

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přirodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Cell-free DNA a její význam při diagnostice a léčbě
lymfoidních malignit.**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Lucie Fryštáková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Martina Divoká, Ph.D.
Rok:	2020

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Chtěla bych poděkovat své vedoucí RNDr. Martině Divoké, Ph.D. za vstřícnost a odborné vedení této bakalářské práce. Dále velmi děkuji svým konzultantům Mrg. Janu Grohmannovi a Mgr. Romaně Jánské za čas, který se mnou strávili v laboratoři při zaučování různých laboratorních technik a za jejich odbornou pomoc při konzultacích zpracovávané problematiky. Poděkování patří také mé rodině za nenahraditelnou podporu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Lucie Fryštáková
Název práce	Cell-free DNA a její význam při diagnostice a léčbě lymfoidních malignit.
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Hemato-onkologická klinika FN a LF UP v Olomouci
Vedoucí práce	RNDr. Martina Divoká, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>Tato práce se zabývá cell-free DNA (cfDNA) a jejím významem při diagnostice a léčbě lymfoidních malignit.</p> <p>CfDNA je DNA tvořená volně cirkulujícími DNA fragmenty uvolňovanými do krevního řečiště přímo z nádorových buněk. Jelikož je cfDNA uvolňována do krve z různých oblastí nádoru, odráží jeho heterogenitu, čehož využíváme při tekuté biopsii, která se jeví jako vhodná alternativa klasické biopsie. CfDNA ukázala svůj potenciál jako minimálně invazivní biomarker pro časnou diagnostiku řady malignit, její význam u hematologických chorob je intenzivně studován.</p> <p>V této práci byla nejprve provedena izolace cfDNA, následně byla stanovena její koncentrace pomocí dvou metod – přístroje Qubit fluorometru 2.0 a kitu Qubit dsDNA HS Assay, pro porovnání byla provedena také kvantifikace pomocí technologie Sybrgreen koncentrační křivkou housekeeping genů s využitím primerů pro β2-microglobulin a β-actin. Poté byly sledovány změny hladiny koncentrace cfDNA vybrané skupiny pacientů s lymfoproliferativním onemocněním (DLBCL, HL). Získaná data byla statisticky zpracována a porovnána s daty klinickými.</p>
Klíčová slova	cfDNA, NHL, DLBCL, HL, tekutá biopsie
Počet stran	56
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Lucie Fryštáková
Title	The importance of Cell-Free DNA in diagnostics and treatment of lymphoid malignancies.
Type of thesis	Bachelor
Department	Hemato-oncology clinic, Olomouc
Supervisor	RNDr. Martina Divoká, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>The presented thesis aimed a cell-free DNA (cfDNA) and its importance in diagnostics and treatment of lymphoid malignancies.</p> <p>CfDNA is a DNA formed by freely circulating DNA fragments released into the bloodstream directly from tumor cells. CfDNA is released into the blood from different areas of the tumor and it reflects its heterogeneity, which can be used in liquid biopsy, as a suitable alternative to a classical biopsy. CfDNA has shown its potential as a minimally invasive biomarker for early diagnostics of a number of malignancies. Importance of cfDNA in hematological diseases is intensively studied.</p> <p>In this work, cfDNA was isolated, then the concentration was determined by two methods – Qubit fluorometer 2.0 and Qubit dsDNA HS Assay kit. For comparison, quantification was also performed using Sybrgreen technology with a concentration curve of housekeeping genes using primers for β2-microglobulin and β-actin. Changes in the levels of cfDNA concentration in a selected group of patients with lymphoproliferative disease (DLBCL, HL) were monitored. The obtained data were statistically processed and compared with clinical data.</p>
Keywords	cfDNA, NHL, DLBCL, HL, liquid biopsy
Number of pages	56
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE.....	3
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	4
3.1.	Cell-free DNA.....	4
3.1.1.	Objev cfDNA.....	4
3.1.2.	Charakteristika cfDNA	4
3.1.3.	Zdroje cfDNA	5
3.1.3.1.	Apoptóza	5
3.1.3.2.	Nekróza	6
3.1.3.3.	Aktivní uvolňování z buněk.....	7
3.1.4.	Tekutá biopsie.....	7
3.2.	Maligní lymfomy	8
3.2.1.	Definice a klasifikace	8
3.2.2.	Nejčastější nehodgkinské lymfomy.....	9
3.2.2.1.	Difúzní velkobuněčný B-lymfom.....	10
3.2.2.2.	Folikulární lymfom	10
3.2.2.3.	Lymfom z marginální zóny	11
3.2.2.4.	Lymfom z buněk pláště.....	12
3.2.2.5.	Burkittův lymfom.....	12
3.2.3.	Hodgkinův lymfom	13
3.2.4.	Diagnostika.....	14
3.2.5.	Léčba	15
3.3.	CfDNA v hematologii.....	16
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
4.1.	Biologický materiál	19
4.2.	Roztoky a reagenty.....	19
4.3.	Přístroje a pomůcky	20
4.4.	Spotřební materiál.....	20
4.5.	Metodika	22
4.5.1.	Krevní vzorky	22
4.5.2.	Příprava vzorků.....	22
4.5.3.	Izolace cfDNA	22
4.5.3.1.	Postup	23
4.5.4.	Měření koncentrace cfDNA.....	24

4.5.4.1. Postup	24
4.5.5. Zkouška primerů pro qPCR pomocí jednokolové PCR	25
4.5.5.1. Postup	25
4.5.6. Kvantitativní stanovení koncentrace cfDNA pomocí technologie Sybrgreen koncentrační křivkou housekeeping genů.....	26
4.5.6.1. Postup	26
4.5.7. Elektroforéza	27
4.5.7.1. Postup	27
4.5.8. Statistické zpracování.....	27
5 VÝSLEDKY	28
5.1. Naměřené hodnoty koncentrace cfDNA a kontrola její kvality.....	28
5.2. Statistické zpracování výsledků	32
5.2.1. Boxplot.....	33
5.2.2. Stanovení ROC křivky pro diagnostické účely	37
5.3. Kvantitativní stanovení koncentrace cfDNA pomocí technologie Sybrgreen koncentrační křivkou housekeeping genů.....	39
5.3.1. Zkouška primerů pro qPCR.....	39
5.3.2. Kvantitativní stanovení koncentrace cfDNA pomocí technologie Sybrgreen koncentrační křivkou housekeeping genů.....	40
6 DISKUZE	47
7 ZÁVĚR.....	50
8 LITERATURA	51
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	55

1 ÚVOD

Maligní lymfomy jsou nádorová lymfoproliferativní onemocnění postihující primárně lymfatické uzliny. Tvoří velmi heterogenní skupinu onemocnění a jsou spojeny se specifickými molekulárně biologickými změnami. Lymfomy rozlišujeme nehodgkinovy (NHL), které se dále podle původu dělí na B a T lymfoproliferace, a Hodgkinův lymfom (HL). Nejčastější nehodgkinské B-lymfomy, se kterými se u nás v České republice setkáváme, jsou difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL), folikulární lymfom (FL), lymfom z buněk marginální zóny (MZL), lymfom z buněk pláště (MCL) a lymfom z malých lymfocytů (SLL). Další důležitý NHL je Burkittův lymfom (Gribben *et Letai.*, 2010; Pytlík *et al.*, 2013; Belada *et al.*, 2018).

DLBCL je agresivní lymfom, který se vyskytuje primárně v lymfatických uzlinách, ale může se objevit i extranodálně. S jeho četností nad 40 % je nejběžnějším NHL. Není charakterizován jedinou translokací, jako je tomu např. u folikulárního lymfomu, který je typický translokací t(14;18) nebo u Burkittova lymfomu s translokací t(8;14). Objevují se u něj např. t(14;18), t(8;22), t(3;14) a t(3;22). Translokace t(14;18) souvisí se špatnou prognózou (Campbell, 2005; Pytlík *et al.*, 2013).

HL je onemocnění nejčastěji postihující mladé dospělé osoby. U těchto lymfomů většinu buněčného infiltrátu tvoří buňky nenádorové, které podléhají transformaci, nádorové buňky tvoří pouze kolem 1 %. Rozlišujeme 2 skupiny HL – klasický HL, který se dále dělí na 4 podtypy, a nodulární HL s predominancí lymfocytů (Bräuninger *et al.*, 2006).

Cell-free DNA (cfDNA) je extracelulární dvouřetězcová DNA, která se vyskytuje v krevním oběhu ve formě krátkých fragmentů, které jsou do krevního řečiště uvolňovány přímo z buněk podstupujících apoptózu. Dalšími zdroji cfDNA jsou nekróza a aktivní uvolňování z buněk. U zdravých osob je přítomna v nízkých koncentracích, zvýšené hladiny pozorujeme u různých patologických stavů. Od svého objevu v polovině 20. století se stala atraktivním předmětem výzkumu, jelikož ukázala svůj potenciál jako minimálně invazivní biomarker pro časnou diagnostiku řady malignit. Jelikož je cfDNA uvolňována do krve z různých oblastí nádoru, odráží jeho heterogenitu, čehož využíváme při tekuté biopsii, která je alternativou klasické biopsie (Jahr *et al.*, 2001; Hohaus *et al.*, 2009; Mitra *et al.*, 2012; Kubaczková *et al.*, 2017)

Vysoké hladiny cfDNA byly již dříve prokázány u celé řady solidních tumorů, její význam u hematologických chorob je intenzivně studován. CfDNA lze získat z krevní plazmy pomocí dostupných komerčních kitů a může být alternativním zdrojem nádorové DNA zejména pro identifikaci a genotypizaci lymfomů a možným biologickým markerem pro sledování minimální reziduální choroby (minimal residual disease, MRD). Monitoring

minimální zbytkové nemoci je stěžejním nenaplněným medicínským cílem v terapii lymfomů a zásadně by zpřesnilo hodnocení léčebné odpovědi pomocí PET/CT. Korelace dynamiky MRD a výsledku PET/CT výrazně omezí procento falešně pozitivních výsledků PETu a umožní přesnější a bezpečnější volbu terapie (Hohaus *et al.*, 2009; Camus *et al.*, 2017; Spina *et al.* 2018).

