pacijenata s FL-om (Poynton i Okosun, 2021.; Bou Zerdan i sur., 2023.). Slično tome, koristeći ddPCR za otkrivanje IgH preuređenja, pronađena je značajna korelacija između TMTV-a i cfDNA, s lošijim PFS-om kod pacijenata s visokim cfDNA i TMTV-om (Bou Zerdan i sur., 2023.). Druga studija procijenila je sposobnost serijskog praćenja ctDNA u perifernoj krvi kod neliječenih pacijenata s FL-om. Početna koncentracija ctDNA značajno je korelirala s TMTV-om na PET skenu, a serijsko praćenje ctDNA pokazalo je obrasce naglog povećanja koncentracije prije progresije. Kod pacijenata bez progresije, ukupno je zabilježen trend smanjenja koncentracije ctDNA tijekom vremena, a neotkrivena ctDNA korelirala je sa spontanom kliničkom regresijom kod nekih pacijenata (Distler i sur., 2021.).

Novija istraživanja pokazuju da procjena MRD-a pomoću ultra-dubokog NGS-a (kao što je LiqBio-MRD) također može pomoći u predviđanju kliničkih ishoda kod pacijenata s FL-om. LiqBio-MRD test pokazao je izvanrednu sposobnost identificiranja pacijenata s rizikom od progresije bolesti unutar 24 mjeseca (engl. *progression of disease within 24 months*, POD24) nakon samo četiri ciklusa R-CHOP terapije. Ovim testom procijenila se vrijednost ranog praćenja pacijenata na R-CHOP terapiji. Rano praćenje uključuje uzorke cfDNA iz prvog i drugog ciklusa liječenja. Kod MRD pozitivnih pacijenata, uočen je trend kraćeg PFS-a. Međutim, određeni broj MRD pozitivnih pacijenata kasnije je postao MRD negativan (u periodu od trećeg do šestog ciklusa R-CHOP liječenja). Ovo sugerira da je tijekom liječenja FL-a potrebno više vremena za uklanjanje tumora te da bi liječenje trebalo trajati duže u usporedbi s nekim drugim limfomima, poput DLBCL-a. Postizanje negativne ctDNA nakon liječenja poboljšava prognostičke informacije o ishodima pacijenata, kako u prvoj liniji liječenja, tako i kod relapsa. U ovoj studiji, procjena MRD-a koristeći NGS tehnike u kombinaciji s PET/CT-om identificirala je 100% pacijenata s POD24. Sve somatske mutacije smatrane su potencijalnim MRD biljezima. LiqBio-MRD tehnika u FL-u predstavlja obećavajuću opciju za rano identificiranje pacijenata s visokim rizikom od neuspjeha liječenja te je korisna metoda za prilagođavanje terapije (Jiménez-Ubieto i sur., 2023.).



Drugo istraživanje pokazalo je primjenu LiqBio-MRD u praćenju odgovora na CAR-T staničnu terapiju kod pacijenata s relapsiranim FL-om. Serijskom analizom ctDNA u krvi, pacijenti su postali MRD pozitivni u vrijeme ili čak prije relapsa bolesti. Stoga bi serijske procjene temeljene na ctDNA mogle biti održiva alternativa serijskim PET/CT snimanjima kod asimptomatskih pacijenata. Također, ovaj pristup mogao bi se koristiti i za identifikaciju pacijenata kojima su potrebne konsolidacijske terapije nakon CAR-T terapije (Jiménez-Ubieto i sur., 2023.).

Osim toga, gotovo svi pacijenti s FL-om nose molekularne promjene u barem jednom od gena regulatora epigenetike. Jedna od najčešćih mutacija je mutacija koja pojačava funkciju EZH2 gena (Nagy i sur., 2023.). Istraživanja pokazuju da se status EZH2 mutacije može dinamički mijenjati tijekom bolesti i pokazati značajne klonalne promjene. Istraživanja koja su detektirala mutacije u ctDNA pomoću ddPCR-a pokazala su da se frekvencija EZH2 mutacije mijenjala u skladu s tumorskim opterećenjem i odgovorom na imunokemoterapiju. To može biti vrijedan prediktivni biljeg za praćenje odgovora na terapiju kao što je tazemetostat, koji je u SAD-u nedavno odobren za liječenje relapsirajućeg i refraktornog FL-a (Poynton i Okosun, 2021.).

Nadalje, jedno istraživanje je tijekom praćenja FL-a pomoću ddPCR-a detektiralo EZH2 mutirane ctDNA fragmente i to 6 mjeseci prije kliničkog relapsa bolesti. Takva ctDNA nosila je identičnu EZH2 mutaciju koju je imala ctDNA u uzorku pacijenata s relapsom bolesti. Ovaj slučaj ukazuje na to da bi praćenje FL-a tekućom biopsijom moglo biti vrijedno u predviđanju budućih relapsa FL-a. Prema tom istraživanju, najbolja osjetljivost za analizu EZH2 mutacija može se postići paralelnim ispitivanjem uzoraka tekuće i tkivne biopsije, što može predstavljati optimalnu buduću strategiju probira za EZH2 mutacije u kliničkoj praksi (Nagy i sur., 2023.).

#### **4.6.2. CtDNA u predviđanju transformacije FL-a**

Usporedba uzoraka plazme i tumorskog tkiva kod pacijenata s transformiranim FL-om pokazala je da su u ctDNA iz uzroka plazme otkrivene nove somatske mutacije koje nisu identificirane pri dijagnozi bolesti te se transformacija FL-a mogla predvidjeti s visokom točnošću (s osjetljivošću od 83% i specifičnošću od 89%). Npr. mutacija u CARD11 i PIM1 genima otkrivene su isključivo u ctDNA iz krvi pacijenata prilikom dijagnoze FL-a, a kasnije su te mutacije identificirane i u tkivu tumora dobivenog biopsijom koja je obavljena nakon histološke transformacije FL-a u DLBCL (Scherer i sur., 2016.; Huet i sur., 2020.). Štoviše,

kod nekih pacijenata, mutacije specifične za transformaciju FL-a otkrivene su u ctDNA iz plazme čak i nekoliko mjeseci prije kliničke dijagnoze transformacije FL-a (u prosjeku 66 dana prije kliničke dijagnoze). Nadalje, više koncentracije ctDNA otkrivene su u transformiranom FL-u u odnosu na početni FL koji nije transformirao (Scherer i sur., 2016.; Kridel i sur., 2017.; Alcoceba i sur., 2022.). Ovi rezultati pokazuju ključne genomske razlike između FL-a i transformiranog FL-a te naglašavaju potencijal ctDNA kao neinvazivnog biljega za rano otkrivanje transformacije. Upravo zbog genomskih i molekularnih razlika, ovakve transformacije indolentnih B-staničnih limfoma izdvojene su kao zaseban entitet u novoj klasifikaciji limfoma iz 2022. (Alaggio i sur., 2022.). Potrebna je daljnja validacija i dodatne studije s većom kohortom pacijenata kako bi se procijenila klinička korisnost tekuće biopsije u ovom području.

#### **4.6.3. CTC u FL-u**

Kod velike većine pacijenata koji boluju od FL-a, CTC se otkrivaju prilikom dijagnoze bolesti. One mogu biti odraz tumorske mase i prediktor ishoda bolesti. Kada su prisutne u dovoljnoj količini, mogu se identificirati protočnom citometrijom. Pronađena je značajna korelacija između TMTV-a i CTC-a te je 4-godišnji PFS bio niži kod pacijenata koji su imali veći TMTV i više CTC-a u perifernoj krvi. Međutim, u usporedbi sa samim TMTV-om, nisu dobivene dodatne prognostičke informacije mjerenjem CTC-a te one nisu u fokusu istraživanja za praćenje i prognozu pacijenata s FL-om (Delfau-Larue i sur., 2018.).

#### **4.6.4. Egzosomi u praćenju terapijskog odgovora i transformacije FL-a**

Jedno istraživanje pokazalo je da pacijenti s prvim relapsom ili progresijom FL-a imaju nižu koncentraciju egzosomalnih PTEN i BCL-XL mRNA u uzorcima prije početka liječenja. Također, povišena ekspresija egzosomalnih BCL-6 i C-MYC mRNA u istim uzorcima bila je povezana s kraćim PFS-om i OS-om u usporedbi s pacijentima koji nisu imali navedene mRNA u egzosomima. Nadalje, povišena ekspresija BCL-6 i AKT mRNA povezana je s izostankom odgovora na terapiju rituksimabom. Ovo istraživanje pokazuje da bi mRNA u egzosomima mogla poslužiti kao prediktor nemogućnosti postizanja potpunog odgovora na terapiju rituksimabom (Provencio i sur., 2017.).

Druga studija provela je analizu mRNA iz egzosoma te proučavala može li ona poslužiti u praćenju bolesti. Pacijentu s FL-om koji nije odgovarao na terapiju bendamustinom i rituksimabom i kojem je biopsijom limfnog čvora i PET/CT nalazom potvrđena transformacija FL-a u DLBCL, uzorak krvi prikupljen je u vrijeme transformacije FL-a. Sekvenciranje egzosomske mRNA pokazalo je povećanu ekspresiju BCL2, FOXP1 i MYC gena za vrijeme transformacije FL-a. Stoga bi ekspresija navedenih gena u egzosomskoj mRNA mogla poslužiti kao biljeg za praćenje transformacije FL-a u DLBCL. Ovo je prva studija koja je proučavala serijske promjene u ekspresiji egzosomske mRNA dobivene iz seruma tijekom liječenja pacijenata s NHL-om, pa tako i FL-om, te pruža osnovu za daljnja istraživanja egzosomalne mRNA kao biljega u FL-u (Bang i sur., 2022.).

#### **4.6.5. MiRNA kao potencijalni biljeg FL-a**

Do danas nisu provedene studije koje bi istraživale razine miRNA u serumu ili plazmi kod pacijenata FL-om. Postoje brojne studije koje opisuju ekspresiju miRNA u uzorcima tumorskog tkiva dobivenog tkivnom biopsijom te njezin potencijal u dijagnozi, prognozi i praćenju FL-a. Usporedbom ekspresije miRNA u uzorcima tumorskog tkiva i periferne krvi (serum ili plazma) zaključeno je da korelacija između ova dva tipa uzorka nije nužno prisutna te se na temelju rezultata dobivenih iz tumorskog tkiva ne može zaključiti o ulozi miRNA u FL-u koja je dobivena tekućom biopsijom. MiRNA dobivena tekućom biopsijom ima potencijal biti dobar neinvazivni biljeg u prognostičkom praćenju bolesti, otkrivanju transformacije FL-a, diferencijalnoj dijagnozi FL-a od DLBCL-a (nastalog de novo ili transformacijom FL-a) i predviđanju odgovora na terapiju. Stoga bi istraživanja na ovu tematiku mogla biti od velikog interesa u budućnosti (Arzuaga-Mendez i sur., 2021.).

#### **4.7. Limfom plaštenih stanica (engl. *mantle cell lymphoma*, MCL)**

MCL je B-stanični limfom sastavljen od malih do srednje velikih atipičnih limfoidnih stanica B-imunofenotipa s nepravilnom jezgrom. U većini slučajeva nalazi se t(11;14)(q13;q32)/IgH-CCND1 translokacija koja rezultira prekomjernom ekspresijom ciklina D1, regulatornog proteina koji sudjeluje u progresiji stanica iz G1 u S fazu staničnog ciklusa, a tijekom progresije bolesti javljaju se dodatne mutacije kao što je mutacija u TP53 genu (Labar i sur. 2017.;

McKenzie i sur. 2020.). MCL je relativno agresivan limfom na kojeg otpada 6% svih limfoma. Teško se liječi zbog lošeg odgovora na konvencionalnu kemoterapiju te je povezan s pojavom recidiva tijekom vremena (Labar i sur., 2017.; Kumar i sur., 2021.). Nakon završetka prve linije liječenja i postizanja CR-a, pacijenti se prate, obično uz kliničke evaluacije svakih 3 do 6 mjeseci tijekom prvih 5 godina, uz povremeno nadzorno snimanje. Smatra se da praćenje MRD-a nakon liječenja može biti korisno u procjeni remisije i predviđanju kliničke pojave recidiva bolesti (Kumar i sur., 2021.). Stoga su istraživanja MCL-a uglavnom usmjerena na procjenu korisnosti tekuće biopsije u postterapijskom praćenju MRD-a.

#### **4.7.1. CtDNA u praćenju MRD-a i procjeni terapijskog odgovora kod MCL-a**

Korištenjem qPCR metoda koje ciljaju stereotipnu translokaciju t(11;14)(q13;q32), detektabilna translokacija nakon prve linije terapije opetovano je povezana s kraćim PFS-om, kako kod konvencionalnih tretmana tako i kod intenzivnih režima. Ovaj pristup značajno je doprinio uključivanju visokih doza citarabina u prvu liniju liječenja MCL-a. Nakon šest ciklusa naizmjenične R-DHAP (rituksimab, deksametazon, visoka doza citarabina i cisplatin) i R-CHOP terapije, udio pacijenata koji su bili MRD-negativni gotovo se udvostručio (Hermine i sur., 2016.; Schroers-Martin i sur., 2023.). Nadalje, sekvenciranjem imunoglobulinskih rekombinacija u ctDNA pomoću NGS-a uočeno je da je kontinuirana detekcija ctDNA u serumu nakon jednog ciklusa liječenja povezana s lošijim PFS-om, a kontinuirana detekcija ctDNA u serumu nakon dva ciklusa liječenja i na kraju terapije s lošijim PFS-om i OS-om (Lakhotia i sur., 2022.). NGS također ima bitnu ulogu u otkrivanju MRD-a iz uzorka seruma ili plazme. Nekoliko istraživanja je pokazalo da se tijekom MCL-a vrlo često javlja spontana remisija na molekularnoj razini, koja se klinički vrlo teško i rijetko opaža. Longitudinalnim praćenjem MRD-a pomoću ctDNA ustanovljeno je da je većina slučajeva molekularne remisije povezana s MRD-pozitivnošću, odnosno prisutnošću preraspodjele IgH gena (Kumar i sur., 2021.; Juang i sur., 2020.). U jednoj studiji, serijskim praćenjem ctDNA u serumu nakon inicijalne kemoterapije u velikom broju slučajeva potvrdilo je molekularni relaps mjesecima prije kliničkog relapsa (Lakhotia i sur., 2022.). Ove spoznaje ukazuju na važnost tekuće biopsije i MRD praćenja kod pacijenata s MCL-om te da su daljnja istraživanja ctDNA opravdana i poželjna u ovoj vrsti limfoma.