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je vypracovat literární rešerši na téma Cell-free DNA (cfDNA) a její role při diagnostice onemocnění a v průběhu léčby u vybraných lymfoproliferativních chorob.

Podstatou experimentální části práce je zavedení samotné metodiky izolace cfDNA do rutinní praxe laboratoře, sledování změny hladiny koncentrace cfDNA u vybrané skupiny pacientů v době diagnózy a v průběhu jejich léčby a korelace získaných dat s daty klinickými.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1. Cell-free DNA

Cell-free DNA (cfDNA) neboli volná cirkulující DNA je extracelulární dvouřetězcová DNA, která se vyskytuje v krevním oběhu ve formě krátkých fragmentů (Jahr *et al.*, 2001). U zdravých osob může být přítomna v nízkých koncentracích, zvýšené hladiny pozorujeme u různých patologických stavů. U pacientů s pokročilými stádii malignit jsou její hladiny podstatně vyšší (Hohaus *et al.*, 2009). Od svého objevu v polovině 20. století se stala atraktivním předmětem výzkumu, jelikož ukázala svůj potenciál jako minimálně invazivní biomarker pro časnou diagnostiku řady malignit (Kubacková *et al.*, 2017).

3.1.1. Objev cfDNA

Roku 1948 byla podle Mandel *et Metais* poprvé popsána přítomnost volné cirkulující DNA v lidské krvi. O necelých 20 let později, v roce 1966 byla pozorována vysoká hladina cfDNA v krevním séru u pacientů s autoimunitním onemocněním, systémovým lupem erythematoses (Mandel *et Metais*, 1948; Tan *et al.*, 1966).

Roku 1977 byl pomocí radioimunoanalýzy popsán její výskyt v souvislosti s nádory, kdy nemocní jedinci vykazovali výrazně vyšší hladinu cfDNA v plazmě, než tomu bylo u zdravých osob. U pacientů s metastazujícím onemocněním byla hladina vyšší než u těch s lokálními nádory, přetrvávající vysoká hladina obvykle souvisela se špatnou prognózou. Po radioterapii došlo ke zlepšení zdravotního stavu pacienta a k poklesu koncentrace cfDNA, z čehož vyplývá, že cfDNA odráží aktuální zdravotní stav (Leon *et al.*, 1977).

Stroun *et al.* (1989) se domnívali, že cfDNA v plazmě pacientů je odvozena z nádorových buněk. Potvrzením této domněnky byla detekce nádorově specifických mutací v cfDNA v onkogenu *RAS* u pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS) a akutní myeloidní leukémií (AML) pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) (Vasioukhin *et al.*, 1994).

3.1.2. Charakteristika cfDNA

Fragmenty cfDNA jsou obsaženy v periferní krvi a dalších tělních tekutinách, jako jsou moč a sliny (Kubacková *et al.*, 2017). U zdravých jedinců se cfDNA v periferní krvi nachází v nízké koncentraci do $100 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, jelikož jsou uvolňované fragmenty DNA degradovány játry a dalšími orgány. U patologických stavů (zánětů, akutního infarktu myokardu, mrtvici apod.) jsou její hladiny podstatně vyšší – tato vysoká hladina cfDNA je způsobena vyšší mírou úmrtí buněk (zejména náhle, tedy nekrózou) a zároveň nedostatečnou rychlostí jater takto velké množství fragmentů DNA odbourávat (Zeerleder, 2006). Vysoké hladiny (nad

1000 ng·ml⁻¹) byly pozorovány u pacientů s rakovinou (Kubacková *et al.*, 2017). Ve studii týkající se hladiny cfDNA u zdravých žen a žen s rakovinou prsu bylo zjištěno, že její vysoké množství korelovalo s větší úmrtností a také se zvýšením rizika přítomnosti rakoviny. CfDNA tedy může představovat významný zdroj biomarkerů pro včasné odhalení onemocnění a umožnit sledování jednotlivých fází karcinogeneze (Catarino *et al.*, 2008). Ze studií je ovšem mnohdy obtížné vyvodit jednoznačné závěry – skupina zkoumaných pacientů je obvykle malá a techniky použité pro kvantifikaci cfDNA se liší. Samotná kvantifikace cfDNA při diagnostice nemusí být kvůli překrývajícímu se výskytu u zdravých i nemocných osob objektivní, proto je vhodná kombinace s dalšími biomarkery nádorů krve (Schwarzenbach *et al.*, 2011).

CfDNA získáváme z plazmy nebo ze séra. I přes výrazně nižší obsah cfDNA v plazmě se jeví jako vhodnější zdroj, jelikož se v ní v průběhu času udržuje stabilnější hladina (Wong *et al.*, 2016).

Tato dvouřetězcová molekula získaná z normální plazmy je bohatá na páry cytosin-guanin. Její 3' konec obsahuje velké množství guaninu, 5' konec zejména cytosin (Suzuki *et al.*, 2008).

3.1.3. Zdroje cfDNA

Mechanismus uvolňování cfDNA z buněk do krevního oběhu není dosud zcela znám, mezi hlavní zdroje je považováno pasivní uvolňování, které zahrnuje apoptózu a nekrózu, dále aktivní uvolňování z buněk (Mitra *et al.*, 2012).

3.1.3.1. Apoptóza

Apoptóza (Obr. 1) je termín označující programovanou buněčnou smrt. Vyznačuje se smrštěním buňky, kondenzací chromatinu, fragmentací jaderné DNA a tvorbou apoptotických tělísek, která jsou následně degradována pomocí fagocytózy. Nedochozí při ní k poškození okolní tkáně. Poruchy jako nadměrná či nedostatečná apoptóza přispívají k patogenezi mnoha chorob a podílí se na růstu či regresi nádorů (Saikumar *et al.*, 1999).

Za morfologické a biochemické změny jsou zodpovědné intracelulární proteasy kaspasy s cysteinem v aktivním místě štěpící substráty za určitou asparagovou kyselinou, které se běžně nacházejí v živočišných buňkách jako neaktivní prekurzory enzymu, tzv. zymogeny. V případě aktivace se zymogeny rozštěpí a vytvoří velké a malé podjednotky aktivních enzymů – aktivní enzymy jsou heterotetramery ze 2 velkých a 2 malých podjednotek obsahující 2 aktivní místa. Kaspasy se vzájemně aktivují a spolupracují v proteolytických kaskádách. U savců bylo identifikováno 14 kaspas – z funkčního hlediska

je rozlišujeme na iniciační a efektorové, které jsou do značné míry závislé na iniciačních. Byť je většina z nich zapojena do apoptózy, existují také kaspasy účastníci se procesem zánětu (Reed, 2000).

Je známo více mechanismů pro aktivaci kaspas. První z nich je iniciace „vnější“ cestou pomocí vazby ligandu Fas na receptor smrti Fas, čímž dochází k aktivaci kaspasy 8. Dalším z nich je iniciace „vnitřní“ cestou, kdy dojde k uvolnění cytochromu c z mitochondrie, vazbou na kaspasový aktivační protein vzniká v cytosolu komplex, díky kterému je poté aktivována kaspasa 9 a spuštěna apoptóza. Tyto dráhy jsou považovány za oddělené, ale může dojít k překřížení na více úrovních. Proteiny kontrolující dráhy aktivace kaspasy často existují jako rodiny a interakce mezi nimi jsou zprostředkovány doménami úzce spojenými s regulací apoptózy, např. Bcl-2 homologní domény proteinů rodiny Bcl-2 s negativní regulací (Reed, 2000).

Apoptóza *in vitro* nakonec vede k permeabilizaci plazmatické membrány jako je tomu u nekrózy, proto se nazývá také „sekundární nekróza“, na rozdíl od apoptózy *in vivo*, při které jsou apoptotické buňky štěpeny dříve, než dojde k narušení membrány (Proskuryakov *et al.*, 2003).

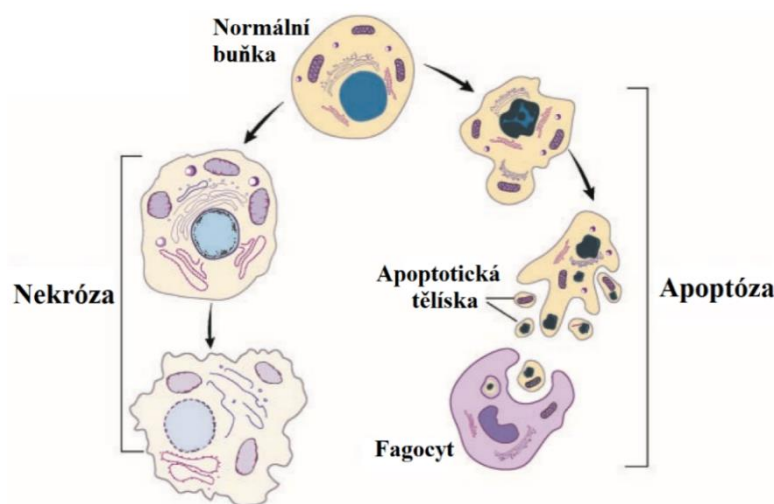
Konečným důsledkem apoptotických změn je aktivace endogenních nukleas, kdy vznikají fragmenty DNA 180-200 párů bází (base pair, bp) dlouhé, jelikož dochází ke štěpení DNA na nukleosomy (Ivanov *et al.*, 2015).

cfDNA vznikající z buněk podstupujících apoptózu se běžně nachází v krvi zdravých osob (Suzuki *et al.*, 2008).