Uz to, kombinacija ibrutiniba i venetoklaksa vrlo je učinkovita terapija u liječenju MCL-a. Međutim, određeni postotak pacijenata ima primarnu otpornost na ovu kombinacijsku terapiju te se kod njih može javiti relaps. Stoga su potrebne strategije za procjenu terapijskog odgovora i odabira pacijenata za ovu vrlo učinkovitu kombinacijsku terapiju. ctDNA, dobivena tekućom biopsijom, omogućuje neinvazivnu karakterizaciju genskih mutacija koje upravljaju odgovorom na liječenje. Jedna studija otkrila je genske profile koji jasno razdvajaju one koji reagiraju na terapiju od onih koji ne reagiraju. Analizom ctDNA u plazmi dokazano je da su mutacije u ATM genu prisutne kod većine pacijenata koji su postigli potpuni terapijski odgovor, dok su delecija kromosoma 9p21.1–p24.3 (ova regija bogata je brojnim genima, s potencijalnim onkogenima i tumor supresorima uključujući JAK2, SMARCA2, MTAP i CDKN2A/B) i/ili mutacije u genima koji kodiraju komponente SWI–SNF kompleksa za remodeliranje kromatina bile prisutne kod svih pacijenata s primarnom rezistencijom na ibrutinib i venetoklaks i kod dvije trećine pacijenata s relapsom bolesti (Agarwal i sur., 2019.).

#### **4.8. Limfom marginalne zone (engl. *marginal zone lymphoma*, MZL)**

MZL predstavlja skupinu heterogenih, rijetkih, indolentnih B-staničnih limfoma koji nastaju iz B-limfocita marginalne zone limfnih čvorova i ekstranodlanog limfnog tkiva slezene i sluznica. Prema SZO, može se podijeliti u 4 različita patohistološka entiteta u odraslih: MALT, splenični, nodalni i primarni kožni MZL. Mogu biti povezani s različitim kroničnim infekcijama (npr. infekcija s *H. pylori*, HCV, *Campylobacter jejuni*, itd.) i autoimunim bolestima (npr. reumatoidni artritis, Sjorgenov sindrom i sistemski erimatozni lupus). Iako je odgovor na početnu terapiju često povoljan, bolest je karakterizirana čestim recidivima (Labar i sur., 2017.; Tatarczuch i sur., 2023.).

##### **4.8.1. CtDNA u prognozi MZL-a i praćenju rezistencije na terapiju**

U nedavnoj studiji, u plazmatskoj ctDNA detektirane su mutacije u ključnim signalnim putovima povezanim s MZL-om (NF-KB, NOTCH i BCR). Utvrđeno je da su mutacije MYD88 i TNFAIP3 gena povezane s duljim PFS-om, dok su KMT2D mutacije bile povezane s kraćim PFS-om. Također, identificirane su mutacije u PLCG2 i BTK genima koje su stečene tijekom terapije BTK inhibitorom (zanubrutinibom). Ove mutacije bile su odgovorne za

otpornost na BTK inhibitore te su povezane s progresijom bolesti tijekom studije (Tatarczuch i sur., 2023.). Mogućnost praćenja molekularnih promjena u ctDNA u stvarnom vremenu omogućuje brže i bolje strategije liječenja, što potencijalno poboljšava ishode pacijenata s relapsirajućim ili refraktornim MZL-om.

#### **4.9. Burkittov limfom (engl. *Burkitt lymphoma*, BL)**

BL je agresivni B-stanični limfom vrlo brzog tijeka koji se povijesno dijelio u tri kliničko-epidemiološka oblika: endemski BL (koji se javlja u ekvatorijalnoj Africi i Novoj Gvineji u djece inficirane s *Plasmodium falciparum* i EBV-om), sporadični BL (javlja se u drugim dijelovima svijeta) i imunodeficijencijski BL (javlja se u imunokompromitiranih osoba, često inficiranih HIV-om) (Labar i sur., 2017.). Prema novoj SZO klasifikaciji hematolimfoidnih tumora, BL se preporuča klasificirati u EBV-pozitivni i EBV-negativni BL (Alaggio i sur., 2022.). To je bolest koja se najčešće javlja u djece i mlađoj odrasloj dobi, a rjeđe se može pojaviti i kod starijih odraslih osoba (Labar i sur., 2017.). Ključna molekularna značajka svih podtipova BL-a je c-MYC translokacija koja postavlja c-MYC gen u blizinu bilo kojeg od tri imunoglobulinska gena (IGH, IGK ili IGL). Ova translokacija je teoretski idealna meta za dijagnozu BL-a iz plazmatske ctDNA (Chamba i sur., 2023.).

##### **4.9.1. Potreba za studijama o ctDNA u dijagnozi i praćenju liječenja BL-a**

BL se smatra najbrže rastućim ljudskim tumorom te je smrtonosan ukoliko se ne liječi. Rutinski se liječi u više od 90% slučajeva dijagnosticiranih u visokorazvijenim zemljama, dok su stope izlječenja značajno niže, oko 30–50%, za slučajeve dijagnosticirane u subsaharskoj Africi (SSA). Glavni razlog za loš ishod bolesti u SSA je kašnjenje u dijagnozi, zbog čega se BL često dijagnosticira tek u uznapredovaloj fazi bolesti. Konvencionalna dijagnoza limfoma histopatološkim putem zahtijeva invazivnu EB tkiva ili biopsiju širokom iglom, a zatim histopatološki pregled. Specijalističke usluge za ove postupke ograničene su u područjima SSA, gdje postoji manje od jednog anatomsko-patološkog stručnjaka na milijun ljudi. Čak i tamo gdje su usluge dostupne, postoji problem s kontrolom kvalitete zbog velikog opterećenja u zdravstvenim ustanovama te nedostatka visokokvalitetne, dobro održavane opreme i automatiziranih sustava. Ovi nedostaci rezultiraju kašnjenjima u dijagnozi, pogrešnim

dijagnozama, pogrešnim izborom liječenja i nepotrebnoj smrtnosti. Tekuća biopsija, putem genotipizacije ctDNA u plazmi, omogućuje brzo, neinvazivno, jeftinije i jednostavnije testiranje bolesnika te predstavlja atraktivnu opciju za ubrzanje dijagnoze BL-a i praćenje MRD statusa u SSA područjima. Visoko osjetljive metode poput NGS-a mogle bi poslužiti za otkrivanje c-MYC translokacija koristeći ctDNA iz plazme što bi imalo korist ne samo u dijagnostici, nego i u diferencijaciji EBV-pozitivnog od EBV-negativnog BL-a. Osim c-MYC translokacije, rekurentne somatske mutacije povezane s patogenezom BL-a, uključujući SNV-ove, insercije i delecije u c-MYC, BCL7A, BCL6, DNMT1, SNTB2, CTCF, ID3, SMARCA4, KMT2D, TCF3, TP53, DDX3X, ARID1A, CCNF i RHOA genima, mogle bi se koristiti za dijagnozu i diferencijaciju BL-a. Nadalje, određivanje koncentracije ctDNA jednostavnom tekućom biopsijom mogla bi poslužiti kao alternativna mjera tumorskog opterećenja koja se može koristiti za praćenje odgovora na terapiju u SSA, gdje su PET/CT skenovi skupi i ograničeni. Iz svega navedenog zaključujemo da su studije za procjenu potencijalne uloge ctDNA u dijagnostici i praćenju odgovora na liječenje BL-a prijeko potrebne. Nacionalni institut za istraživanje zdravlja i skrbi u Velikoj Britaniji (engl. *The National Institute for Health and Care Research*, NIHR) financirao je multicentrično istraživanje u Ugandi i Tanzaniji koje će procijeniti ovaj ctDNA potencijal, a početni rezultati očekuju se tijekom ove godine (Chamba i sur., 2023.).

#### **4.10. Hodgkinov limfom (engl. *Hodgkin lymphoma*, HL)**

HL je zloćudni tumor limfnog tkiva koji se najčešće razvija u cervikalnim limfnim čvorovima i obično zahvaća adolescente i mlade odrasle osobe (Velasco-Suelto i sur., 2024.). Dijagnoza se postavlja na temelju karakteristične histološke slike uz obvezan nalaz velikih mononuklearnih Hodgkinovih ili multinuklearnih Reed-Sternbergovih stanica (Labar i sur., 2017.). Genotipizacija HL-a korištenjem metoda baziranih na tkivu je otežana zbog niske celularnosti HL-a (broj HSt i RS stanica u uzorku tkiva često iznosi samo 1%). Za molekularno profiliranje ovih stanica, koristi se laserska mikrodisekcija i protočna citometrija koje obogaćuju uzorke tkiva stanicama i time omogućuju lakšu genotipizaciju. Međutim, ove metode su tehnički vrlo zahtjevne, teško ih je primijeniti u kliničkoj praksi te su uspjele profilirati vrlo mali broj HL genoma do danas. Stoga se sve više pažnje posvećuje istraživanjima koja se fokusiraju na genotipizaciju HL-a pomoću metoda tekuće biopsije (Cirillo i sur., 2020.; Lim i Jeon, 2024.). HL se klasificira u dva glavna patohistološka tipa, a

to su klasični Hodgkinov limfom (engl. *classical Hodgkin lymphoma*, cHL) i nodularna limfocitna predominacija (engl. *nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma*, NLPHL). cHL čini oko 90% svih HL-a i dijeli se na 4 podtipa: nodularna skleroza (NSHL), miješana celularnost (MCHL), limfocitna deplecija (LDHL) i limfocitima bogat cHL (LRHL). HL ima dobru prognozu i moguće je izliječiti više od 80% bolesnika. Ipak, uočene su teške kasne nuspojave liječenja, poput sekundarnih maligniteta, sterilnosti, kardiovaskularnih bolesti i pulmotoksičnosti, koje mogu dovesti i do smrtnog ishoda. PET/CT se koristi kao preferirani alat za procjenu odgovora na terapiju kod cHL-a. Međutim, nedostaci kao što su izloženost zračenju i potencijal za lažno pozitivne rezultate naglašava potrebu za pouzdanijim i manje štetnim tehnikama. Stoga se proučava upotreba tekuće biopsije u kontekstu praćenja terapije i MRD-a u HL-u (Velasco-Suelto i sur., 2024.). Istraživanja tekuće biopsije uglavnom su fokusirana na njezinu primjenu u cHL-u, s obzirom da on čini većinski dio HL-a. Stoga je i u ovom radu njezina primjena uglavnom razrađena u kontekstu cHL-a.

#### **4.10.1. CtDNA u genotipizaciji i diferencijalnoj dijagnozi cHL-a**

Nekoliko studija opisalo je mutacijski profil ctDNA kod pacijenata s cHL-om korištenjem NGS metoda. Najčešće mutirani geni u su STAT6, SOCS1, REL, TNFAIP3, B2M, JAK2, NFKBIA, NOTCH, PI3K, XPO1, PDL1 i PDL2 (Cirillo i sur., 2020.; Maco i sur., 2022.; Velasco-Suelto i sur., 2024.). Među navedenim genima, STAT6 identificiran je kao najčešće mutirani gen u cHL-u. Mutacije STAT6 i TNFAIP3 češće su u NSHL podtipu u usporedbi s drugim podtipovima te u EBV negativnom cHL-u u usporedbi s EBV-pozitivnim (Maco i sur., 2024.).

Najčešće mutirani geni u NLPHL-u su DUSP2, SGK1, JUNB i SOCS1 geni. Translokacije koje uključuju BCL6 lokus su gotovo isključivo prisutne u NLPHL-u i vrlo su rijetke u cHL-u. S druge strane, STAT6 i JAK2 mutacije, koje su vrlo česte u cHL-u, nisu pronađene u NLPHL-u. Nadalje, mutacije u NFKBIA i TNFAIP3 genima, koje su odgovorne za prekomjernu aktivaciju NF- $\kappa$ B puta u cHL-u, nisu odgovorne za disfunkciju NF- $\kappa$ B puta u NLPHL-u (Maco i sur., 2024.). Ove informacije mogu poslužiti u diferencijalnoj dijagnozi cHL-a. Međutim, u interpretaciji rezultata treba biti oprezan jer su neke mutacije u cHL-u bile detektabilne samo u tumorskom tkivu, a neke samo u ctDNA iz plazme (Maco i sur., 2024.). Ovi rezultati podupiru važnost zajedničke analize tumorskog tkiva i ctDNA za najbolju osjetljivost kod detekcije mutacija.



#### 4.10.2 CtDNA u prognozi, praćenju MRD-a i odgovora na terapiju u cHL-u

Usprkos niskom postotku tumorskih stanica u cHL-u, HSt i RS stanice otpuštaju tumorsku DNA u cirkulaciju u relativno velikim količinama. Pokazano je da je koncentracija ctDNA viša u pacijenata s cHL-om u usporedbi sa zdravim pacijentima te je povezana s većim TMTV-om (procijenjenim PET/CT-om) i lošijim ishodom bolesti (Velasco-Suelto i sur., 2024.). Koncentracija ctDNA tijekom terapije nadopunjuje informacije dobivene PET/CT-om u procjeni odgovora na terapiju kod cHL-a. Istraživanje koje je pratilo serijske uzorke plazme pacijenata tijekom terapije ABVD-om, prikazuje da je smanjenje plazmatske koncentracije ctDNA za 2 logaritma nakon dva ciklusa kemoterapije povezano s potpunim odgovorom na terapiju i izlječenjem. Suprotno tome, pacijenti koji nisu postigli smanjenje od 2 logaritma nakon dva ciklusa ABVD terapije imali su progresivnu bolest i lošije preživljenje (Spina i sur., 2018.). Ova saznanja sugeriraju da bi ctDNA mogla biti korištena kao novi prognostički biljeg u stratifikaciji rizika pacijenata s cHL-om te bi mogla bolje predviđati progresiju bolesti u usporedbi sa standardnim PET/CT pregledom.