3.1.3.2. Nekróza

K nekróze na rozdíl od apoptózy dochází při poškození buňky a morfologicky jsou zcela odlišné. Nekróza je charakteristická otokem buněk, rozpadem jádra a narušením membrán, což vede k vylití buněčného obsahu do extracelulárního prostoru, a tedy možné tvorbě zánětu. V buňkách podstupujících nekrózu obvykle chybí biochemické znaky apoptózy, jako je např. aktivace kaspas a fragmentace oligonukleosomální DNA – při nekróze tedy vznikají DNA fragmenty převážně větší než 10 000 bp. Studium diference apoptózy a nekrózy ovšem odhalilo, že lze v jedné buňce nalézt určité charakteristiky obou těchto jevů, a že existuje určité „spektrum“ sebevražedných programů, ve kterém jsou apoptóza a nekróza jeho extrémy (Saikumar *et al.*, 1999; Proskuryakov *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2008).

K nekrotickému uvolňování cfDNA z buněk dochází u patologických stavů, např. u nádorů (Kubacková *et al.*, 2017).



Obr. 1: Rozdíl mezi apoptózou a nekrózou. Nekrotické buňky jsou vlivem otoku zvětšené, apoptotické se naopak zmenšují (upraveno dle Saikumar *et al.*, 1999).

3.1.3.3. Aktivní uvolňování z buněk

K předpokladu, že cfDNA může být do krevního oběhu aktivně uvolňována z buněk, přispívá např. studie prováděná na buněčné linii HL-60 (linie lidské akutní myeloidní leukemie), kdy nedělící se buňky přednostně uvolňují nově nasyntetizovanou DNA v nukleoproteinovém komplexu (Stroun *et al.*, 2001).

3.1.4. Tekutá biopsie

Klasická biopsie je diagnostická metoda využívaná ke zjištění biologické povahy tkáně či buněk. Její nevýhodou je invazivní postup, kdy odběr provádíme přímo z nádoru. Je-li nádor heterogenní, nemusí být všechny maligní klonny obsaženy v odebraném vzorku (Kubackzová *et al.*, 2017).

Alternativou klasické biopsie je biopsie tekutá – jelikož je cfDNA uvolňována do krevního řečiště z různých oblastí nádoru, odráží jeho heterogenitu a také progresi. Další výhodou je možnost provádět opakované odběry během léčby, které nám umožní sledovat průběh terapie. Na druhou stranu má tekutá biopsie také jisté nevýhody, mezi něž patří např. nízké množství cirkulující nádorové DNA (ctDNA) a cirkulujících nádorových buněk (CTCs) ve vzorku, odlišnost jejich hladin u různých pacientů a nutnost ověření ve velkých studiích (Kubackzová *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

3.2. Maligní lymfomy

3.2.1. Definice a klasifikace

Maligní lymfomy jsou nádory z lymfatické tkáně, tedy nádory lymfatických uzlin a mimouzlinové lymfatické tkáně, které vznikají transformací lymfocytů. Je to heterogenní skupina onemocnění, která je spojena se specifickými molekulárně biologickými změnami. Základní typy genetických abnormalit nalezených v lymfomech jsou ty, které podporují zvýšenou proliferaci, např. gen *c-MYC*, a ty, které inhibují apoptózu, kam řadíme např. onkogen *BCL-2* (Gribben *et Letai.*, 2010).

Současná klasifikace vychází z nejnovějšího vydání WHO klasifikace hematologických malignit, které pochází z roku 2008, a následně bylo revidováno v roce 2017 (WHO z angl. World Health Organisation). Lymfomy rozlišujeme na ne Hodgkinovy (NHL) (Tab. 1), které se dále podle původu dělí na B a T lymfoproliferace, a Hodgkinův lymfom (HL) (Tab. 2). Hodgkinův lymfom stojí stranou díky jeho unikátním klinickým projevům a také léčbě. Tato klasifikace zahrnuje mnoho jednotek definovaných na základě kombinace různých znaků, mezi něž patří znaky imunologické, morfologické, molekulárně biologické či klinické (Pytlík *et al.*, 2013; Choi *et O'Malley*, 2017; Swerdlow *et al.*, 2017; Belada *et al.*, 2018).

Tab. 1: Zjednodušená WHO klasifikace lymfoidních malignit – ne Hodgkinovy lymfomy.

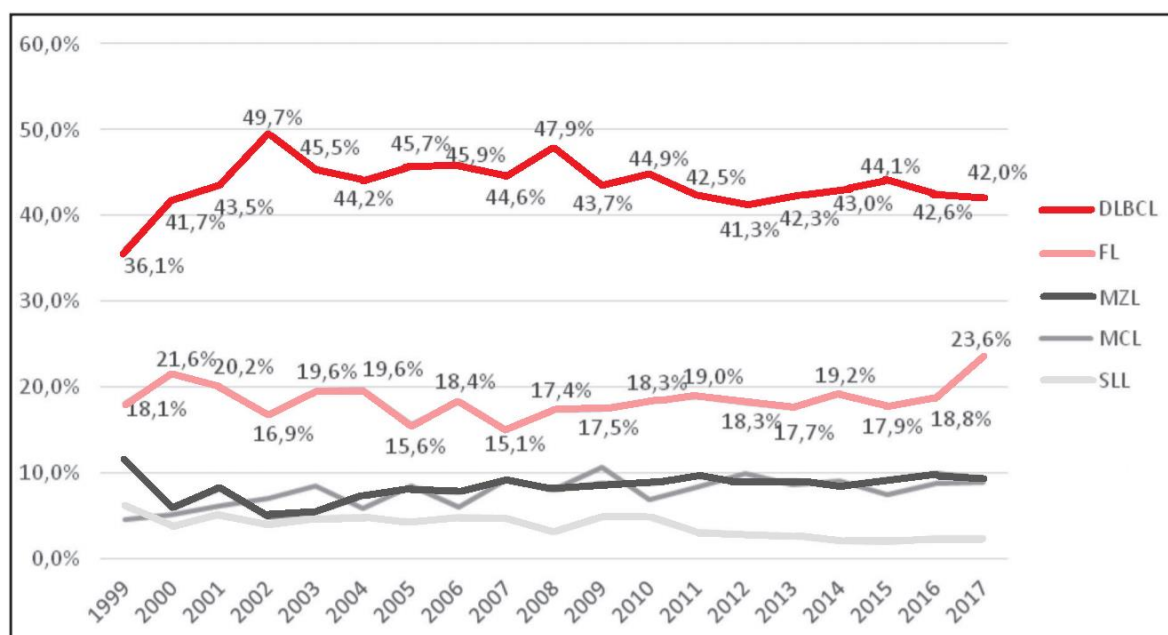
B malignity	Prekurzorové	B-akutní lymfoblastová leukemie/lymfom
	Periferní	Difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL) Primární mediastinální velkobuněčný lymfom (PMBCL) Folikulární lymfom (FL) Lymfom z buněk pláště (MCL) Burkittův lymfom (BL) Extranodální lymfom z buněk marginální zóny (MALT) Nodální lymfom z buněk marginální zóny (NMZL) Splenický B-lymfom z marginálních buněk (SMZL) Chronická lymfocytová leukemie/lymfom z malých lymfocytů Vlasatobuněčná leukemie Atd.
T a NK malignity	Prekurzorové	T-akutní lymfoblastová leukemie/lymfom
	Periferní	Mycosis fungoides Periferní T-lymfomy Sezaryho syndrom Primární kožní CD30 pozitivní T-lymfoproliferace Agresivní leukemie z NK buněk Atd.

Tab 2.: Zjednodušená WHO klasifikace lymfoidních malignit – Hodgkinův lymfom.

Hodgkinův lymfom	Nodulární lymfocytárně predominantní	
	Klasický lymfom	Hodgkinův Klasický Hodgkinův lymfom, nodulární skleróza Klasický Hodgkinův lymfom bohatý na lymfocyty Klasický Hodgkinův lymfom, smíšená celularita Klasický Hodgkinův lymfom, lymfocytární deplece

3.2.2. Nejčastější nehodgkinské lymfomy

NHL jsou nádorová onemocnění, u kterých pozorujeme postupný vzestup, na druhou stranu jsou poměrně dobře léčitelné. T-lymfomy mají horší prognózu než B-lymfomy, zároveň jsou ale méně časté – tvoří jen necelých 10 % všech NHL (Pytlík *et al.*, 2013). Mezi nejčastější nehodgkinské B-lymfomy patří difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL), folikulární lymfom (FL), lymfomy z buněk marginální zóny (MZL), lymfom z buněk pláště (MCL) a lymfom z malých lymfocytů (SLL), viz. Obr. 2.



Obr. 2: Zastoupení nejčastějších podtypů B lymfomů v ČR v % (data z registru KLS) (upraveno dle Belada *et al.*, 2018).

3.2.2.1. Difúzní velkobuněčný B-lymfom

Difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL) je heterogenní onemocnění, které se vyznačuje difúzní proliferací velkých nádorových B-buněk. Vyskytuje se nejčastěji v lymfatických uzlinách, ale může se objevit i extranodálně. S jeho četností nad 40 % je nejběžnějším lymfomem. Je to agresivní lymfom, který je potenciálně vyléčitelný za předpokladu neselhání léčby, v opačném případě má špatnou prognózu (Pytlík *et al.*, 2013).

Profilování genové exprese pomocí čipových analýz, které provedli Alizadeh *et al.* (2000) a Rosenwald *et al.* (2002), odhalilo existenci 3 hlavních podskupin DLBCL – podskupina GCB odvozená z buněk germinálního centra, podskupina ABC odvozená z *in vitro* aktivovaných periferních B-lymfocytů, a podskupina primárního mediastinálního B-lymfomu PMBCL. Jednotlivé podskupiny se lišily frekvencemi chromozomálních aberací. Pro ABC-DLBCL byla typická trisomie 3. chromozomu nebo zmnožení 3q či 18q21-22 chromozomu a delece 6q21-22 chromozomu, dále se u ní objevovaly *BCL-2* translokace. GCB-DLBCL se vyznačovala zmnožením genetického materiálu na dlouhých ramenech chromozomu 12q12 a konstitutivní aktivací dráhy jaderného faktoru NFκB, PMBCL zase zmnožením genetického materiálu krátkých ramen chromozomu 9p21 (Alizadeh *et al.*, 2000; Rosenwald *et al.*, 2002; Bea *et al.*, 2005).

PMBCL je v současnosti považován za samostatnou podskupinu NHL. Rozdělení pacientů do jednotlivých podskupin je důležité z prognostického hlediska – pouze 30 % osob s ABC na rozdíl od ostatních podskupin přežije po dobu 5 let (Bea *et al.*, 2005).

Tyto lymfomy nejsou charakterizovány jedinou translokací, jako je tomu např. u folikulárního lymfomu, který je typický přítomností translokace t(14;18) nebo u Burkittova lymfomu, kde je nalézána translokace t(8;14). Asi 20 % DLBCL má translokaci t(14;18) vedoucí k nadměrné expresi *BCL-2* genu s antiapoptotickým účinkem, což souvisí se špatnou prognózou. Vysoká exprese proteinu *BCL-2* však byla pozorována i v případech bez translokace t(14;18), což naznačuje potenciální nezávislost amplifikace *BCL-2* na této translokaci. Další translokace vyskytující se u DLBCL jsou např. t(8;22), t(3;14), t(3;22). Nejčastější jsou translokace zahrnující gen *BCL-6* umístěný na 3. chromozomu, což vede k jeho zvýšené expresi, a tudíž deregulaci. Velká část DLBCL nejspíše vzniká transformací buněk folikulárního lymfomu (Campbell, 2005; Gribben *et Letai*, 2010).

3.2.2.2. Folikulární lymfom

Folikulární lymfom (FL) je indolentní neboli nízké agresivní lymfom, který má i v případě relapsu poměrně dobrou prognózu, je ale pokládán za nevyléčitelný (Pytlík *et al.*, 2013).

Pro tyto lymfomy je typická translokace t(14;18) vyskytující se ve více než 85 % případů FL. Při této translokaci je gen *BCL-2* přesunut ze 14. na 18. chromozom, konkrétně do oblasti, kde se nacházejí geny pro těžké řetězce imunoglobulinů (*IgH*), čímž se dostává pod transkripční kontrolu prvků z lokusu *IgH* a dochází k porušení regulace exprese proteinu BCL-2, který je antiapoptotický. Předpokládá se, že exprese proteinu BCL-2 umožňuje přežití patologických lymfocytů, které by za normálních podmínek podlely apoptóze (Gribben *et Letai*, 2010). Na 18. chromozomu v úseku q21 dochází ke zlomům buď v major break region (MBR) nebo méně často v minor cluster region (mcr), na 14. chromozomu dochází ke zlomům v oblasti J genu (Schraders, 2005).

FL se může transformovat na agresivní lymfom s DLBCL morfologií, tato transformace zahrnuje řadu genetických změn, např. přestavby genu *c-MYC*, delecii *TP53* a trisomii 7. chromozomu (Gribben *et Letai*, 2010).

3.2.2.3. Lymfom z marginální zóny

Lymfomy z B-buněk marginální zóny (MZL) jsou skupina indolentních lymfomů B-lymfocytů pocházejících z marginální zóny sekundární lymfatické tkáně, tvoří přibližně 8 % všech NHL. Tato heterogenní skupina zahrnuje odlišné entity sdílející některé fenotypové a genotypové rysy, jejichž molekulární charakteristiky a klinický průběh se liší. Rozlišujeme 3 formy lymfomu marginální zóny B-buněk (MZBCL) – extranodální lymfom z B-buněk marginální zóny ze slizniční lymfatické tkáně (MALT), splenický MZBCL (SMZL) a nodální MZBCL (NMZL) (Campbell, 2005; Nakamura *et. Ponzoni*, 2020).

MALT je typický trisomií chromozomů 3, 12 a/nebo 18 a jejich translokacemi ovlivňujícími patogenezi onemocnění, např. u necelé poloviny pacientů vyskytující se translokace t(11;18) s fúzí genů *API2/MALT1*, translokace t(14;18) s fúzí *IgH-MALT1*, která je cytogeneticky identická translokací typické pro FL, či méně častá translokace t(1;14), při které dochází k přenosu genu *BCL-10* na 14. chromozom, kde je jeho exprese stimulována zesilovačem těžkého řetězce Ig a dochází tak k deregulaci genu *BCL-10*. Známá je také translokace t(3;14) s deregulací genu *FOXP1*. Tyto translokace různým způsobem ovlivňují aktivaci transkripčního nukleárního faktoru NFκB. MALT se mohou transformovat na DLBCL – většinou pouze t(11;18) negativní, jelikož tato transformace nebývá v DLBCL obvykle identifikována. MALT vzniká v lymfatické tkáni sliznice gastrointestinálního traktu, nejčastěji v žaludku při infekci *Helicobacter pylori*. (Campbell, 2005; Nakamura *et. Ponzoni*, 2020).

SMZL je neoplazma z malých B-lymfocytů postihující slezinu. Je charakteristický trisomií chromozomu 3 a výskytem delece 7q, translokace t(11;14) není přítomna (Campbell, 2005; Nakamura *et. Ponzoni*, 2020).

NMZL je morfologicky podobný MALT a SMZL. Nebyly u něj popsány specifické diagnostické znaky, v některých případech se vyskytuje translokace t(2;14) (Nakamura *et. Ponzoni*, 2020).

3.2.2.4. Lymfom z buněk pláště

Lymfom z buněk pláště (MCL) je ve většině případů agresivní lymfom se špatnou prognózou, medián doby přežití pacienta je obvykle 3-4 roky. Ze všech NHL má četnost necelých 10 %. Obecně převažuje u mužského pohlaví, jeho nejčastější výskyt pozorujeme u osob středního věku a starších mužů. Je považován za nevléčitelný (Pileri *et Falini*, 2009).

Tento lymfom je charakteristický translokací t(11;14), díky které dochází k přesunu genu pro cyklin D1 *BCL-1* pod kontrolu transkripčních prvků těžkého řetězce Ig. Následně nastává deregulace protoonkogenu *CCND1* kódujícího syntézu cyklinu D1, která způsobuje jeho nadměrnou expresi. Nadměrná exprese cyklinu D1 narušuje kontrolní bod pozdní G1 fáze buněčného cyklu a udržuje nepřetržitou proliferaci postižených lymfocytů. V normálních buňkách je cyklin D1 exprimován pouze přechodně – váže se na CDK4 a CDK6, čímž vzniká komplex CDK/cyklin, který fosforyluje tumor-supresorový gen *RBI* a dochází k proliferaci buněk. Pokud je retinoblastomový protein RB1 nefosforylovaný, je aktivní, a tudíž nedochází k proliferaci (Pileri *et Falini*, 2009; Gribben *et Letai*, 2010).

Na povrchu buněk se nacházejí antigeny CD5⁺, CD10⁻ a CD23⁻ (Gribben *et Letai*, 2010). Antigeny CD5⁺ a CD10⁻ umožňují odlišení od ostatních B-lymfomů (Wohlschlaeger *et al.*, 2003).

3.2.2.5. Burkittův lymfom

Burkittův lymfom (BL) je vysoce maligní, agresivní lymfom tvořený B-buňkami. Byť nepatří mezi nejčastější lymfomy, tak si získal velkou pozornost – často postihuje dolní čelist malých dětí a velmi rychle proliferuje. Je charakteristický vysokou mitotickou aktivitou a přítomností makrofágů obklopenými mnoha apoptotickými nádorovými buňkami, což vytváří pod mikroskopem obraz „hvězdného nebe“, který je typický pro rychle proliferující nádory. I přes rychlé dělení buněk je BL jeden z nejlépe léčitelných lymfomů (Casulo *et Friedberg*, 2015; Gribben *et Letai*, 2010).

Pro tento lymfom je charakteristická nadměrná exprese onkogenu *c-MYC* zapříčínující nekontrolovatelnou proliferaci. Tato nadměrná exprese je způsobena

chromozomální translokací t(8;14), díky které se exprese *c-MYC* dostává pod kontrolu prvků v lokusu *IgH*. Další translokace *c-MYC* jsou např. t(2;8) nebo t(8;22) (Gribben *et Letai*, 2010). Translokace *BCL-2* je u BL vzácnou abnormalitou a exprese *BCL-2* pravděpodobně není spojena s translokací (Yoshida *et al.*, 2015). Tyto translokace jsou charakteristické jak pro BL jako agresivní lymfom vyskytující se obvykle mimouzlinově, tak i pro zralou B-akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), se kterou má společný původ z buněk germinálního centra (Campbell, 2005).