Također, neke studije prezentirale su obećavajuće rezultate i identificirale STAT6, XPO1 ili SOCS1 mutacije kao moguće kandidate za praćenje MRD-a u cHL-u (Maco i sur., 2024.). Pacijenti s detektabilnom mutacijom XPO1 gena na kraju liječenja pokazali su trend prema kraćem 2-godišnjem PFS-u u usporedbi s pacijentima s nedetektabilnom mutacijom (Camus i sur., 2016.). Osim praćenja MRD-a, mutacije u određenim genima bile su povezane s nepovoljnim fenotipom (npr. mutacije TP53 ili NOTCH1 gena) i dobrim odgovorom na imunoterapiju PD-1 inhibitorima (npr. mutacija CHD8 gena) (Velasco-Suelto i sur., 2024.). Mutacije CHD8 gena otkrivene su samo kod pacijenata s PFS-om većim 12 mjeseci u usporedbi s pacijentima s PFS-om manjim od 12 mjeseci, sugerirajući da bi navedeni gen mogao poslužiti kao pozitivni prediktivni biljeg za terapiju PD-1 inhibitorima tijekom liječenja refraktornog i/ili relapsiranog cHL-a (rr cHL) (Shi i sur., 2020.). Trenutno postoji nekoliko značajnih studija koje proučavaju ctDNA dobivene tekućom biopsijom kao vrijednog alata u procjeni odgovora na terapiju i praćenju povrata bolesti. Ipak, većina tih studija koristila je manje genske panele (poput CAPP-Seq-a) i manje kohorte pacijenata te su potrebne daljnje, opsežnije studije s više sudionika i upotreba visokoprotočnih metoda kao što je WGS.

### **4.10.3. MiRNA u praćenju odgovora na terapiju kod cHL-a**

Većina studija o miRNA provedene su u kontekstu NHL-a (najviše DLBCL-a) te je broj studija o ulozi miRNA u HL-u ograničen. Za sada postoji samo jedna značajna studija koja karakterizira prisutnost slobodnih miRNA u cHL-u (Velasco-Suelto i sur., 2024.). U toj studiji je, pomoću qRT-PCR-a, kvantificirana miRNA u plazmi pacijenata s cHL-om prije terapije ABVD-om i u plazmi zdravih pacijenata. Pet miRNA bilo je značajno povišeno u plazmi pacijenata s cHL-om u usporedbi sa zdravim pacijentima, a to su miR-494, miR-1973, miR-155, miR-21 i miR-16. Od navedenih miRNA, pokazalo se da miR-494, miR-1973 i miR-21 mogu poslužiti kao biljezi odgovora na terapiju. Analizirali su se uzorci plazme prije, tijekom i nakon ABVD terapije kod pacijenata koji su postigli CR šest mjeseci nakon terapije. Koncentracije miR-494, miR-1973 i miR-21 bile su više u plazmi pacijenata prije terapije u odnosu na pacijente u CR 6 mjeseci nakon terapije. Koncentracije ove tri miRNA u plazmi pacijenata koji su postigli CR nakon 6 mjeseci bile su ekvivalentne onima u zdravim kontrolama. Slično tome, koncentracija miR-16 u plazmi pacijenata nakon terapije i u CR značajno se smanjila u usporedbi s koncentracijama prije terapije, ali je ostala povišena u usporedbi sa zdravim kontrolama. Niti jedna druga miRNA nije odražavala odgovor na bolest kontrolama (Jones i sur., 2014.). Ova studija pokazala je da cirkulirajuće miR-494, miR-1973 i miR-21 u krvi mogu poslužiti kao biljeg za praćenje odgovora na liječenje. Takvo praćenje može pomoći u procjeni učinkovitosti liječenja i donošenju odluka o nastavku, prilagodbi ili prekidu terapije. Međutim, potrebne su novije studije koje bi potvrdile ove podatke.

### **4.10.4. Egzosomi i mikrovezikule u praćenju cHL-a i odgovora na terapiju**

U jednoj studiji korišten je CD30 biljeg HSt i RS stanica za hvatanje i izolaciju EV-a te je uočen povećan broj CD30-pozitivnih EV-a u plazmi pacijenata s cHL-om u usporedbi sa zdravim kontrolama. Dokazana je i snažna korelacija između količine CD30-pozitivnih čestica i PET/CT nalaza te značajan pad broja čestica kod pacijenata s cHL-om nakon dva ciklusa kemoterapije (Velasco-Suelto i sur., 2024.).

U drugoj studiji uočen je širok spektar miRNA iz egzosoma i mikrovezikula koje su povezane s bolešću. Kod pacijenata s cHL, koncentracije miR24-3p, miR127-3p, miR21-5p, let7a-5p i miR155-5p bile su povišene u usporedbi sa zdravim kontrolama. Serijsko praćenje

koncentracije navedenih miRNA kod pacijenata prije liječenja, neposredno nakon liječenja i tijekom dugotrajnog praćenja bolesti otkrilo je postupno smanjenje koncentracija egzosomalnih miRNA kod pacijenata koji su postigli potpuni odgovor na terapiju, što je bilo u skladu s nalazima PET/CT-a. Važno je napomenuti da su koncentracije spomenutih EV miRNA ostale povišene kod pacijenata koji nisu odgovorili na liječenje te ponovno porasle kod pacijenata s relapsom bolesti (Velasco-Suelto i sur., 2024.). Ovime se pokazao obećavajući potencijal korištenja EV miRNA u praćenju cHL-a i odgovora na terapiju.

#### **4.11. Zreli NK/T-stanični limfomi (engl. *NK/T-cell lymphomas*, NKTCL)**

Zreli NKTCL predstavljaju vrlo heterogenu skupinu tumora koji nastaju klonalnom proliferacijom posttimičkih limfocita. Rjeđi su od B-staničnih limfoma i čine oko 10–12% svih limfoma (Labar i sur., 2017.). Nova SZO klasifikacija iz 2022. godine reorganizirala je entitete unutar zrelih NK/T-staničnih limfoma te se oni dijele u primarni kožni T-stanični limfom, hepatosplenični T-stanični limfom, intestinalni NK/T-stanični limfom, EBV pozitivni i EBV-negativni NK/T-stanični limfom, anaplastični velikostanični limfom, nodalni limfom T-folikularnih pomagačkih (TFH) stanica i ostali periferni T-stanični limfomi (Alaggio i sur., 2022.). Ekstranodalna lokalizacija javlja se često, a može biti uzrok kasnom prepoznavanju bolesti i lošoj prognozi. Većina NKTCL-a su agresivni, često se javlja uznapredovala bolest s izraženim općim simptomima, a petogodišnje OS bolesnika je 30%. Tumore NK stanica svrstava se zajedno s tumorima T-limfocita zato što su NK stanice vrlo bliske T-limfocitima te razlikovanje T-staničnog i NK-staničnog podrijetla može biti nejasno i teško određivo (Labar i sur., 2017.; Alaggio i sur., 2022.).

##### **4.11.1. Ekstranodalni NK/T-stanični limfomi (engl. *extranodal NK/T-cell lymphomas*, ENKTCL)**

Ekstranodalni NK/T-stanični limfomi mogli su se, po staroj SZO klasifikaciji, patološki podijeliti na ENKTCL, nazalni tip (koji uključuje nos i nazofarinks) i nenazalni tip (koji uključuje ostala ekstranodalna mjesta) (McKenzie i sur., 2020.). ENKTCL, nazalni tip čini 80% ENKTCL-a i većina studija starijih od 2022. godine fokusirala se na poučavanje ove vrste limfoma (Ahmadzadeh i sur., 2022.). U novoj klasifikaciji SZO-a, izraz “nazalni tip“ u nazivlju

je napušten te se ovaj tip limfoma naziva samo ENKTCL, stoga je tako oslovljen i u narednim poglavljima u radu (Alaggio i sur., 2022.).

#### **4.11.1.1. CtDNA u prognozi ENKTCL-a**

Usporedbom mutacija ctDNA između novodijagnosticiranih i relapsiranih pacijenata s ENKTCL-om, BCOR je bio najčešće mutirani gen u grupi novodijagnosticiranih pacijenata, a slijede TP53, DDX3X i KMT2D. Važno je napomenuti da su pacijenti s uznapredovalom fazom bolesti imali više mutacija DDX3X i BCOR gena nego pacijenti s ranom fazom bolesti i pacijenti s relapsom te je identificirana barem jedna mutacija u TP53, DDX3X ili BCOR genima kod svih pacijenata s uznapredovalom fazom bolesti. Kod pacijenata s relapsom, TP53 bio je najčešće mutirani gen, a nakon njega slijedi POT1 (Kim i sur., 2023.). U drugoj studiji, jednogodišnjim longitudinalnim praćenjem sudionika ustanovljeno je da su pacijenti kojima su se mutacije povezane s ENKTCL-om brzo uklanjale iz plazme imali višu stopu CR-a nakon liječenja i viši PFS u usporedbi s pacijentima kod kojih su mutacije u plazmi bile trajne ili su se pojavile nove mutacije (Qi i sur., 2021.). Međutim, ove studije su ograničene malim kohortama sudionika i relativno kratkim razdobljem praćenja.

#### **4.11.1.2. MiRNA u dijagnozi i prognozi ENKTCL-a**

NKTCL (uključujući i ENKTCL) često se liječi CHOP kemoterapijskim protokolom. Međutim, većina NKTCL-a ima visoku ekspresiju P-glikoproteina koji stvara otpornost na antacikline (npr. doksorubicin iz CHOP terapije) zbog čega je učinkovitost takve terapije niska (Labar i sur., 2017.). U staničnim linijama otpornim na antraciklin (adriamicin) pokazana je povišena ekspresija miRNA-211. Stoga je ekspresija ove miRNA u plazmi proučavana u kontekstu dijagnoze i prognoze ENKTCL-a. Pomoću qRT-PCR-a, dokazana je značajno veća ekspresija miR-221 u plazmi pacijenata s ENKTCL-om nego u plazmi zdravih pojedinaca. Također je primijećena korelacija između visoke ekspresije cirkulirajuće miRNA-221 i loše prognoze pacijenata. Ovo istraživanje pokazuje da miRNA-221 može razlikovati pacijente s ENKTCL-om od zdravih kontrola s osjetljivošću od 57,5% i specifičnošću od 75,7% (Gui i sur., 2010.).

#### **4.11.1.3. EBV miRNA u dijagnozi i prognozi ENKTCL-a**

Zanimljivo, otkriven je i veliki raspon cirkulirajućih EBV miRNA u serumu pacijenata s ENKTCL-om u usporedbi sa serumima zdravih kontrola. MiR-BART2-5p, miR-BART7-3p, miR-BART13-3p i miR-BART1-5p bile su značajno više eksprimirane u uzorcima ENKTCL-a te je potvrđeno da ove EBV miRNA mogu točno razlikovati pacijente s ENKTCL-om od zdravih kontrola. Vrijednosti osjetljivosti i specifičnosti za miR-BART2-5p, miR-BART7-3p, miR-BART13-3p i miR-BART1-5p iznosile su 92,3% i 87,5%; 84,6% i 75%; 92,3% i 87,5%; te 76,9% i 93,8%. Također je uočena korelacija između povišene ekspresije cirkulirajuće miR-BART2-5p i lošijeg OS-a te povišene ekspresije miR-BART7-3p i miR-BART13-3p i lošijeg PFS-a (Komabayashi i sur., 2017.). S obzirom da EBV miRNA mogu razlikovati pojedince s ENKTCL-om od zdravih pojedinaca s većom osjetljivošću i specifičnošću nego cirkulirajuća miRNA-221 u plazmi, čini se da cirkulirajuće EBV miRNA imaju značajnu prednost kao biljeg za EBV-pozitivne limfome jer su takve miRNA specifično izražene u virusom inficiranim stanicama (Gui i sur., 2010.; Komabayashi i sur., 2017.). Stoga bi EBV miRNA mogle poslužiti kao novi dijagnostički i prognostički biljeg za ENKTCL.

#### **4.11.2. EBV DNA u praćenju MRD-a u EBV-pozitivnom NKTCL-u**

U EBV-pozitivne NK/T-stanične limfome spadaju EBV-pozitivni nodalni NKTCL i ekstranodalni NKTCL. S obzirom da su povezani s EBV infekcijom, istraživanja su proučavala može li cirkulirajuća EBV DNA u plazmi poslužiti kao biljeg u praćenju bolesti i terapije navedenih limfoma. EBV DNA se odnosi na fragmente DNA koje EBV izlučuje u tijelu, a može biti aktivno oslobođena iz živih stanica ili pasivno tijekom apoptoze ili nekroze. Jedna studija pokazala je da su svi pacijenti koji boluju od ENKTCL-a imali pozitivnu EBV DNA u plazmi, dok niti jedan od zdravih pacijenata u kontrolnoj skupini nije imao detektabilnu EBV DNA. Ovi nalazi sugeriraju da bi EBV DNA mogla poslužiti kao dijagnostički biljeg u EBV-pozitivnom limfomu. Štoviše, dinamične promjene u koncentraciji plazmatske EBV DNA povezane su s kliničkim odgovorom tijekom liječenja. Kod pacijenata s EBV DNA-pozitivnim ENKTL-om prije kemoterapijskog liječenja, negativni EBV DNA status nakon liječenja bio povezan s boljim PFS-om i OS-om, dok je pozitivan EBV DNA status nakon liječenja bio povezan s većom stopom relapsa i progresije bolesti. Stoga bi EBV DNA mogla poslužiti i kao biljeg u praćenju MRD-a (Huang i sur., 2024.).