Rozlišujeme 3 podtypy BL. První z nich je endemická forma spojená s virem Epstein-Barrové (EBV) typická pro děti obyvatel rovníkové Afriky a Středního východu, kde představuje nejčastější dětské nádorové onemocnění. Druhá forma, sporadická, není příliš obvyklá a vyskytuje se po celém světě, převážně u dětí. Věková distribuce tohoto podtypu BL má 2 vrcholy incidence – první ve věku kolem 10 let, druhý kolem 75 let. Třetí je forma asociovaná s imunodeficitem postihující především pacienty s virem lidské imunitní nedostatečnosti (HIV), často je EBV negativní (Casulo *et Friedberg*, 2015).

3.2.3. Hodgkinův lymfom

Hodgkinův lymfom (HL) je onemocnění nejčastěji postihující mladé dospělé osoby. U těchto lymfomů nádorové buňky představují pouze asi 1 % celkového buněčného infiltrátu, jeho zbytek tvoří buňky nenádorové (Bräuninger *et al.*, 2006). Rozlišujeme 2 skupiny HL – klasický HL, který se dále dělí na 4 podtypy, a nodulární HL s predominancí lymfocytů, viz. Tab. 2.

Klasický HL je maligní lymfoproliferativní onemocnění, které je charakteristické transformovanými Hodgkinovými a Reed-Sternbergovými nádorovými B-buňkami (HRS) pocházejícími z preapoptických B-buněk germinálního centra neschopných exprimovat afinitní receptor B-buněk (BCR) potřebný k apoptóze. Existuje několik způsobů, jakými se transformované HRS buňky brání buněčné smrti (Bräuninger *et al.*, 2006).

Prvním způsobem je konstitutivní aktivita transkripčního nukleárního faktoru NFκB, kterou poprvé popsal roku 1996 Bargou *et al.* V klidovém stavu je tento faktor agregován s IκB proteiny v cytoplazmě. Po stimulační signalizaci dochází k aktivaci IκB kinas, které fosforylují IκB proteiny, následně je NFκB uvolňován do jádra, kde iniciuje transkripci. Dle některých studií je konstitutivní jaderná aktivita faktoru zapříčiněná mutacemi v genu pro IκBα (Thomas *et al.*, 2004).

Dalším z nich je aktivace transkripčních faktorů – přenašeče signálu a aktivátoru transkripce STAT a aktivátorového proteinu AP1, a následně deregulace cyklinu D2 (Thomas *et al.*, 2004).

Rezistence receptoru Fas pro Fas ligand účastníci se apoptózy je dalším možným způsobem vyhnouti se buněčné smrti. Fas/CD95 je transmembránový receptor, který iniciuje signální kaskádu vedoucí k apoptóze. Provedení apoptózy je zabráněno zvýšenou expresí c-FLIP, což je silný inhibitor apoptózy zprostředkované Fas/CD95 (Thomas *et al.*, 2004).

HRS buňky jsou v případě klasického HL často infikovány EBV – EBV má důležitou roli v patogenezi tohoto lymfomu (Bräuninger *et al.*, 2006).

3.2.4. Diagnostika

Lymfomy se mohou vyskytnout v jakémkoliv tělním orgánu, nejčastější jsou ovšem nodální lymfomy. Ze strany odborníků je třeba dodržovat vysoký index podezření, a u dospělých osob histologicky ověřit každou uzlinu větší než 2 cm přítomnou po delší dobu než 2 měsíce bez souvislosti s infekčním onemocněním. Pokud je uzlina větší než 3 cm, je nutné ji ověřit. Dále je třeba sledovat nespecifické systémové příznaky, mezi něž patří např. dráždivý suchý kašel, teplota, noční pocení či úbytek hmotnosti (Pytlík *et al.*, 2013). Včasná diagnostika lymfoidních onemocnění je důležitá pro snížení mortality, proto jsou zapotřebí co nejvíce specifické a minimálně invazivní markery (Kubaczková *et al.*, 2017).

Histologické vzorky musejí být reprezentativní, ideálně by se měla vyjmout uzlina i s pouzdem. Aspirační punkce tenkou jehlou jsou nevhodné a často vedou k nesprávné diagnóze. V případě přetrvávajících nejasností je třeba provést další vyšetření (Pytlík *et al.*, 2013).

Ke zjištění klonality (např. přestavby *IgH*) se používá molekulárně biologická metoda PCR. Při zjišťování chromozomových aberací se využívají molekulárně cytogenetické metody – fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Zmíněná vyšetření mají nejen diagnostický význam – využívají se také pro monitorování dané léčby, k průkazu minimální reziduální choroby (MRD) (Pytlík *et al.*, 2013).

Před samotnou terapií je nutné zjistit rozsah onemocnění pacienta, tzv. staging, k čemuž se používají vyšetření fyzikální, analýza kostní dřeně, krevního obrazu a biochemie (důležité je vyšetření laktátdehydrogenasy (LDH)) a výpočetní tomografie (CT). Vyšetřuje se také funkční stav základních orgánů. Ke stagingu se používá vyšetření pozitronovou emisní tomografií (PET) či integrované pozitronové emisní tomografie s výpočetní tomografií (PET/CT), které využívají F-fluorodeoxyglukózu (FDG) akumulovanou na místě zánětů a nádorů, tedy tam, kde je tkáň metabolicky aktivní, jelikož DLBCL i FL jsou FDG-avidní. PET má u FL i prognostický význam, kdy se provádí po indukční terapii a poté je možné léčbu dle potřeby modifikovat (Pytlík *et al.*, 2013).

3.2.5. Léčba

Terapie NHL je obecně velmi úspěšná. Jelikož většina B-lymfomů exprimuje povrchové znaky CD, léčí se imunochemoterapií, což je chemoterapie doplněná anti-CD protilátkou. Dříve standardní chemoterapie CHOP (cyklofosfamid, vinkristin, adriamycin, prednison) používaná pro většinu lymfomů je dnes doplněná anti-CD20 protilátkou rituximabem (R-CHOP). K léčbě méně častých T-lymfomů majících horší prognózu se používá režim CHOP a u mladších pacientů obvykle autologní transplantace. Terapie relapsů závisí na druhu lymfomu pacienta, u osob s agresivními lymfomy mají relapsy špatnou prognózu (Pytlík *et al.*, 2013).

3.3. cfDNA v hematologii

cfDNA je tvořena DNA fragmenty, které jsou do krevního řečiště uvolňovány přímo z buněk podstupujících apoptózu. Její vysoké hladiny byly prokázány u řady solidních tumorů, význam u hematologických chorob je stále zkoumán (Kubacková *et al.*, 2017; Rossi *et al.*, 2017).

Již zmíněná studie, kterou provedl Vasioukhin *et al.* roku 1994 u osob s diagnózami MDS a AML, byla podnětem dalších studií cfDNA v hematologii. Pomocí PCR byly zkoumány bodové mutace genu *N-RAS* v DNA pocházející z plazmy, krevních buněk a kostní dřeně u 10 pacientů. Výsledky ukázaly, že různé mutace genu *RAS* byly vždy přítomny pouze v plazmatické DNA, zatímco v ostatních případech někdy chyběly – klasická vyšetření neodhalila všechny maligní klony onemocnění. Plazma se tedy jeví jako spolehlivý alternativní zdroj pro detekci molekulárních abnormalit (Vasioukhin *et al.*, 1994; Hohaus *et al.*, 2009).

Frickhofen *et al.* roku 1997 pomocí PCR detekoval přestavby *IgH* ve vzorcích plazmy a séra pacientů s B-buněčnými malignitami – NHL a ALL. U vzorků odebraných v době diagnózy či před léčbou byla v cfDNA detekována přestavba *IgH* v 86 % případů. U vzorků analyzovaných v časech před léčbou i při léčbě byla přestavba řetězce přítomna v 54 %. Výsledky ukázaly, že nádorově specifická DNA může být detekována z plazmy či séra většiny pacientů s B-lymfoproliferacemi, a že toto testování se jeví jako užitečné pro sledování reakce na léčbu. U pacientů s FL může být detekce přeuspořádání *BCL-2/IgH* v plazmě ukazatelem MRD (Hohaus *et al.*, 2009).

Kornacker *et al.* ve své studii publikované roku 1999 detekoval ze séra pacienta s HL přestavbu genu pro Ig specifického pro HRS buňky. V rozmezí 3 let bylo získáno více vzorků séra, které se následně analyzovaly pomocí PCR. Přestavba byla detekována v DNA získané při relapsu onemocnění, ve vzorcích odebraných během nebo po léčbě relapsu detekována nebyla.

Dlouho neexistovaly žádné kvantitativní údaje o hematologických neoplaziích, proto Hohaus *et al.* (2009) provedli studii zabývající se hladinami cfDNA u HL a NHL. Studie zahrnovala 142 pacientů s lymfomy (HL, DLBCL, FL, MCL) a 41 zdravých osob, stanovení bylo provedeno pomocí kvantitativní PCR v reálném čase pro gen *β -globin*. Výsledky ukázaly, že průměrné hladiny cfDNA u pacientů s HL ($43,3 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$), DLBCL ($91,6 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) a MCL ($74,1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) byly výrazně vyšší než hladiny kontrol – koncentrace cfDNA u zdravých jedinců měla průměr $12,1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, zatímco u FL ($22,9 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) se hladiny významně nelišily. Zvýšené hladiny plazmatické DNA byly pozorovány u pacientů s pokročilým stádiem malignit, u starších osob a osob se zvýšenými hladinami LDH.

Z prognostického hlediska byla zkoumána hladina cfDNA u DLBCL a FL – pravděpodobnost nepřítomnosti selhání léčby FFTF (freedom from treatment failure) na 2 roky byla 69 % pro DLBCL a 81 % pro HL. Pacienti s DLBCL a navíc zvýšenou hladinou plazmatické DNA měli dvouletou pravděpodobnost FFTF pouze 40 % na rozdíl od těch s normální hladinou cfDNA, kteří ji měli 88 %. U pacientů s HL a zvýšenou hladinou plazmatické DNA byla dvouletá pravděpodobnost FFTF 62 %, s normální hladinou 95 %.