### 4.11.3. Ostali zreli NK/T-stanični limfomi

Osim ENKTCL-a, sljedeći najzastupljeniji zreli NK/T-stanični limfomi su nodalni TFH stanični limfom, angioimunoblastičnog tipa (engl. *nodal T-follicular helper cell lymphoma, angioimmunoblastic-type, nTFHL-AI*), periferni T-stanični limfom, bez posebnih obilježja (engl. *peripheral T-cell lymphoma not other specified, PTCL-NOS*) i ALK-pozitivni/negativni anaplastični velikostanični limfom (engl. *anaplastic large cell lymphoma, ALCL*). Navedeni limfomi, zajedno s ENKTCL-om, čine 80% svih T-staničnih limfoma (Huang i sur., 2024.). Angioimunoblastični T-stanični limfom se prema novoj SZO klasifikaciji naziva nodalni TFH stanični limfom, angioimunoblastičnog tipa te se ovaj naziv koristi u narednom poglavlju (Alaggio i sur., 2022.).

#### 4.11.3.1. CtDNA u dijagnozi, prognozi i praćenju terapije ostalih zrelih NKTCL-a

U novijim studijama, stopa detekcije somatskih mutacija bila je najviša u nTFHL-AI-u i PTCL-NOS-u, dok je detekcija mutacija bila relativno niska kod ALK-negativnog ALCL-a. Mutacije ctDNA nisu otkrivene kod pacijenata s kožnim T-staničnim limfomom (engl. *cutaneous T-cell lymphoma, CTCL*). Mutacije ctDNA češće su otkrivene u grupama s TFH limfomima i perifernim T-staničnim limfomima nego u onima sa ALK-negativnim ALCL-om i kožnim limfomima. Deset najčešće mutiranih gena u različitim podtipovima su RHOA, CREBBP, KMT2D, TP53, IDH2, ALK, MEF2B, SOCS1, CARD11 i KRAS te je dokazana podudarnost navedenih mutacija u plazmi i tumorskom tkivu. Mutacije koje uključuju gene za signalizaciju TCR-a (kao što su FYN i CD28) i gene za JAK/STAT signalizaciju (kao što su STAT3 i STAT6) pronađene su kod pacijenata s PTCL-NOS-om i nTFHL-AI-om, ali su njihove frekvencije bile niže od prethodno navedenih gena. RHOA i IDH2 mutacije češće su prisutne u limfomima podrijetlom iz TFH stanica, nego u PTCL-NOS-u (Kim i sur., 2023.; Huo i sur., 2023.). G17V RHOA mutacija u ctDNA pokazala 100% osjetljivost i specifičnost u identificiranju pacijenata s nTFHL-AI-om (Huang i sur., 2024.). Ovo otkriće pokazuje potencijal ctDNA u neinvazivnoj dijagnostici nTFHL-AI-a. Somatske mutacije u genima CREBBP, TP53 i KMT2D identificirane su u svim podtipovima limfoma (Kim i sur., 2023.).

Više mutacija otkriveno je kod pacijenata s relapsiranim ili refraktornim limfomima nego kod novodijagnosticiranih limfoma, iako se medijan koncentracije ctDNA nije razlikovao među

njima. Nadalje, longitudinalna analiza mutacija ctDNA tijekom liječenja pokazuje korelaciju s terapijskim odgovorom. Pacijenti sa smanjenjem volumena mutacija na kraju liječenja imali su značajno bolji PFS i OS u usporedbi s pacijentima koji su imali povećanje volumena mutacija ili malo smanjenje volumena mutacija. KMT2D, CREBBP i MEF2B bili su najčešći geni koji su pokazali povećanje volumena mutacija tijekom progresije bolesti ili relapsa. Štoviše, tijekom progresije bolesti, uz povećanje prvotno otkrivenih mutacija identificirane su i nove somatske mutacije koje bi mogle biti znak razvoja rezistentnih klonova jer su ti pacijenti postali refraktorni na kasnije spasonosne kemoterapije. Doista, otkrivanje mutacije CREBBP gena prijavljeno je kao pokazatelj rezidualnog klona koji je klonalno evoluirao kod relapsiranih ili refraktornih limfoma (Kim i sur. 2023.). Ova sposobnost otkrivanja novonastalih mutacija tijekom liječenja i praćenja limfoma mogla bi pružiti dodatnu vrijednost liječnicima jer bi ove promjene povezane s novim mutacijama mogle biti potencijalne terapijske mete. Međutim, upotreba longitudinalne analize ctDNA kao alata za praćenje statusa bolesti i dalje ostaje problematično područje s obzirom na tehnička ograničenja korištenih metoda te troškovnu i vremensku učinkovitost.

#### **4.11.3.2. EBV DNA u prognozi ostalih zrelih NKTCL-a**

EBV-DNA u plazmi najčešće je bila povišena u nTFHL-AI-u, a zatim u PTCL-NOS-u i ALCL-u. U longitudinalnoj analizi, smanjenje koncentracije EBV-DNA nakon prve linije kemoterapije bilo je značajno povezano s boljim ukupnim odgovorom, PFS-om i OS-om. Kod pacijenata koji su postigli remisiju, ponovni porast koncentracije EBV DNA tijekom praćenja povezan je s recidivom bolesti ili progresijom. Stoga bi EBV DNA dobivena tekućom biopsijom mogla poslužiti kao novi prognostički model koji bi stratificirao OS i PFS od klasičnih prognostičkih parametara (Huo i sur., 2023.).

## 5. ZAKLJUČCI

Tekuća biopsija je neinvazivna metoda kojom se iz uzorka krvi (ili neke druge tjelesne tekućine) izoliraju CTC, cfDNA/ctDNA, egzosomi ili cirkulirajuće RNA (npr. miRNA, lncRNA). Značajno je jednostavnija i manje invazivna od ekscizijske biopsije koja je zlatni standard u dijagnostici limfoma te pruža informacije o tumoru koje se konvencionalnim dijagnostičkim metodama često propuštaju. Tekuća biopsija nije namijenjena da u potpunosti zamijeni konvencionalne pristupe dijagnostici i praćenju limfoma, već da ih nadopuni i unaprijedi postojeće prakse.

Analiza ctDNA ima najveći potencijal i primjenjivost u različitim podtipovima limfoma. Otkrivanje točkastih mutacija tumora, CNV-ova i kromosomskih preuređenja u ctDNA pruža vrijedne uvide u molekularni krajolik limfoma. Budući da ctDNA čini mali postotak cfDNA, pogotovo u ranijim stadijima limfoma, potrebno je koristiti visoko osjetljive PCR i NGS metode za detekciju i kvantifikaciju ctDNA, a CAPP-Seq se pokazao kao najbolja. DLBCL ima najveću stopu incidencije zbog čega je najveći broj istraživanja posvećen upravo njemu. Analiza ctDNA iz krvi pacijenata s DLBCL-om pokazala je korisnost u neinvazivnoj genotipizaciji limfoma (velika podudaranost s tkivom), stratifikaciji rizika pacijenata prije liječenja, ranoj procjeni odgovora na terapiju, praćenju MRD-a, ranom otkrivanju relapsa te praćenju klonalne evolucije i mehanizama otpornosti na terapiju. Analiza ctDNA u ostalim, manje zastupljenim limfomima, kao što su FL, MCL, HL i NKTCL, pokazala je obećavajuće rezultate u sličnim primjenama, s određenim varijacijama ovisno o specifičnoj biologiji svakog podtipa. MYD88 L265P mutacija u likvoru specifičan je biljeg za PCNSL.

Iako su CTC pokazale korisnost u nekim solidnim tumorima, njihova primjena u limfomima je ograničena. To je prvenstveno zbog niskog broja CTC-a u perifernoj krvi kod većine pacijenata s limfomom, posebno u neleukemijskim fazama limfoma. U određenim podtipovima limfoma, poput FL-a, analiza CTC-a može pružiti dodatne prognostičke informacije. Međutim, korisnost takvih informacija ostala je upitna. Buduća istraživanja trebala bi se usredotočiti na razvoj osjetljivijih metoda detekcije CTC-a i istraživanje njihovog potencijala u kombinaciji s drugim biljezima tekuće biopsije.

MiRNA se pojavila kao potencijalni biljeg u različitim podtipovima limfoma, osobito u DLBCL-u i HL-u. Različiti podtipovi limfoma povezani su sa specifičnim miRNA obrascima te miRNA može poslužiti u ranom dijagnosticiranju i razlikovanju limfoma od drugih



maligniteta, predviđanju odgovora na terapiju i ukupnog preživljenja, praćenju progresije bolesti i ranom otkrivanju relapsa. Međutim, klinička upotreba miRNA još uvijek je ograničena izazovima u standardizaciji metoda detekcije i potrebom za većim validacijskim studijama.

Iako manje proučavane od miRNA, tekućom biopsijom identificirane su i specifične lncRNA povezane s dijagnozom, prognozom i odgovorom na liječenje u DLBCL-u. Potrebno je daljnje istraživanje kako bi se u potpunosti razjasnila njihova uloga i klinička primjenjivost.

Egzosomi i njihov sadržaj (uključujući proteine, DNA i RNA, a ponajviše miRNA) mogu poslužiti u dijagnozi, prognozi i praćenju odgovora na liječenje u različitim podtipovima limfoma. Njihova stabilnost u cirkulaciji, uloga u međustaničnoj komunikaciji i modulaciji tumorskog mikrookruženja čine ih privlačnim biljezima za daljnja istraživanja.

Prednosti tekuće biopsije su neinvazivna priroda, koja omogućuje serijsko uzorkovanje i smanjuje opterećenje pacijenta, bolja karakterizacija prostorne i vremenske heterogenosti tumora, praćenje tijeka bolesti i odgovora na liječenje u stvarnom vremenu, potencijal za ranu intervenciju na temelju molekularnog, a ne kliničkog relapsa te uvid u klonalnu evoluciju limfoma koja pomaže u odabiru ciljane terapije

Tekuća biopsija ima nekoliko izazova koji moraju biti riješeni prije integracije u rutinsku kliničku praksu. Neki od njih su standardizacija predanalitičkih i analitičkih postupaka, izvještavanje rezultata u različitim laboratorijima, poboljšanje osjetljivosti i specifičnosti metoda, utvrđivanje optimalnog vremena i učestalosti uzorkovanja, integracija s postojećim prognostičkim modelima i algoritmima liječenja, dobivanje odobrenja za kliničku primjenu te odnos troškova i koristi implementacije u kliničku praksu.

Kako bi se prevladali ovi izazovi potrebno je provesti velike, prospektivne kliničke studije za validaciju kliničke korisnosti tekuće biopsije u različitim podtipovima limfoma, usavršavati i razvijati visoko osjetljive i visoko specifične metode, s fokusom na standardizaciju i ponovljivost, istražiti nove tehnologije, razvijati sveobuhvatne panele koji integriraju više biljega tekuće biopsije, iskoristiti napredne računalne pristupe za analizu složenih podataka, istražiti sinergistički potencijal tekuće biopsije sa slikovnim tehnikama, detaljno istražiti njezinu ulogu u donošenju odluka o liječenju, praćenju MRD-a i progresije limfoma te provesti analize isplativosti.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

5hmC – 5-hidroksimetilcitozin

5mC – 5-metilcitozin

ABC – podtip DLBCL-a sličan aktiviranim B-limfocitima (engl. *activated B cell-like*)

ABVD – kemoterapijski protokol koji se sastoji od doksorubicina, bleomicina, vinblastina, dakarbazina

AGO – Argonaut proteini

AID – aktivacijom inducirane citidin deaminaze (engl. *activation induced cytidine deaminase*)

AIDS – sindrom stečene imunodeficijencije (engl. *acquired immunodeficiency syndrome*)

ALCL – anaplastični velikostanični limfom (engl. *anaplastic large cell lymphoma*)

B2M – beta-2-mikroglobulin

BCL2 – antiapoptotički protein B-stanični limfom 2 (engl. *B-cell lymphoma 2*)

BCL6 – antiapoptotički protein B-stanični limfom 6 (engl. *B-cell lymphoma 6*)

BCR – B-stanični receptor (engl. *B-cell receptor*)

BEAMing – kuglice, emulzija, amplifikacija, magnetizam (engl. *beads, emulsion, amplification, magnetics*)

BL – Burkittov limfom (engl. *Burkitt lymphoma*)

bp (ili pb) – bazni parovi/ parovi baza (engl. *base pairs*)

CAPP-seq – personalizirano profiliranje karcinoma dubokim sekvenciranjem (engl. *cancer personalized profiling by deep sequencing*)

CAR-T – terapija T stanicama s kimernim antigenskim receptorom (engl. *chimeric antigen receptor T-cell*)

cfDNA – slobodna cirkulirajuća DNA (engl. *cell-free DNA*)

cHL – klasični Hodgkinov limfom (engl. *classical Hodgkin lymphoma*)

CHOP – kemoterapijski protokol koji se sastoji od ciklofosfamida, doksorubicina, vinkristina i prednizona

CIRI – kontinuirani individualizirani indeks rizika (engl. *continuous individualized risk indeks*)

CNV – promjena broja kopija (engl. *copy number variations*)

COO – testiranje podrijetla stanice (engl. *cell of origin*)

CpG – citozin-gvanin dinukleotidi

CR – potpuna remisija (engl. *complete remission*)

CT – kompjutorizirana tomografija (engl. *computed tomography*)

CTC – cirkulirajuće tumorske stanice (engl. *circulating tumour cells*)

CTCL – kožni T-stanični limfomom (engl. *cutaneous T-cell lymphoma*)

ctDNA – cirkulirajuća tumorska DNA (engl. *circulating tumour DNA*)

DAPK1 gen – gen za protein kinazu 1 povezanu sa smrću (engl. *death-associated protein kinase 1*)

ddPCR – digitalni kapljični PCR (engl. *digital droplet PCR*)

DFS – preživljenje bez bolesti (engl. *disease-free survival*)

DLBCL – difuzni B-velikostanični limfom (engl. *diffuse large B-cell lymphoma*)

EB – ekscizijska biopsija

EBV – Epstein – Barrov virus

EFS – preživljenje bez događaja (engl. *event-free survival*)

egzoDNA – egzosomska DNA

EMR – rani molekularni odgovor (engl. *early molecular response*)

ENKTCL – ektranodalni NK/T-stanični limfomi (engl. *extranodal NK/T-cell lymphomas*)

EpCAM – adhezijska molekula epitelnih stanica (engl. *epithelial cell adhesion molecule*)

EV – izvanstanične vezikule (engl. *extracellular vesicles*)

FCM – protočna citometrija (engl. *flow cytometry*)

FDA – Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

FDG – fluoro-D-glukoza

FISH – fluorescentna in situ hibridizacija (engl. *fluorescence in situ hybridization*)

FL – folikularni limfom (engl. *follicular lymphoma*)

GCB – podtip DLBCL-a sličan B-limfocitima germinativnog centra (engl. *germinative center-like*)

GIS – gastrointestinalni sustav

HCV – hepatitis C virus

HHV-8 – humani herpes virus 8

HIV – virus humane imunodeficijencije (engl. *human immunodeficiency virus*)

HL – Hodgkinov limfom (engl. *Hodgkin lymphoma*)

HSt – Hodgkinove stanice

HTLV-1 – humanim T-limfotropni virus tipa 1

IGH – lokus teškog lanca imunoglobulina (engl. *immunoglobulin heavy locus*)

Ig-HTS – visokoprotočno sekvenciranje lokusa teškog lanca imunoglobulina (engl. *immunoglobulin high throughput sequencing*)

IPI – međunarodni prognostički indeks (engl. *international prognostic index*)

LDH – laktat dehidrogenaza

LDHL – limfocitna deplecija (engl. *lymphocyte-depleted Hodgkin lymphoma*)

LINE1 – retrotranspozoni (engl. *long interspersed nuclear element-1*)

LME – mikrookruženje limfoma (engl. *lymphoma microenvironment*)

lncRNA – duga nekodirajuća RNA (engl. *long non-coding RNA*)

LRHL – limfocitima bogat Hodgkinov limfom (engl. *lymphocyte rich Hodgkin lymphoma*)

MALT – ektranodalni limfom marginalne zone limfnog tkiva vezanog uz sluznice (engl. *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma*, MALT)

MCHL – miješana celularnost (engl. *mixed cellularity Hodgkin lymphoma*)

MCL – limfom plaštenih stanica (engl. *mantle cell lymphoma*)

miRNA – mikro RNA

MMR – značajni molekularni odgovor (engl. *major molecular response*)

MR – magnetska rezonancija

MRD – minimalna ostatna bolest (engl. *minimal residual disease*)

mRNA – glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

MVB – multivezikularno tijelo (engl. *multivesicular body*)

MYD88 – primarni odgovor mijeloične diferencijacije 88 (engl. *myeloid differentiation primary response 88*)

MZL – limfom marginalne zone (engl. *marginal zone lymphoma*)

ncRNA – nekodirajuća RNA (engl. *non-coding RNA*)

NF-κB – nuklearni faktor kapa B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain of activated B cells*)

NGS – sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next-generation sequencing*)

NHL – ne-Hodgkinov limfom (engl. *non-Hodgkin lymphoma*)

NIHR – Nacionalni institut za istraživanje zdravlja i skrbi (engl. *The National Institute for Health and Care Research*)

NK stanice – stanice prirodne ubojice (engl. *natural killer cells*)

NKTCL – NK/T-stanični limfomi (engl. *NK/T-cell lymphomas*)

NLPHL – nodularna limfocitna predominacija (engl. *nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma*, NLPHL)

NSHL – nodularna skleroza (engl. *nodular sclerosing Hodgkin lymphoma*)

nTFHL-AI – nodalni limfom T-folikularnih pomagačkih stanica, angioimunoblastičnog tipa (engl. *nodal T-follicular helper cell lymphoma, angioimmunoblastic-type*)

OS – ukupno preživljenje (engl. *overall survival*)

PCNSL – primarni B-velikostanični limfom središnjeg živčanog sustava (engl. *primary central nervous system lymphoma*)

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

PET – pozitronska emisijska tomografija

PET/CT – pozitronska emisijska tomografija i kompjutorizirana tomografija

PFS – preživljenjem bez progresije (engl. *progression-free survival*)

POD24 – progresija bolesti unutar 24 mjeseca (engl. *progression of disease within 24 months*)

PTCL-NOS – periferni T-stanični limfom, bez posebnih obilježja (engl. *peripheral T-cell lymphoma not other specified*)

qPCR – PCR u stvarnom vremenu (engl. *real time PCR/quantitative PCR*)

qRT-PCR – reverzna transkripcija s lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction*)

R-DHAP – kemoterapija koja se sastoji od rituksimaba, deksametazona, visoke doze citarabina i cisplatina

R-CHOP – terapijski protokol koji se sastoji od rituksimaba, ciklofosfamida, doksorubicina, vinkristina i prednizona

RFS – preživljenje bez relapsa (engl. *relapse-free survival*)

rrDLBCL – relapsirani ili refraktorni difuzni B-velikostanični limfom

rr cHL – relapsirani ili refraktorni klasični Hodgkinov limfom

RS – Reed-Sternbergove stanice

SNV – varijante jednog nukleotida (engl. *single nucleotide variants*)

SSA – subsaharska Afrika

SV – strukturne varijante (engl. *structural variants*)

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

SŽS – središnji živčani sustav

TCR – T-stanični receptor (engl. *T-cell receptor*)

TDE – tumorski egzosomi (engl. *tumor-derived exosomes*)

TFH – T-folikularne pomagačke stanice (engl. *follicular helper T cells*)

TMTV – ukupni metabolički volumen tumora (engl. *total metabolic tumor volume*)

TRTV – ukupni radiografski volumen tumora (engl. *total radiographic tumor volume*)

WES – sekvenciranje cijelog egzoma (engl. *whole exome sequencing*)

WGBS – bisulfitno sekvenciranje cijelog genoma (engl. *whole-genome bisulfite sequencing*)

WGS – sekvenciranje cijelog genoma (engl. *whole genome sequencing*)

## 7. LITERATURA

Agarwal R, Chan YC, Tam CS, Hunter T, Vassiliadis D, Teh CE, Thijssen R, Yeh P, Wong SQ, Ftouni S, Lam EYN, Anderson MA, Pott C, Gilan O, Bell CC, Knezevic K, Blombery P, Rayeroux K, Zordan A, Li J, Huang DCS, Wall M, Seymour JF, Gray DHD, Roberts AW, Dawson MA, Dawson SJ. Dynamic molecular monitoring reveals that SWI-SNF mutations mediate resistance to ibrutinib plus venetoclax in mantle cell lymphoma. *Nat Med*, 2019, 25(1), 119-129

Ahmadzadeh A., Jandaghi E., Nazarpour S. (2022). A case of extra-nodal natural killer/T cell lymphoma presenting as rhinorrhea and blindness. *Rheumatology Research*, 2022, 7(3), 75-81.

Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBO, Berti E, Bhagat G, Borges AM, Boyer D, Calaminici M, Chadburn A, Chan JKC, Cheuk W, Chng WJ, Choi JK, Chuang SS, Coupland SE, Czader M, Dave SS, de Jong D, Du MQ, Elenitoba-Johnson KS, Ferry J, Geyer J, Gratzinger D, Guitart J, Gujral S, Harris M, Harrison CJ, Hartmann S, Hochhaus A, Jansen PM, Karube K, Kempf W, Khoury J, Kimura H, Klapper W, Kovach AE, Kumar S, Lazar AJ, Lazzi S, Leoncini L, Leung N, Leventaki V, Li XQ, Lim MS, Liu WP, Louissaint A Jr, Marcogliese A, Medeiros LJ, Michal M, Miranda RN, Mitteldorf C, Montes-Moreno S, Morice W, Nardi V, Naresh KN, Natkunam Y, Ng SB, Oschlies I, Ott G, Parrens M, Pulitzer M, Rajkumar SV, Rawstron AC, Rech K, Rosenwald A, Said J, Sarkozy C, Sayed S, Saygin C, Schuh A, Sewell W, Siebert R, Sohani AR, Tooze R, Traverse-Glehen A, Vega F, Vergier B, Wechalekar AD, Wood B, Xerri L, Xiao W. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*, 2022, 36(7), 1720-1748.

Alcoceba M, García-Álvarez M, Okosun J, Ferrero S, Ladetto M, Fitzgibbon J, García-Sanz R. Genetics of Transformed Follicular Lymphoma. *Hemato*, 2022, 3(4), 615-633.

Alcoceba M, Stewart JP, García-Álvarez M, Díaz LG, Jiménez C, Medina A, Chillón MC, Gazdova J, Blanco O, Díaz FJ, Peñarrubia MJ, Fernández S, Montes C, Cabero A, Caballero MD, García-Sanz R, González M, González D, Tamayo P, Gutiérrez NC, García-Sancho AM, Sarasquete ME. Liquid biopsy for molecular characterization of diffuse large B-cell lymphoma and early assessment of minimal residual disease. *Br J Haematol*, 2024, 205(1), 109-121.



Arzuaga-Mendez J, Lopez-Santillan M, Garcia-Ruiz JC, Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I. Systematic review of the potential of MicroRNAs in the management of patients with follicular lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2021, 159, 103247.

Aurer I, Gašparov S, Kralik M, Balenović A, Huić D, Šantek F, Duletić-Načinović A, Pejša V, Ostojić-Kolonić S, Grah JJ. Dijagnostika i liječenje limfoma - drugi hrvatski konsenzus, *Liječnički vjesnik*, 2012, 135(3-4), 63-76.

Bang YH, Shim JH, Ryu KJ, Kim YJ, Choi ME, Yoon SE, Cho J, Park B, Park WY, Kim WS, Kim SJ. Clinical relevance of serum-derived exosomal messenger RNA sequencing in patients with non-Hodgkin lymphoma. *J Cancer*, 2022, 13(5), 1388-1397.

Baraniskin A, Schroers R. Liquid Biopsy and Other Non-Invasive Diagnostic Measures in PCNSL. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(11), 2665.

Baris IC, Hacıoglu S, Turk NS, et al. Expression and DNA methylation profiles of EZH2-target genes in plasma exosomes and matched primary tumor tissues of the patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Transl Oncol*, 2021, 23(6), 1152-1166.

Bou Zerdan M, Kassab J, Saba L, Haroun E, Bou Zerdan M, Allam S, Nasr L, Macaron W, Mammadli M, Abou Moussa S, Chaulagain CP. Liquid biopsies and minimal residual disease in lymphoid malignancies. *Front Oncol*, 2023, 13, 1173701.

Cai W, Zeng Q, Zhang X, Ruan W. Trends Analysis of Non-Hodgkin Lymphoma at the National, Regional, and Global Level, 1990-2019: Results From the Global Burden of Disease Study 2019. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8, 738693.

Camus V, Stamatoullas A, Mareschal S, Viailly PJ, Sarafan-Vasseur N, Bohers E, Dubois S, Picquenot JM, Ruminy P, Maingonnat C, Bertrand P, Cornic M, Tallon-Simon V, Becker S, Veresezan L, Frebourg T, Vera P, Bastard C, Tilly H, Jardin F. Detection and prognostic value of recurrent exportin 1 mutations in tumor and cell-free circulating DNA of patients with classical Hodgkin lymphoma. *Haematologica*, 2016, 101(9), 1094-101.

Cao D, Cao X, Jiang Y, Xu J, Zheng Y, Kang D, Xu C. Circulating exosomal microRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol*, 2022, 40(2), 172-180.

Castro-Giner F, Aceto N. Tracking cancer progression: from circulating tumor cells to metastasis. *Genome Med*, 2020, 12(1), 31.

Chamba C, Mbulaiteye SM, Balandya E, Schuh A. Clinical application of circulating cell-free lymphoma DNA for fast and precise diagnosis of Burkitt lymphoma: Precision medicine for sub-Saharan Africa. *Camb Prism Precis Med*, 2023, 1, e13.

Ching T, Duncan ME, Newman-Eerkes T, McWhorter MME, Tracy JM, Steen MS, Brown RP, Venkatasubbarao S, Akers NK, Vignali M, Moorhead ME, Watson D, Emerson RO, Mann TP, Cimler BM, Swatkowski PL, Kirsch IR, Sang C, Robins HS, Howie B, Sherwood A. Analytical evaluation of the clonoSEQ Assay for establishing measurable (minimal) residual disease in acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, and multiple myeloma. *BMC Cancer*, 2020, 20(1), 612.

Chiu BC, Zhang Z, You Q, Zeng C, Stepniak E, Bracci PM, Yu K, Venkataraman G, Smith SM, He C, Zhang W. Prognostic implications of 5-hydroxymethylcytosines from circulating cell-free DNA in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Adv*, 2019, 3(19), 2790-2799.

Cirillo M, Craig AFM, Borchmann S, Kurtz DM. Liquid biopsy in lymphoma: Molecular methods and clinical applications. *Cancer Treat Rev*, 2020, 91, 102106.

Connal S, Cameron JM, Sala A, Brennan PM, Palmer DS, Palmer JD, Perlow H, Baker MJ. Liquid biopsies: the future of cancer early detection. *J Transl Med*, 2023, 21(1), 118.

Cooper GM, Hausman RE. Stanica – Molekularni pristup. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 131-133.

Cronin CG, Swords R, Truong MT, Viswanathan C, Rohren E, Giles FJ, O'Dwyer M, Bruzzi JF. Clinical utility of PET/CT in lymphoma. *AJR Am J Roentgenol*, 2010, 194(1), W91-W103.

Decruyenaere P, Offner F, Vandesompele J. Circulating RNA biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a systematic review. *Exp Hematol Oncol*, 2021, 10(1), 13.

Delfau-Larue MH, van der Gucht A, Dupuis J, Jais JP, Nel I, Beldi-Ferchiou A, Hamdane S, Benmaad I, Laboure G, Verret B, Haioun C, Copie-Bergman C, Berriolo-Riedinger A, Robert P, Casasnovas RO, Itti E. Total metabolic tumor volume, circulating tumor cells, cell-free DNA: distinct prognostic value in follicular lymphoma. *Blood Adv*, 2018, 2(7), 807-816.