Armand *et al.* (2013) pomocí nové, vysoce výkonné techniky sekvenování zjišťovali, zda je nádorová cfDNA detekovatelná u nově diagnostikovaných pacientů s DLBCL či mediastinálním velkobuněčným B-lymfomem (MLBCL). Vzorky byly získány z nádorových buněk, mononukleárních buněk periferní krve (PMBC) nebo plazmy. Studie byla provedena na 17 pacientech – u 16 pacientů s dostatečným množstvím amplifikované DNA byl při diagnostice nalezen alespoň jeden dominantní nádorový klon, u posledního pacienta s příliš nízkým množstvím DNA identifikován nebyl. Mezi 16 osobami s potvrzeným klonem mohla být nádorová cfDNA detekována před léčbou v plazmě u 11, v PBMC u 8, celkově byla detekovatelná u 13 pacientů (v plazmě/PBMC či zároveň v obou těchto zdrojích). U 3 pacientů nebyla při diagnostice detekována žádná nádorová cfDNA – tyto osoby měly onemocnění v počínajícím stádiu a neměly důkaz o nemoci pomocí PET/CT v době odběru – nádorová DNA tedy byla detekována u všech 13 pacientů. Nová technika umožnila stanovení dominantního nádorového klonu u 94 % pacientů s DLBCL či MLBCL z rutinních vzorků a u 100 % pacientů s dostatečným množstvím analytického materiálu. Po léčbě chemoimunoterapií byla nádorová cfDNA detekována pouze u 1 pacienta. Pro diagnostiku těchto chorob byly primárně využívány drahé zobrazovací metody s nutností ozáření, jelikož se předpokládalo, že DLBCL a MLBCL nemají cirkulující složku, což vylučovalo vývoj nástrojů pro hodnocení MRD u těchto onemocnění na rozdíl od nádorů s cirkulující složkou. Výsledky ukazují, že metoda sekvenování může být spolehlivá pro hodnocení nádoru a pro detekci MRD.

Rossi *et al.* (2017) se ve své studii zaměřili na sledování genetického profilu DLBCL a jeho modifikací po léčbě pomocí ultra-hlubokého cíleného sekvenování plazmy. Toto sekvenování před léčbou správně odhalilo mutace typické pro DLBCL s více než 90% citlivostí a 100% specifitou. Genotypizace cfDNA také umožnila náhradu pro mutace nedetekovatelné tkáňovou biopsií, jejichž obtížná detekce byla nejspíše zapříčiněna heterogenitou nádoru a velkou anatomickou vzdáleností od místa provedení biopsie. Výsledky analýzy vzorků pacientů po léčbě chemoterapií rituximab-cyklofosfamid-doxorubicin-vincristin-prednisonem (R-CHOP) ukázaly rychlou clearanci mutací charakteristických pro DLBCL z cfDNA u pacientů nerezistentních na tuto léčbu,

u rezistentních mutace nezmizely a byly u nich z cfDNA detekovány nové mutace označující rezistentní klony. Studie dokázala, že genotypizace cfDNA je pro detekci mutací stejně přesná jako běžná biopsie a je vhodná pro sledování vývoje klonů a vzniku rezistentních klonů na danou léčbu.

Jelikož genetika klasického HL (cHL) byla stále do velké míry nepochopena, Spina *et al.* (2018) provedli výzkum zahrnující 80 nově diagnostikovaných a 32 recidivujících pacientů s cHL, celkově pomocí sekvenování nové generace profilovali 349 vzorků krve a tkání. Ukázalo se, že nádorová cfDNA obsažená v plazmě odrážela genetiku HRS buněk, a může tedy sloužit pro genotypizaci cHL. Měření hladiny nádorové cfDNA během léčby se v kombinaci s PET/CT jeví jako užitečné pro sledování MRD a včasnou identifikaci pacientů rezistentních na terapii. Výsledky ukázaly, že tumorová cfDNA může sloužit jako nový biomarker cHL.

CfDNA lze získat z plazmy pomocí komerčních kitů. Může být alternativním zdrojem nádorové DNA pro genotypizaci a identifikaci lymfomů a také možný marker pro sledování MRD, jejíž monitoring je nenaplněným medicínským cílem v terapii lymfomů a výrazně by zpřesnil hodnocení léčebné odpovědi pomocí PET/CT. Korelace dynamiky MRD a výsledku PET/CT výrazně omezí četnost falešně pozitivních výsledků PETu a umožní přesnější volbu terapie (Hohaus *et al.*, 2009; Camus *et al.*, 2017; Spina *et al.* 2018).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Biologický materiál

Do této práce byly zahrnuty vzorky 20 zdravých dárců a 76 pacientů (40 žen, 36 mužů) s lymfoproliferativním onemocněním – 53 pacientů s DLBCL a 23 pacientů s HL, konkrétně klasickým HL nodulárně sklerotickým. Tito pacienti byli diagnostikováni a léčeni na Hemato-onkologické klinice FN a LF UP Olomouc. Vzorky byly získány v časovém rozmezí od září 2017 do června 2020.

Venózní krev pacientů a zdravých dárců byla odebírána do speciálních skleněných zkumavek s antikoagulačním roztokem tridraselné soli kyseliny etylendiamintetraoctové (K_3EDTA) a látkou stabilizující cfDNA v plazmě (Streck).

4.2. Roztoky a reagensie

Reverzně osmotická a ultračistá voda ze systému Direct-Q 3UV (Millipore)

10x PBS (lékárna FNOL)

Ethanol 96% (Fargon)

ACL a ACB pufr (Qiagen)

AVE pufr (Qiagen)

ACW1 a ACW2 pufr (Qiagen)

Proteináza K (Qiagen)

PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific)

Specifické primery (East Port Praha)

100 bpDNA Ladder (Promega)

Lambda DNA/hindIII Marker (Thermo Fisher Scientific)

Agaróza I pro DNA elektroforézu (Amresco)

Ethidium bromid ($10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) (Top-Bio)

Nanášecí pufr („LoadingDye”) 6x (Promega)

Parafínový olej (lékárna FN)

dATP, dCTP, dGTP, dTTP ($100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Promega)

AmpliTaQ Gold™ DNA Polymerase with Buffer II and $MgCl_2$ (Applied Biosystems, Life technologies)

10x TBE elektroforetický pufr, pH 8,3–8,5:

$1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris

$0,89 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselina boritá

$0,02 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA

Agarózový 1,5/2% gel:

1,5/2 g agarózy

100 ml 1x TBE pufru

2 µl ethidium bromidu

4.3. Přístroje a pomůcky

Zařízení na úpravou vody Direct-Q 3UV (Millipore)

Automatické pipety jednokanálové (Eppendorf, Finnpiquette)

Stolní minicentrifuga C 1301 (Labnet)

Termoblok Bio TDB-100 (Biosan)

Mrazicí boxy (-80 °C, -20 °C) (Sanyo)

Ledničky (4-8 °C) (Zanussi)

Centrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf)

Automatický izolátor Qiacube (Qiagen)

Qubit 2.0 Fluorimetr (Life Technologies)

QIAvac 24 Plus (Qiagen)

Inkubátor NB-205 (N-Biotek, Inc.)

Analytická váha FA-2000 (LAB system)

Dokumentační systém AlphaDigiDoc™RT2 (Alpha Innotech)

Mikrovlnná trouba 1195 (ETA)

Výrobník ledu Icematic F100 Compact (CastelMac SpA)

Elektroforéza horizontální MSMIDI (Clever Scientific Ltd)

Zdroj k napětí ELFO ST 304 (Apelex)

Termoblok (BioSan)

Thermocycler peqSTAR 2x Gradient (PEQLAB-Life Science)

Vortex CERTOMAT® MV (B. Braun Biotech International)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche Life Science)

4.4. Spotřební materiál

Jednorázové špičky s filtrem

Kónické plastové zkumavky 15ml, 50ml

Zkumavky 2ml, 1,5ml

Sérologické pipety 5ml, 10ml

Pasteurovy pipety

Latexové ochranné rukavice

Odběrové zkumavky Cell-free DNA/RNA BCT (Streck)

Pipetor Bibbyjet (Stuart)

Tenkostěnné 0,5ml mikrozukavky (Invitrogen)

Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen)

QIAamp Circulating Nucleoid Acid kit (Qiagen)

FrameStar 96-jamkové Semi-Skirted PCR destičky Roche style (Institute of Applied Biotechnologies)

Adhezivní qPCR fólie (Institute of Applied Biotechnologies)

4.5. Metodika

4.5.1. Krevní vzorky

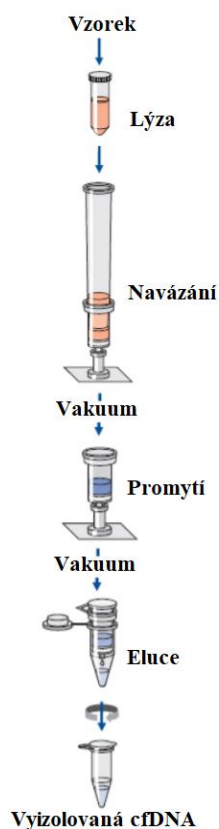
Pro analýzu byla použita venózní krev pacientů odebíraná do speciálních skleněných zkumavek s antikoagulačním roztokem K₃EDTA a látkou stabilizující cfDNA v plazmě (Streck).