Dirix L, Buys A, Oeyen S, Peeters D, Liègeois V, Prové A, Rondas D, Vervoort L, Mariën V, Laere SV, Vermeulen P. Circulating tumor cell detection: A prospective comparison between CellSearch® and RareCyte® platforms in patients with progressive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2022, 193(2), 437-444.

Distler A, Lakhotia R, Phelan JD, Pittaluga S, Melani C, Muppidi JR, i sur. A prospective study of clonal evolution in follicular lymphoma: circulating tumor DNA correlates with overall tumor burden and fluctuates over time without therapy. *Blood*, 2021, 138(Supplement 1), 1328-1328.

Dotlić S. Imunohistokemijski algoritmi subklasifikacije difuznog B-velikostaničnog limfoma, Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 2012

Drillis G, Goulielmaki M, Spandidos DA, Aggelaki S, Zoumpourlis V. Non-coding RNAs (miRNAs and lncRNAs) and their roles in lymphogenesis in all types of lymphomas and lymphoid malignancies. *Oncol Lett*, 2021, 21(5), 393.

ECIS - European Cancer Information System, 2023., <https://ecis.jrc.ec.europa.eu>, pristupljeno 25.5.2024.

Elenitoba-Johnson KSJ, Lim MS. New Insights into Lymphoma Pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2018, 13, 193-217.

Felekis K, Papanephytous C. The Circulating Biomarkers League: Combining miRNAs with Cell-Free DNAs and Proteins. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(6), 3403.

Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. Global Cancer Observatory. *Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2024., <https://gco.iarc.who.int/today>, pristupljeno 25.5.2024.

Fernandes M, Teixeira AL, Medeiros R. The opportunistic effect of exosomes on Non-Hodgkin Lymphoma microenvironment modulation. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2019, 144, 102825.

Frank MJ, Hossain NM, Bukhari A, Dean E, Spiegel JY, Claire GK, Kirsch I, Jacob AP, Mullins CD, Lee LW, Kong KA, Craig J, Mackall CL, Rapoport AP, Jain MD, Dahiya S, Locke FL, Miklos DB. Monitoring of Circulating Tumor DNA Improves Early Relapse Detection After Axicabtagene Ciloleucel Infusion in Large B-Cell Lymphoma: Results of a Prospective Multi-Institutional Trial. *J Clin Oncol*, 2021, 39(27), 3034-3043.

Frontzek F, Staiger AM, Wullenkord R, Grau M, Zapukhlyak M, Kurz KS, Horn H, Erdmann T, Fend F, Richter J, Klapper W, Lenz P, Hailfinger S, Tasidou A, Trautmann M, Hartmann W, Rosenwald A, Quintanilla-Martinez L, Ott G, Anagnostopoulos I, Lenz G. Molecular profiling of EBV associated diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, 2023, 37(3), 670-679.

Galimberti S, Balducci S, Guerrini F, Del Re M, Cacciola R. Digital Droplet PCR in Hematologic Malignancies: A New Useful Molecular Tool. *Diagnostics (Basel)*, 2022, 12(6), 1305.

Gao Y, Zhao H, An K, Liu Z, Hai L, Li R, Zhou Y, Zhao W, Jia Y, Wu N, Li L, Ying J, Wang J, Xu B, Wu Z, Tong Z, He J, Sun Y. Whole-genome bisulfite sequencing analysis of circulating tumour DNA for the detection and molecular classification of cancer. *Clin Transl Med*. 2022, 12(8), e1014.

Gholami A, Farhadi K, Sayyadipour F, Soleimani M, Saba F. Long noncoding RNAs (lncRNAs) in human lymphomas. *Genes Dis*, 2021, 9(4), 900-914.

Grigoropoulos NF, Petter R, Van 't Veer MB, Scott MA, Follows GA. Leukaemia update. Part 1: diagnosis and management. *BMJ*, 2013, 346, f1660.

Guan T, Zhang M, Liu X, Li J, Xin B, Ren Y, Yang Y, Wang H, Zhao M, Huang Y, Guo X, Du J, Qian W, Su L. Circulating tumor DNA mutation profile is associated with the prognosis and treatment response of Chinese patients with newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma. *Front Oncol*, 2022, 12, 1003957.

Guo HQ, Huang GL, Guo CC, Pu XX, Lin TY. Diagnostic and prognostic value of circulating miR-221 for extranodal natural killer/T-cell lymphoma. *Dis Markers*, 2010, 29(5), 251-8.

Gupta G, Ghalaut VS, Lokanathan V, Sharma P. Prognostic significance of serum Beta 2 Microglobulin in Non-Hodgkin Lymphoma. *Annals of Oncology*, 2017, 28, X9

Hastings RJ, Bown N, Tibiletti MG, Debiec-Rychter M, Vanni R, Espinet B, van Roy N, Roberts P, van den Berg-de-Ruiter E, Bernheim A, Schoumans J, Chatters S, Zemanova Z, Stevens-Kroef M, Simons A, Heim S, Salido M, Ylstra B, Betts DR; Tumour Best Practice meeting; Eurogentest. Guidelines for cytogenetic investigations in tumours. *Eur J Hum Genet*, 2016, 24(1), 6-13

Hermine O, Hoster E, Walewski J, Bosly A, Stilgenbauer S, Thieblemont C, Szymczyk M, Bouabdallah R, Kneba M, Hallek M, Salles G, Feugier P, Ribrag V, Birkmann J, Forstpointner R, Haioun C, Hänel M, Casasnovas RO, Finke J, Peter N, Bouabdallah K, Sebban C, Fischer T, Dührsen U, Metzner B, Maschmeyer G, Kanz L, Schmidt C, Delarue R, Brousse N, Klapper W, Macintyre E, Delfau-Larue MH, Pott C, Hiddemann W, Unterhalt M, Dreyling M; European Mantle Cell Lymphoma Network. Addition of high-dose cytarabine to immunochemotherapy

before autologous stem-cell transplantation in patients aged 65 years or younger with mantle cell lymphoma (MCL Younger): a randomised, open-label, phase 3 trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Lancet*, 2016, 388(10044), 565-75.

Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2021., Zagreb, 2024.

Huang Z, Fu Y, Yang H, Zhou Y, Shi M, Li Q, Liu W, Liang J, Zhu L, Qin S, Hong H, Liu Y. Liquid biopsy in T-cell lymphoma: biomarker detection techniques and clinical application. *Mol Cancer*, 2024, 23(1), 36.

Huang W, Paul D, Calin GA, Bayraktar R. miR-142: A Master Regulator in Hematological Malignancies and Therapeutic Opportunities. *Cells*, 2023, 13(1), 84.

Huet S, Salles G. Potential of Circulating Tumor DNA for the Management of Patients With Lymphoma. *JCO Oncol Pract*, 2020, 16(9), 561-568.

Huo YJ, Zhao WL. Circulating tumor DNA in NK/T and peripheral T cell lymphoma. *Semin Hematol*, 2023, 60(3), 173-177

Ito Y, Maeshima AM, Hatta S, Saito Y, Fujino T, Makita S, Fukuhara S, Munakata W, Taniguchi H, Suzuki T, Maruyama D, Sone M, Izutsu K. Use of Core-Needle Biopsy for the Diagnosis of Malignant Lymphomas in Clinical Practice. *Acta Haematol*, 2021, 144(6), 641-648.

Jamil A, Mukkamalla SKR. Lymphoma. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560826/>, pristupljeno 1.6.2024.

Jardin F. NFκB Pathway and Hodgkin Lymphoma. *Biomedicines*, 2022, 10(9), 2153.

Jelicic J, Juul-Jensen K, Bukumiric Z, Roost Clausen M, Ludvigsen Al-Mashhadi A, Pedersen RS, Poulsen CB, Brown P, El-Galaly TC, Stauffer Larsen T. Prognostic indices in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based comparison and validation study of multiple models. *Blood Cancer J*, 2023, 13(1), 157.

Lewis WD, Lilly S, Jones KL. Lymphoma: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*, 2020, 101(1), 34-41.

Jiménez-Ubieto A, Martín-Muñoz A, Poza M, Dorado S, García-Ortiz A, Revilla E, Sarandeses P, Ruiz-Heredia Y, Baumann T, Rodríguez A, Calbacho M, Sánchez PM, Pina JMS, García-Sancho AM, Figaredo G, Rufián L, Rodríguez M, Carneros L, Martínez-Laperche C, Bastos-

Oreiro M, Wang C, Cedena MT, Rapado I, de Toledo P, Gallardo M, Valeri A, Ayala R, Martínez-López J, Barrio S. Personalized monitoring of circulating tumor DNA with a specific signature of trackable mutations after chimeric antigen receptor T-cell therapy in follicular lymphoma patients. *Front Immunol*, 2023, 14, 1188818.

Jiménez-Ubieto A, Poza M, Martín-Muñoz A, Ruiz-Heredia Y, Dorado S, Figaredo G, Rosa-Rosa JM, Rodríguez A, Barcena C, Navamuel LP, Carrillo J, Sanchez R, Rufian L, Juárez A, Rodríguez M, Wang C, de Toledo P, Grande C, Mollejo M, Casado LF, Calbacho M, Baumann T, Rapado I, Gallardo M, Sarandeses P, Ayala R, Martínez-López J, Barrio S. Real-life disease monitoring in follicular lymphoma patients using liquid biopsy ultra-deep sequencing and PET/CT. *Leukemia*, 2023, 37(3), 659-669.

Jones K, Nourse JP, Keane C, Bhatnagar A, Gandhi MK. Plasma microRNA are disease response biomarkers in classical Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(1), 253-64.

Jørgensen S, Paulsen IW, Hansen JW, Tholstrup D, Hother C, Sørensen E, Petersen MS, Nielsen KR, Rostgaard K, Larsen MAH, Brown PN, Ralfkiær E, Homburg KM, Hjalgrim H, Erikstrup C, Ullum H, Troelsen J, Grønbaek K, Pedersen OB. The value of circulating microRNAs for early diagnosis of B-cell lymphoma: A case-control study on historical samples. *Sci Rep*, 2020, 10(1), 9637.

Jung D, Jain P, Yao Y, Wang M. Advances in the assessment of minimal residual disease in mantle cell lymphoma. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1), 127.

Kaseb H, Ali MA, Gasalberti DP, Koshy NV. Follicular Lymphoma. U: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538206/>, pristupljeno 21.7.2024.

Kaur H, Palot Manzil FF. Nuclear Medicine PET/CT Lymphomas Assessment, Protocols, and Interpretation. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK585116/>, pristupljeno 8.6.2024.

Khanmohammadi S, Shabani M, Tabary M, Rayzan E, Rezaei N. Lymphoma in the setting of autoimmune diseases: A review of association and mechanisms. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2020, 150, 102945.

Khanmohammadi S, Fallahtafti P. Long non-coding RNA as a novel biomarker and therapeutic target in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma: A systematic review. *J Cell Mol Med*, 2023, 27(14), 1928-1946.

Kim JJ, Kim HY, Choi Z, Hwang SY, Jeong H, Choi JR, Yoon SE, Kim WS, Kim SH, Kim HJ, Shin SY, Lee ST, Kim SJ. In-depth circulating tumor DNA sequencing for prognostication and monitoring in natural killer/T-cell lymphomas. *Front Oncol*, 2023, 13, 1109715.

Kim SJ, Kim YJ, Yoon SE, Ryu KJ, Park B, Park D, Cho D, Kim HY, Cho J, Ko YH, Park WY, Kim WS. Circulating Tumor DNA-Based Genotyping and Monitoring for Predicting Disease Relapses of Patients with Peripheral T-Cell Lymphomas. *Cancer Res Treat*, 2023, 291-303.

Kim J, Le TM, Lee D, Nguyen HDT, Cho HJ, Sohn SK, Kim JG, Jeong SY, Ham JY, Jeong JY, Han HS, Moon JH, Baek DW. Circulating-tumor DNA Assessment in Diffuse Large B-cell Lymphoma to Determine Up-front Stem Cell Transplantation: A Pilot Study. *In Vivo*, 2024, 38(1), 372-379.

Kluiser J, Slezak-Prochazka I, van den Berg A. Studying microRNAs in lymphoma. *Methods Mol Biol*, 2013, 971, 265-276.

Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Can histologic transformation of follicular lymphoma be predicted and prevented?. *Blood*, 2017, 130(3), 258-266.

Kristensen LS, Asmar F, Dimopoulos K, Nygaard MK, Aslan D, Hansen JW, Ralfkiaer E, Grønbæk K. Hypermethylation of DAPK1 is an independent prognostic factor predicting survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 2014, 5(20), 9798-9810.

Kristensen LS, Hansen JW, Kristensen SS, Tholstrup D, Harsløf LB, Pedersen OB, De Nully Brown P, Grønbæk K. Aberrant methylation of cell-free circulating DNA in plasma predicts poor outcome in diffuse large B cell lymphoma. *Clin Epigenetics*, 2016, 8(1), 95.

Komabayashi Y, Kishibe K, Nagato T, Ueda S, Takahara M, Harabuchi Y. Circulating Epstein-Barr virus-encoded micro-RNAs as potential biomarkers for nasal natural killer/T-cell lymphoma. *Hematol Oncol*, 2017, 35(4), 655-663.

Kos IA, Thurner L, Bittenbring JT, Christofyllakis K, Kaddu-Mulindwa D. Advances in Lymphoma Molecular Diagnostics. *Diagnostics (Basel)*, 2021, 11(12), 2174.

Kumar A, Bantilan KS, Jacob AP, Park A, Schoninger SF, Sauter C, Ulaner GA, Casulo C, Faham M, Kong KA, Grewal RK, Gerecitano J, Hamilton A, Hamlin P, Matasar M, Moskowitz

CH, Noy A, Palomba ML, Portlock CS, Younes A, Willis T, Zelenetz AD. Noninvasive Monitoring of Mantle Cell Lymphoma by Immunoglobulin Gene Next-Generation Sequencing in a Phase 2 Study of Sequential Chemoradioimmunotherapy Followed by Autologous Stem-Cell Rescue. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2021, 21(4), 230-237.

Kumar S, Gonzalez EA, Rameshwar P, Etchegaray JP. Non-Coding RNAs as Mediators of Epigenetic Changes in Malignancies. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(12), 3657.