4.5.2. Příprava vzorků

Odebraný vzorek krve ve skleněné zkumavce vložíme do centrifugy nastavené na 1 300 rpm, centrifugace probíhá 20 minut při 4 °C. Poté horní vrstvu pomocí Pasteurovy pipety přeneseme do čisté 15ml zkumavky a provedeme další centrifugaci při 5 400 rpm po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Pomocí Pasteurovy pipety přeneseme 4 ml plazmy do nové 15ml zkumavky tak, aby nebyl přenesen usazený pelet. Zkumavku s peletem odstraníme. Zkumavku se získanou plazmou můžeme použít k izolaci cfDNA ihned nebo ji uskladníme v hlubokomrazícím boxu nastaveném na teplotu -80 °C.

4.5.3. Izolace cfDNA

Proces izolace (Obr. 3) je rozdělen do 4 následujících kroků. Prvním je lýza, kdy dochází k uvolnění cfDNA z vazby na přenašeč pomocí proteinázy, lyzačního pufru a zvýšené teploty, jelikož cfDNA je v krvi obvykle navázána na proteiny. Následuje navázání cfDNA na křemičitou membránu kolonky a odsátí nečistot vakuovou pumpou. Dalším krokem je promytí nečistot pomocí pufrů a ethanolu a následné odsátí zbylých nečistot vakuovou pumpou. Posledním krokem je eluce cfDNA z membrány do elučního pufru. Pro získání cfDNA z plazmy byl použit kit QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit od firmy Qiagen (Qiagen, 2019).



Obr. 3: Schéma izolace cDNA metodou QIAamp Circulating Nucleic Acid (upraveno dle Qiagen, 2019).

4.5.3.1. Postup

K izolaci používáme 4 ml plazmy, které musíme vytemperovat na laboratorní teplotu.

1. Nejprve do každé čisté označené 50ml zkumavky napipetujeme 400 μ l Proteinázy K.
2. Poté přidáme 4 ml plazmy.
3. Následně přidáme 3,2 ml ACL pufru. Zkumavky vortexujeme po dobu 30 s.
4. Inkubujeme při teplotě 60 °C 1 hod.
5. Přidáme 7,2 ml ACB pufru. Zkumavky opět vortexujeme po dobu 30 s. a poté do kroku č. 7 chladíme ledem.
6. Do přístroje QIAvac 24 Plus vsuneme kohoutky, do kterých nasuneme nejprve vakuové konektory, do těch poté vložíme QIAamp Mini kolonky a do nich 20ml extendery – tak připravíme aparaturu.
7. Do jednotlivých extenderů opatrně přelijeme obsah zkumavek a zapneme vakuovou pumpu. Aparaturu připravíme na tlak -800 až -900 mBar, poté zahájíme izolaci. Tento proces trvá přibližně 10-15 min., extendery pak odstraníme.
8. Do každé QIAamp Mini kolonky přidáme 600 μ l ACW1 pufru, zapneme vakuovou pumpu a obsah necháme zcela protéct, poté vakuovou pumpu vypneme a necháme tlak klesnout na 0 mbar.

9. Následně přidáme 750 μ l ACW2 pufru a proces provedeme stejně jako s ACW1 pufrém.
10. Nakonec proces opakujeme s 96% ethanolem.
11. QIAamp Mini kolonky přeneseme do čistých 2ml tub a centrifugujeme při 14 000 rpm po dobu 3 min.
12. Poté QIAamp Mini kolonky dáme do nových, čistých 2ml tub a inkubujeme je 10 min. v termobloku předehřátém na 56 °C. Staré 2ml tuby odstraníme. Po dobu inkubace necháme víka otevřená, abychom vysušili membránu.
13. Kolonky přeneseme do 1,5ml mikrozkušavek, 2ml tuby odstraníme.
14. Na střed každé membrány QIAamp Mini kolonky nanese 50 μ l elučního pufru AVE. Mikrozkušavky necháme inkubovat při pokojové teplotě po dobu 3 min.
15. Po inkubaci provedeme poslední centrifugaci při 14 000 rpm v délce 1 min. QIAamp Mini kolonky odstraníme a mikrozkušavky se získanou cfDNA uzavřeme víčky.
16. Od 8. kroku lze provést automatizaci přístrojem, který eluuje do objemu 50 μ l.

4.5.4. Měření koncentrace cfDNA

Pro stanovení koncentrace vyizolované cfDNA použijeme přístroj Qubit fluorometr 2.0 a kit Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific, 2015).

Princip spočívá v navázání specifického fluorescenčního barviva (fluoroforu) na molekuly cfDNA a změření fluorescenčního signálu. Množství signálu je přímo úměrné koncentraci cfDNA v daném roztoku.

4.5.4.1. Postup

1. Podle počtu vzorků si nachystáme 0,5ml Qubit assay zkumavky. Se zkumavkami manipulujeme pouze za jejich víčko. Qubit Reagent a pufr vytemperujeme na laboratorní teplotu.
2. Do plastové zkumavky si připravíme Qubit pracovní roztok smícháním Qubit dsDNA HS Reagentu (fluorofor) s Qubit dsDNA HS pufrém v poměru 1:200. Směs opatrně promícháme. Pracovní roztok po přípravě chráníme před přímým slunečním světlem.
3. Do mikrozkušavek určených pro standardy napipetujeme 190 μ l Qubit pracovního roztoku a 10 μ l příslušného standardu. Krátce vortexujeme.
4. Do mikrozkušavek určených pro vzorky napipetujeme 199 μ l Qubit pracovního roztoku. Poté přidáme do každé mikrozkušavky jednotlivé vzorky v objemu 1 μ l. Opět krátce vortexujeme. Inkubujeme při pokojové teplotě cca 2 min.

5. Při analýze vzorků pracujeme v modu „High Sensitivity“. Ze standardů si vytvoříme kalibrační křivku pro měření vzorků. Následně po její kontrole změříme vzorky. Přístroj zobrazuje hodnotu tzv. QF value, která se musí přepočítat pomocí ředícího faktoru. Výsledek tedy můžeme vypočítat podle vzorce (koncentrace vzorku = QF value \times 200/x, kde *QF value* = hodnota daná Qubit fluorometrem, *x* = množství μ l cfDNA přidané do zkumavky) nebo přímo v přístroji. Koncentraci přepočítáváme na objem cfDNA 1 μ l.

4.5.5. Zkouška primerů pro qPCR pomocí jednokolové PCR

4.5.5.1. Postup

1. Dle počtu vzorků (+ kontrola) si připravíme 2 reakční směsi (Tab. 3) lišící se jednotlivými primery (Tab. 4) (β -actin – podle Wang *et al.*, 2003, β 2-microglobulin – Laboratoř molekulární biologie, Hemato-onkologická klinika FN a LF UP v Olomouci, Mgr. Jana Navrátilová)

Tab. 3: Složení reakční směsi pro PCR.

Reagencie	Zásobní koncentrace	Objem na 1 vzorek [μ l]
TK H ₂ O	-	17,3
Buffer Applied Biosystems	10x	2,5
MgCl ₂ Applied Biosystems	25 mM	2,0
dNTPs (Promega)	10 mM	0,5
primer β -actin/ β 2-microglobulin F	10 mol/l (0,01 mM)	0,75
primer β -actin/ β 2-microglobulin R	10 mol/l (0,01 mM)	0,75
Taq DNA Polymerase Applied Biosystems	5 U/ μ l	0,2
DNA	-	x*

*množství DNA dle její koncentrace

Tab. 4: Použité primery a jejich sekvence.

Primery pro	Očekávaná délka produktů [bp]	Sekvence
β 2-microglobulin	77	F: 5'TGAGTGCTGTCTCCATGTTTGATGTAT'3 R: 5'CCTCTAAGTTGCCAGCCCTCCTA'3
β -actin	101	F: 5'GCACCACACCTTCTACAATGA'3 R: 5'GTCATCTTCTCGCGGTTGGC'3

2. Do 2 sad 0,2ml PCR mikrozkuvek (1. s primery pro β -actin, 2. s primery pro β 2-microglobulin) napipetujeme do každé 24 μ l připravených reakčních směsí.

- Do kontrolních mikrozkušavek přidáme 1 μl H_2O , do ostatních mikrozkušavek určitý počet μl DNA (cfDNA/gDNA) dle koncentrace dané DNA. Nakonec do každé kápneme 2 kapky parafinového oleje.
- Provedeme PCR dle Tab. 5. Následně je PCR zchlazena na 4 $^{\circ}\text{C}$.

Tab. 5: Teplotní profil PCR reakce – β 2-microglobulin, β -actin.

Denaturace	Amplifikace		Finální elongace
95 $^{\circ}\text{C}$	95 $^{\circ}\text{C}$	60 $^{\circ}\text{C}$	72 $^{\circ}\text{C}$
10 min.	45 s.	60 s.	10 min.
	35x		

- Na 2% agarózový gel připravený v 1x TBE pufru obsahujícím ethidium bromid napipetujeme vzorky smíchané s 5 μl nanášecího pufru („LoadingDye“). Elektroforéza v 1x TBE pufru probíhá při 100 V cca 1 hod.
- Výsledek – Obr. 9.

4.5.6. Kvantitativní stanovení koncentrace cfDNA pomocí technologie Sybrgreen koncentrační křivkou housekeeping genů

Sybrgreen je nejvyžívanější technologií při qPCR. Patří k nespecifickým fluorescenčním substrátům. Jelikož je to interkalační látka, navazuje se pouze na dsDNA, poté při její denaturaci dochází k uvolnění Sybrgreenu a tím klesá fluorescence. V průběhu reakce dochází k opakujícímu se nárůstu a poklesu fluorescence podle dané fáze reakce.