Kurtz DM, Scherer F, Jin MC, Soo J, Craig AFM, Esfahani MS, Chabon JJ, Stehr H, Liu CL, Tibshirani R, Maeda LS, Gupta NK, Khodadoust MS, Advani RH, Levy R, Newman AM, Dührsen U, Hüttmann A, Meignan M, Casasnovas RO, Westin JR, Roschewski M, Wilson WH, Gaidano G, Rossi D, Diehn M, Alizadeh AA. Circulating Tumor DNA Measurements As Early Outcome Predictors in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*, 2018, 36(28), 2845-2853.

Labar B. Hematologija. Zagreb, Školska knjiga, 2017, str. 353-439.

Lakhota R, Melani C, Dunleavy K, Pittaluga S, Saba N, Lindenberg L, Mena E, Bergvall E, Lucas AN, Jacob A, Yusko E, Steinberg SM, Jaffe ES, Wiestner A, Wilson WH, Roschewski M. Circulating tumor DNA predicts therapeutic outcome in mantle cell lymphoma. *Blood Adv*, 2022, 6(8), 2667-2680.

Lauer EM, Mutter J, Scherer F. Circulating tumor DNA in B-cell lymphoma: technical advances, clinical applications, and perspectives for translational research. *Leukemia*, 2022, 36(9), 2151-2164.

Levy G, Kicinski M, Van der Straeten J, Uyttebroeck A, Ferster A, De Moerloose B, Dresse MF, Chantrain C, Brichard B, Bakkus M. Immunoglobulin Heavy Chain High-Throughput Sequencing in Pediatric B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: Is the Clonality of the Disease at Diagnosis Related to Its Prognosis? *Front Pediatr*, 2022, 10, 874771.

Li W. The 5<sup>th</sup> Edition of the World Health Organization Classification of Hematolymphoid Tumors. In: Li W, ed., *Leukemia*, Brisbane (AU): Exon Publications, 2022, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK586208/>, pristupljeno: 13.9.2024.

Lim S, Jeon YK. Liquid biopsies for Hodgkin lymphoma. *Nature Reviews Cancer*, 2024, 24(8), 522.



Liu J, Li JN, Wu H, Liu P. The Status and Prospects of Epigenetics in the Treatment of Lymphoma. *Front Oncol*, 2022, 12, 874645.

Liu H, Yang C, Zhao X, Le J, Wu G, Wei J, Liang Y, Qian W. Genotyping on ctDNA Identifies Shifts in Mutation Spectrum Between Newly Diagnosed and Relapse/Refractory DLBCL. *Onco Targets Ther*, 2020, 13, 10797-10806.

Lone SN, Nisar S, Masoodi T, Singh M, Rizwan A, Hashem S, El-Rifai W, Bedognetti D, Batra SK, Haris M, Bhat AA, Macha MA. Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Mol Cancer*, 2022, 21(1), 79.

Lopez-Santillan M, Larrabeiti-Etxebarria A, Arzuaga-Mendez J, Lopez-Lopez E, Garcia-Orad A. Circulating miRNAs as biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a systematic review. *Oncotarget*, 2018, 9(32), 22850-22861.

Lowes LE, Allan AL. Circulating Tumor Cells and Implications of the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Adv Clin Chem*, 2018, 83, 121-181.

Luca DC. Update on Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *Clin Lab Med*, 2021, 41(3), 405-416.

Lv L, Liu Y. Clinical Application of Liquid Biopsy in Non-Hodgkin Lymphoma. *Front Oncol*, 2021, 11, 658234.

Maco M, Kupcova K, Herman V, Ondeckova I, Kozak T, Mocikova H, Havranek O; Czech Hodgkin Lymphoma Study Group. Circulating tumor DNA in Hodgkin lymphoma. *Ann Hematol*, 2022, 101(11), 2393-2403.

Mao X, Sun Y, Tang J. Serum miR-21 is a diagnostic and prognostic marker of primary central nervous system lymphoma. *Neurol Sci*, 2014, 35(2), 233-8.

McKenzie SB, Landis-Piwowar K, Williams JL. Clinical laboratory hematology 4th edition. Pearson Education, 2020, str. 622-640.

Melani C, Wilson WH, Roschewski M. Liquid biopsy in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol*, 2019, 37 Suppl 1, 70-74.

Monter A, Nomdedéu JF. ClonoSEQ assay for the detection of lymphoid malignancies. *Expert Rev Mol Diagn*, 2019, 19(7), 571-578.

Mugnaini EN, Ghosh N. Lymphoma. *Prim Care*, 2016, 43(4), 661-675.

Nagy Á, Bártai B, Kiss L, Gróf S, Király PA, Jóna Á, Demeter J, Sánta H, Bártai Á, Pettendi P, Szendrei T, Plander M, Körösmezey G, Alizadeh H, Kajtár B, Méhes G, Krenács L, Timár B, Csomor J, Tóth E, Schneider T, Mikala G, Matolcsy A, Alpár D, Masszi A, Bödör C. Parallel testing of liquid biopsy (ctDNA) and tissue biopsy samples reveals a higher frequency of EZH2 mutations in follicular lymphoma. *J Intern Med*, 2023, 294(3), 295-313.

Navarro-Tableros V, Gomez Y, Camussi G, Brizzi MF. Extracellular Vesicles: New Players in Lymphomas. *Int J Mol Sci*, 2018, 20(1), 41.

Nayak L, Bettegowda C, Scherer F, Galldiks N, Ahluwalia M, Baraniskin A, von Baumgarten L, Bromberg JEC, Ferreri AJM, Grommes C, Hoang-Xuan K, Kühn J, Rubenstein JL, Rudà R, Weller M, Chang SM, van den Bent MJ, Wen PY, Soffiatti R. Liquid biopsy for improving diagnosis and monitoring of CNS lymphomas: A RANO review. *Neuro Oncol*, 2024, 26(6), 993-1011.

Nguyen L, Papenhausen P, Shao H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. *Genes (Basel)*, 2017, 8(4), 116.

Nobili L, Ronchetti D, Taiana E, Neri A. Long non-coding RNAs in B-cell malignancies: a comprehensive overview. *Oncotarget*, 2017, 8(36), 60605-60623.

Ofori K, Bhagat G, Rai AJ. Exosomes and extracellular vesicles as liquid biopsy biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: Current state of the art and unmet clinical needs. *Br J Clin Pharmacol*, 2021, 87(2), 284-294.

Panda D, Das N, Thakral D, Gupta R. Genomic landscape of mature B-cell non-Hodgkin lymphomas - an appraisal from lymphomagenesis to drug resistance. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2022, 34(1), 52.

Paquin AR, Oyogoa E, McMurry HS, Kartika T, West M, Shatzel JJ. The diagnosis and management of suspected lymphoma in general practice. *Eur J Haematol*, 2023, 110(1), 3-13.

Park JB, Koo JS. Helicobacter pylori infection in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(11), 2751-2759.

Periša J, Bulić P, Špacir Prskalo Z, Gaće M, Mayer Lj. Possibilities of liquid biopsy in clinical practice. *Libri Oncologici*, 2017, 45(1), 23-30.

Poulet G, Massias J, Taly V. Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta Cytol*, 2019, 63(6), 449-455.

Poynton E, Okosun J. Liquid biopsy in lymphoma: Is it primed for clinical translation?. *EJHaem*, 2021, 2(3), 616-627.

Provencio M, Rodríguez M, Cantos B, Sabín P, Quero C, García-Arroyo FR, Rueda A, Maximiano C, Rodríguez-Abreu D, Sánchez A, Silva J, García V. mRNA in exosomas as a liquid biopsy in non-Hodgkin Lymphoma: a multicentric study by the Spanish Lymphoma Oncology Group. *Oncotarget*, 2017, 8(31), 50949-50957.

Qi F, Cao Z, Chen B, Chai Y, Lin J, Ye J, Wei Y, Liu H, Han-Zhang H, Mao X, Feng X, Dong M. Liquid biopsy in extranodal NK/T-cell lymphoma: a prospective analysis of cell-free DNA genotyping and monitoring. *Blood Adv*, 2021, 5(11), 2505-2514.

Qi J, Gu C, Wang W, Xiang M, Chen X, Fu J. Elevated Lactate Dehydrogenase Levels Display a Poor Prognostic Factor for Non-Hodgkin's Lymphoma in Intensive Care Unit: An Analysis of the MIMIC-III Database Combined With External Validation. *Front Oncol*, 2021, 11, 753712.

Rifai N, Chiu RWK, Young I, Burnham CAD, Wittwer CT. Tietz Textbook of Laboratory Medicine seventh edition. Missouri, Elsevier, 2023, str. 983.e1-983.e29.

Roschewski M, Rossi D, Kurtz DM, Alizadeh AA, Wilson WH. Circulating Tumor DNA in Lymphoma: Principles and Future Directions. *Blood Cancer Discov*, 2022, 3(1), 5-15.

Rossi D, Kurtz DM, Roschewski M, Cavalli F, Zucca E, Wilson WH. The development of liquid biopsy for research and clinical practice in lymphomas: *Report of the 15-ICML workshop on ctDNA*, *Hematol Oncol*. 2020, 38(1), 34-37.

Rossi D, Spina V, Brusca A, Gaidano G. Liquid biopsy in lymphoma. *Haematologica*, 2019, 104(4), 648-652.

Remon J, García-Campelo R, de Álava E, Vera R, Rodríguez-Peralto JL, Rodríguez-Lescure Á, Bellosillo B, Garrido P, Rojo F, Álvarez-Alegret R. Liquid biopsy in oncology: a consensus statement of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol*, 2020, 22(6), 823-834.

Sánchez-Beato M, Méndez M, Guirado M, Pedrosa L, Sequero S, Yanguas-Casás N, de la Cruz-Merino L, Gálvez L, Llanos M, García JF, Provencio M. A genetic profiling guideline to support diagnosis and clinical management of lymphomas. *Clin Transl Oncol*. 2024, 26(5), 1043-1062.

Sarkozy C, Huet S, Carlton VE, Fabiani B, Delmer A, Jardin F, Delfau-Larue MH, Hacini M, Ribrag V, Guidez S, Faham M, Salles G. The prognostic value of clonal heterogeneity and quantitative assessment of plasma circulating clonal IG-VDJ sequences at diagnosis in patients with follicular lymphoma. *Oncotarget*, 2017, 8(5), 8765-8774.

Scherer F, Kurtz DM, Diehn M, Alizadeh AA. High-throughput sequencing for noninvasive disease detection in hematologic malignancies. *Blood*, 2017, 130(4), 440-452.

Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, Stehr H, Craig AF, Esfahani MS, Lovejoy AF, Chabon JJ, Klass DM, Liu CL, Zhou L, Glover C, Visser BC, Poultsides GA, Advani RH, Maeda LS, Gupta NK, Levy R, Ohgami RS, Kunder CA, Diehn M, Alizadeh AA. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*, 2016, 8(364), 364ra155.

Schroers-Martin JG, Alig S, Garofalo A, Tessoulin B, Sugio T, Alizadeh AA. Molecular Monitoring of Lymphomas. *Annu Rev Pathol*, 2023, 18, 149-180.

Shi Y, Ding D, Qu R, Tang Y, Hao S. Non-Coding RNAs in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *OncoTargets and Therapy*, 2020, 13, 12097–12112.

Shi Y, Su H, Song Y, Jiang W, Sun X, Qian W, Zhang W, Gao Y, Jin Z, Zhou J, Jin C, Zou L, Qiu L, Li W, Yang J, Hou M, Xiong Y, Zhou H, Du X, Wang X, Peng B. Circulating tumor DNA predicts response in Chinese patients with relapsed or refractory classical hodgkin lymphoma treated with sintilimab. *EBioMedicine*, 2020, 54, 102731.

Shirai R, Osumi T, Keino D, Nakabayashi K, Uchiyama T, Sekiguchi M, Hiwatari M, Yoshida M, Yoshida K, Yamada Y, Tomizawa D, Takae S, Kiyokawa N, Matsumoto K, Yoshioka T, Hata K, Hori T, Suzuki N, Kato M. Minimal residual disease detection by mutation-specific droplet digital PCR for leukemia/lymphoma. *Int J Hematol*, 2023, 117(6), 910-918.

Shukla ND, Schroers-Martin JG, Sworder BJ, Kathuria KR, Alig SK, Frank MJ, Miklos DB, Coutre S, Diehn M, Khodadoust MS, Roschewski M, Kurtz DM, Alizadeh AA. Specificity of immunoglobulin high-throughput sequencing minimal residual disease monitoring in non-Hodgkin lymphomas. *Blood Adv*, 2024, 8(3), 780-784.

Simmons H, Lee LW, Lo A, Akers K, Kirsch IM, Jacob AP. Impact of Sequence Uniqueness on MRD Monitoring in NGS Immunoglobulin Sequencing: An Analysis of Ig Loci Among

>1200 Diffuse Large B-Cell Lymphoma Patients Tested By Clonoseq. *Blood*, 2023, 142(Supplement 1), 5029–5029.

Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(9), 531-548.

Spina V, Bruscazzin A, Cuccaro A, Martini M, Di Trani M, Forestieri G, Manzoni M, Condoluci A, Arribas A, Terzi-Di-Bergamo L, Locatelli SL, Cupelli E, Ceriani L, Moccia AA, Stathis A, Nassi L, Deambrogi C, Diop F, Guidetti F, Cocomazzi A, Annunziata S, Rufini V, Giordano A, Neri A, Boldorini R, Gerber B, Bertoni F, Ghielmini M, Stüssi G, Santoro A, Cavalli F, Zucca E, Larocca LM, Gaidano G, Hohaus S, Carlo-Stella C, Rossi D. Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2018, 131(22), 2413-2425.

Steffanoni S, Calimeri T. Narrative review: biomarkers, a hope towards early diagnosis in primary CNS lymphoma. *Annals of Lymphoma*, 2021, 5, 1-14.

Sworder BJ, Kurtz DM, Alig SK, Frank MJ, Shukla N, Garofalo A, Macaulay CW, Shahrokh Esfahani M, Olsen MN, Hamilton J, Hosoya H, Hamilton M, Spiegel JY, Baird JH, Sugio T, Carleton M, Craig AFM, Younes SF, Sahaf B, Sheybani ND, Schroers-Martin JG, Liu CL, Oak JS, Jin MC, Beygi S, Hüttmann A, Hanoun C, Dührsen U, Westin JR, Khodadoust MS, Natkunam Y, Majzner RG, Mackall CL, Diehn M, Miklos DB, Alizadeh AA. Determinants of resistance to engineered T cell therapies targeting CD19 in large B cell lymphomas. *Cancer Cell*, 2023, 41(1), 210-225.e5.

Tagawa H. MicroRNA in Malignant Lymphoma. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 889, 41-50.

Talotta D, Almasri M, Cosentino C, Gaidano G, Moia R. Liquid biopsy in hematological malignancies: current and future applications. *Front Oncol*, 2023, 13, 1164517.

Tan WY, Nagabhyrava S, Ang-Olson O, Das P, Ladel L, Sailo B, He L, Sharma A, Ahuja N. Translation of Epigenetics in Cell-Free DNA Liquid Biopsy Technology and Precision Oncology. *Curr Issues Mol Bio*, 2024, 46(7), 6533-6565.

Tatarczuch M, Waltham M, Shortt J, Polekhina G, Hawkes EA, Ho SJ, Trotman J, Brasacchio D, Co M, Li J, Ramakrishnan V, Dunne K, Opat SS, Gregory GP. Molecular associations of response to the new-generation BTK inhibitor zanubrutinib in marginal zone lymphoma. *Blood Adv*. 2023, 7(14), 3531-3539.

Tatischeff I. Extracellular Vesicle-DNA: The Next Liquid Biopsy Biomarker for Early Cancer Diagnosis?. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(5), 1456.

Thandra KC, Barsouk A, Saginala K, Padala SA, Barsouk A, Rawla P. Epidemiology of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Med Sci (Basel)*, 2021, 9(1), 5.

Van Arnam JS, Lim MS, Elenitoba-Johnson KSJ. Novel insights into the pathogenesis of T-cell lymphomas. *Blood*, 2018, 131(21), 2320-2330.

Velasco-Suelto J, Gálvez-Carvajal L, Comino-Méndez I, Rueda-Domínguez A. Hodgkin lymphoma and liquid biopsy: a story to be told. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1), 184.

Wang L, Balasubramanian P, Chen AP, Kummar S, Evrard YA, Kinders RJ. Promise and limits of the CellSearch platform for evaluating pharmacodynamics in circulating tumor cells. *Semin Oncol*, 2016, 43(4), 464-475.

Wedge E, Hansen JW, Garde C, Asmar F, Tholstrup D, Kristensen SS, Munch-Petersen HD, Ralfkiaer E, Brown P, Grønbaek K, Kristensen LS. Global hypomethylation is an independent prognostic factor in diffuse large B cell lymphoma. *Am J Hemato*, 2017, 92(7), 689-694.

Wong J, Muralidhar R, Wang L, Huang CC. Epigenetic modifications of cfDNA in liquid biopsy for the cancer care continuum. *Biomed J*, 2024, 100718.

Xu B, Wang T. Intimate cross-talk between cancer cells and the tumor microenvironment of B-cell lymphomas: The key role of exosomes. *Tumour Biol*, 2017, 39(6), 1010428317706227.

Yang H, Xun Y, Ke C, Tateishi K, You H. Extranodal lymphoma: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Mol Biome*, 2023, 4(1), 29.

Yazdanparast S, Huang Z, Keramat S, Izadirad M, Li YD, Bo L, Gharehbaghian A, Chen ZS. The Roles of Exosomal microRNAs in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Diagnosis, Prognosis, Clinical Application, and Biomolecular Mechanisms. *Front Oncol*, 2022, 12, 904637.

Yu D, Li Y, Wang M, Gu J, Xu W, Cai H, Fang X, Zhang X. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. *Mol Cancer*, 2022, 21(1), 56.

Zare N, Haghjooy Javanmard S, Mehrzad V, Eskandari N, Kefayat A. Evaluation of exosomal miR-155, let-7g and let-7i levels as a potential noninvasive biomarker among refractory/relapsed patients, responsive patients and patients receiving R-CHOP. *Leuk Lymphoma*, 2019, 60(8), 1877-1889.

Zhong Y, Tan GW, Bult J, Veltmaat N, Plattel W, Kluiver J, Enting R, Diepstra A, van den Berg A, Nijland M. Detection of circulating tumor DNA in plasma of patients with primary CNS lymphoma by digital droplet PCR. *BMC Cancer*, 2024, 24(1), 407.

Zou H, Liu W, Wang X, Wang Y, Wang C, Qiu C, Liu H, Shan D, Xie T, Huang W, Sui W, Yi S, An G, Xu Y, Ma T, Wang J, Qiu L, Zou D. Dynamic monitoring of circulating tumor DNA reveals outcomes and genomic alterations in patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma undergoing CAR T-cell therapy. *J Immunother Cancer*, 2024, 12(3), e008450.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

### 8.1. Sažetak

Limfomi su maligni tumori limfocitne loze koji se prezentiraju kao tumorske mase prvenstveno u limfoidnim organima. Prema SZO klasifikaciji dijele se u dvije glavne skupine, a u svakoj skupini nalazi se niz obitelji, entiteta/tipova i podtipova s heterogenim kliničkim ishodima i kompleksnim molekularnim karakteristikama koje se mijenjaju tijekom vremena. Konvencionalne metode za dijagnozu i praćenje limfoma su invazivne i tehnički zahtjevne, a heterogenost limfoma dodatno otežava dijagnozu i odabir odgovarajuće terapije. Razvoj tekuće biopsije otvorio je nove mogućnosti za neinvazivnu dijagnostiku, prognozu i praćenje ovih složenih hematoloških maligniteta. To je neinvazivna metoda kojom se iz uzorka krvi ili neke druge tjelesne tekućine izoliraju cirkulirajuće tumorske stanice (CTC), slobodna cirkulirajuća DNA (cfDNA), egzosomi, i cirkulirajuće RNA (miRNA, lncRNA). Tekuća biopsija pruža sveobuhvatnu sliku o heterogenosti limfoma i omogućuje praćenje dinamike tumora u stvarnom vremenu. Ovaj pregledni rad istražuje trenutno stanje i budući potencijal tekuće biopsije u limfomima te ističe njezinu korist u genotipiziranju limfoma, ranom otkrivanju relapsa, procjeni odgovora na liječenje te praćenju minimalne rezidualne bolesti i klonalne evolucije. Napredne metode temeljene na PCR-u i NGS-u značajno su poboljšale osjetljivost i specifičnost testova tekuće biopsije. Cirkulirajuća tumorska DNA (ctDNA) pokazala se kao najperspektivniji i najšire primjenjivani biljeg tekuće biopsije u različitim podtipovima limfoma. MiRNA, egzosomi i lncRNA imaju sposobnost pružanja dodatnih informacija o biologiji limfoma i progresiji bolesti. CTC imaju ograničenu korisnost u većini limfoma zbog njihovog malog broja, ali potencijalno mogu pružiti informacije u leukemijskim fazama bolesti. Unatoč obećavajućim rezultatima, izazovi ostaju u standardizaciji, kliničkoj validaciji i integraciji s postojećim dijagnostičkim i prognostičkim alatima. Stoga je potrebno riješiti navedene izazove prije integracije tekuće biopsije u rutinsku kliničku praksu.



## 8.2. Summary

Lymphomas are malignant neoplasms of lymphocyte lineage that present as tumor masses primarily involving the lymphoid organs. According to the WHO classification, they are divided into two main groups, with each group containing a range of families, entities/types and subtypes with heterogeneous clinical outcomes and complex molecular characteristics that change over time. Conventional methods for diagnosing and monitoring lymphomas are invasive and technically demanding, and the heterogeneity of lymphomas further complicates diagnosis and selection of appropriate therapy. The development of liquid biopsy has opened up new possibilities for non-invasive diagnosis, prognosis and monitoring of these complex hematological malignancies. It is a non-invasive method that isolates circulating tumor cells (CTCs), cell-free DNA (cfDNA), exosomes and circulating RNAs (miRNA, lncRNA) from a blood sample or other body fluid. Liquid biopsy provides a comprehensive picture of lymphoma heterogeneity and allows real-time monitoring of tumor dynamics. This review paper explores the current state and future potential of liquid biopsy in lymphomas and highlights its benefits in lymphoma genotyping, early detection of relapse, assessment of treatment response, and monitoring of minimal residual disease and clonal evolution. Advanced PCR-based and NGS-based methods have significantly improved the sensitivity and specificity of liquid biopsy tests. Circulating tumour DNA (ctDNA) has emerged as the most promising and widely applicable liquid biopsy marker in various lymphoma subtypes. MiRNA, exosomes, and lncRNA have the ability to provide additional information about lymphoma biology and disease progression. CTCs have limited utility in most lymphomas due to their small numbers, but can potentially provide information in leukemic phases of the disease. Despite promising results, challenges remain in standardization, clinical validation, and integration with existing diagnostic and prognostic tools. Therefore, these challenges need to be addressed before integrating liquid biopsy into routine clinical practice.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### TEKUĆA BIOPSIJA U LIMFOMIMA

Ivana Matošina

#### SAŽETAK

Limfomi su maligni tumori limfocitne loze koji se prezentiraju kao tumorske mase prvenstveno u limfoidnim organima. Prema SZO klasifikaciji dijele se u dvije glavne skupine, a u svakoj skupini nalazi se niz obitelji, entiteta/tipova i podtipova s heterogenim kliničkim ishodima i kompleksnim molekularnim karakteristikama koje se mijenjaju tijekom vremena. Konvencionalne metode za dijagnozu i praćenje limfoma su invazivne i tehnički zahtjevne, a heterogenost limfoma dodatno otežava dijagnozu i odabir odgovarajuće terapije. Razvoj tekuće biopsije otvorio je nove mogućnosti za neinvazivnu dijagnostiku, prognozu i praćenje ovih složenih hematoloških maligniteta. To je neinvazivna metoda kojom se iz uzorka krvi ili neke druge tjelesne tekućine izoliraju cirkulirajuće tumorske stanice (CTC), slobodna cirkulirajuća DNA (cfDNA), egzozomi, i cirkulirajuće RNA (miRNA, lncRNA). Tekuća biopsija pruža sveobuhvatnu sliku o heterogenosti limfoma i omogućuje praćenje dinamike tumora u stvarnom vremenu. Ovaj pregledni rad istražuje trenutno stanje i budući potencijal tekuće biopsije u limfomima te ističe njezinu korist u genotipiziranju limfoma, ranom otkrivanju relapsa, procjeni odgovora na liječenje te praćenju minimalne rezidualne bolesti i klonalne evolucije. Napredne metode temeljene na PCR-u i NGS-u značajno su poboljšale osjetljivost i specifičnost testova tekuće biopsije. Cirkulirajuća tumorska DNA (ctDNA) pokazala se kao najperspektivniji i najšire primjenjivani biljeg tekuće biopsije u različitim podtipovima limfoma. MiRNA, egzozomi i lncRNA imaju sposobnost pružanja dodatnih informacija o biologiji limfoma i progresiji bolesti. CTC imaju ograničenu korisnost u većini limfoma zbog njihovog malog broja, ali potencijalno mogu pružiti informacije u leukemijskim fazama bolesti. Unatoč obećavajućim rezultatima, izazovi ostaju u standardizaciji, kliničkoj validaciji i integraciji s postojećim dijagnostičkim i prognostičkim alatima. Stoga je potrebno riješiti navedene izazove prije integracije tekuće biopsije u rutinsku kliničku praksu.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 84 stranice, 7 grafičkih prikaza, 3 tablice i 146 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: limfomi, tekuća biopsija, cirkulirajuća tumorska DNA, mikroRNA, biljeg

Mentor: **Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Donatella Verbanac**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Kristina Radić**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: listopad 2024.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Department medical biochemistry and hematology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

## LIQUID BIOPSY IN LYMPHOMA

Ivana Matošina

### SUMMARY

Lymphomas are malignant neoplasms of lymphocyte lineage that present as tumor masses primarily involving the lymphoid organs. According to the WHO classification, they are divided into two main groups, with each group containing a range of families, entities/types and subtypes with heterogeneous clinical outcomes and complex molecular characteristics that change over time. Conventional methods for diagnosing and monitoring lymphomas are invasive and technically demanding, and the heterogeneity of lymphomas further complicates diagnosis and selection of appropriate therapy. The development of liquid biopsy has opened up new possibilities for non-invasive diagnosis, prognosis and monitoring of these complex hematological malignancies. It is a non-invasive method that isolates circulating tumor cells (CTCs), cell-free DNA (cfDNA), exosomes and circulating RNAs (miRNA, lncRNA) from a blood sample or other body fluid. Liquid biopsy provides a comprehensive picture of lymphoma heterogeneity and allows real-time monitoring of tumor dynamics. This review paper explores the current state and future potential of liquid biopsy in lymphomas and highlights its benefits in lymphoma genotyping, early detection of relapse, assessment of treatment response, and monitoring of minimal residual disease and clonal evolution. Advanced PCR-based and NGS-based methods have significantly improved the sensitivity and specificity of liquid biopsy tests. Circulating tumour DNA (ctDNA) has emerged as the most promising and widely applicable liquid biopsy marker in various lymphoma subtypes. MiRNA, exosomes, and lncRNA have the ability to provide additional information about lymphoma biology and disease progression. CTCs have limited utility in most lymphomas due to their small numbers, but can potentially provide information in leukemic phases of the disease. Despite promising results, challenges remain in standardization, clinical validation, and integration with existing diagnostic and prognostic tools. Therefore, these challenges need to be addressed before integrating liquid biopsy into routine clinical practice.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 84 pages, 7 figures, 3 tables and 146 references. Original is in Croatian language.

Keywords: lymphoma, liquid biopsy, circulating tumor DNA, microRNA, biomarker

Mentor: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Donatella Verbanac, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Kristina Radić, Ph.D.** Postdoctoral Researcher, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: October 2024.