4.5.6.1. Postup

- Připravíme si reakční směs dle tabulky (Tab. 6).

Tab. 6: Příprava reakční směsi.

Reagencie	Konečná koncentrace	Objem [μl]
miliQ H_2O	-	3,8
β -actin/ β 2-microglobulin – primer F 10 $\mu\text{mol/l}$ (0,01 mM)	0,3 $\mu\text{mol/l}$ (300 nM)	0,6
β -actin/ β 2-microglobulin – primer R 10 $\mu\text{mol/l}$ (0,01 mM)	0,3 $\mu\text{mol/l}$ (300 nM)	0,6
PowerUp Sybr Green master mix 2x konc.	1x	10
Objem reakčního MIXU	-	15
cfDNA templát/standard/ H_2O	-	5
Výsledný objem	-	20

- Do 96 jamkové PCR destičky nejprve napipetujeme do každé zvolené jamky 15 μl připravené reakční směsi. Poté do jednotlivých jamek přidáme 5 μl cfDNA, standardu či vody.

3. Destičku zakryjeme krycí fólií a krátce zvortexujeme.
4. Provedeme reakci (Tab. 7).

Tab. 7: Teplotní profil reakce.

Teplota	Čas	Počet cyklů	Akvizice	Název
50 °C	3 min.	1x	-	Aktivace UDG*
95 °C	5 min.	1x	-	Aktivace polymerázy + deaktivace UDG
95 °C	20 s.	40x (β-actin)	-	Amplifikace
60 °C	40 s.	50x (β2-microglobulin)	1x	
95 °C	5 s.	1x	-	-
60 °C	1 min.	1x	-	Křivka tání
97 °C	-	1x	kontinuální růst teploty	Křivka tání [†]
40 °C	30 s.	1x	-	Chlazení

*Uracil-DNA glykosyláza

[†]5 akvizicí na každý stupeň teploty

5. Výsledek – Obr. 10-14.

4.5.7. Elektroforéza

Elektroforézu provádíme z důvodu kontroly kvality vyizolované cfDNA.

4.5.7.1. Postup

1. Do 0,2ml mikrozkušavek napipetujeme 5 µl nanášecího pufru („LoadingDye“) a přidáme určitý počet µl vzorku DNA (cfDNA/gDNA) dle koncentrace dané DNA.
2. Připravíme 1,5% agarózový gel v 1x TBE pufru obsahujícím ethidium bromid.
3. Po nanesení vzorků a markeru na gel proběhne elektroforéza v 1x TBE pufru při 100 V cca 1 hod.
4. Gel po proběhnutí elektroforézy vyhodnotíme pomocí dokumentačního systému Alpha DigiDoc TMR2.
5. Výsledek – Obr. 4.

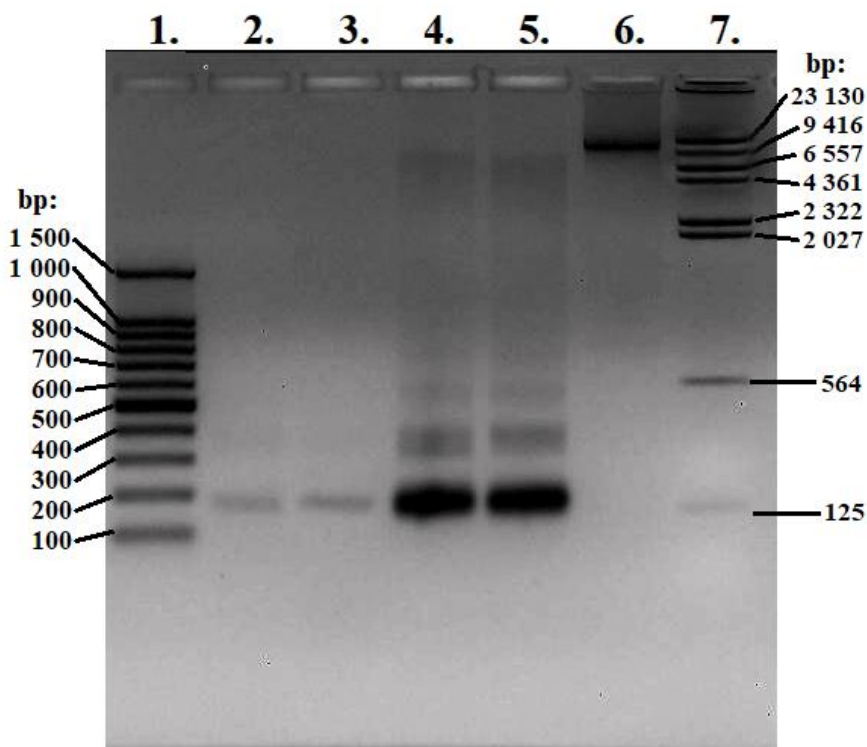
4.5.8. Statistické zpracování

Získaná data byla statisticky zpracována pomocí Microsoft Excel 2016 (MICROSOFT s.r.o.) – byl vypočten průměrný, minimální a maximální věk pacientů, průměrné hodnoty koncentrace cfDNA, sestrojeny krabicové grafy (Boxplot) a ROC (Receiver Operating Characteristic) křivky.

5 VÝSLEDKY

5.1. Naměřené hodnoty koncentrace cfDNA a kontrola její kvality

Pacienti byli dle naměřené hodnoty koncentrace cfDNA získané izolací metodou QIAamp Circulating Nucleid Acid rozděleni do následujících skupin – ti, u kterých bylo provedeno více odběrů, kdy první odběr byl proveden v době diagnózy, druhý během terapie a třetí po terapii: pacienti s klesající hodnotou koncentrace cfDNA (Tab. 8), pacienti se stoupající hodnotou koncentrace cfDNA (Tab. 9), pacienti s konstantní hodnotou koncentrace cfDNA (Tab. 10). Pacienti, u kterých byl proveden pouze jeden odběr, byli rozděleni následovně: pacienti s nově diagnostikovaným lymfomem (Tab. 11), pacienti s regresí/remisí lymfomu (Tab. 12) a pacienti s progresí lymfomu/relapsem onemocnění (Tab. 13). Jako kontrola sloužili zdraví dárce (Tab. 14). Pro kontrolu kvality vyizolované cfDNA byla provedena elektroforéza (Obr. 4).



Obr. 4: Kontrola kvality cfDNA pomocí agarozové elektroforézy, 1,5% gel. 1. jamka – marker 100 bp promega; 2. jamka – zdravý dárce, nanášeno 12,8 ng cfDNA; 3. jamka – zdravý dárce, nanášeno 25,6 ng cfDNA; 4. jamka – pacient (NHL), nanášeno 287,4 ng cfDNA; 5. jamka – pacient (HL), nanášeno 318 ng cfDNA; 6. jamka – genomická DNA, nanášeno 97,8 ng gDNA; 7. jamka – lambda marker. Na obrázku (2.-5. jamka) můžeme vidět fragmenty cfDNA dlouhé cca 180 bp vznikající apoptózou jak u zdravých dárců, tak u pacientů. Fragmenty dlouhé cca 320-480 bp, což jsou „násobky 180 bp oligomerů“, jsou pro apoptózu také typické. Genomická DNA (6. jamka) obsahuje větší fragmenty, které prochází gelem hůře, proto se zachytily na jeho začátku.

Tab. 8: Pacienti s klesající hodnotou koncentrace (c) cfDNA.

Pohlaví	Ročník	Věk	Diagnóza	c cfDNA – 1. odběr [ng·ml ⁻¹]	c cfDNA – 2. odběr [ng·ml ⁻¹]	c cfDNA – 3. odběr [ng·ml ⁻¹]
Ž	1971	49	DLBCL	11 800	4 320	2 300
M	1986	34	DLBCL	4 040	922	312
Ž	1957	63	DLBCL	47 600	2 180	1 220
Ž	1984	36	HL	5 160	2 940	688
M	1989	31	HL	996	802	580
M	1993	27	HL	1 070	936	540

Tab. 9: Pacienti se stoupající hodnotou koncentrace cfDNA. U některých pacientů (-) 3. odběr nebyl dostupný.

Pohlaví	Ročník	Věk	Diagnóza	c cfDNA – 1. odběr [ng·ml ⁻¹]	c cfDNA – 2. odběr [ng·ml ⁻¹]	c cfDNA – 3. odběr [ng·ml ⁻¹]
Ž	1958	62	DLBCL	2 280	100 000	116 000
M	1955	65	DLBCL	2 320	1 270	110 000
M	1942	78	DLBCL	870	1 370	-
M	1938	82	HL	3 120	7 540	-
Ž	1976	44	HL	904	1 770	-
Ž	1977	43	HL	846	1 800	2 840

Tab. 10: Pacienti s konstantní hodnotou koncentrace cfDNA. U některých pacientů (-) 3. odběr nebyl dostupný.

Pohlaví	Ročník	Věk	Diagnóza	c cfDNA – 1. odběr [ng·ml ⁻¹]	c cfDNA – 2. odběr [ng·ml ⁻¹]	c cfDNA – 3. odběr [ng·ml ⁻¹]
Ž	1955	65	DLBCL	636	582	498
M	1962	58	DLBCL	1 720	2 000	-
Ž	1938	82	DLBCL	1 420	1 340	-
M	1978	42	HL	936	1 340	-
M	1976	44	HL	588	742	-
Ž	1998	22	HL	2 000	2 940	-

Tab. 11: Pacienti s nově diagnostikovaným lymfomem.

Pohlaví	Ročník	Věk	Diagnóza	c cfDNA [ng·ml ⁻¹]
Ž	1945	75	DLBCL	6 000
Ž	1940	80	DLBCL	61 000
Ž	1945	75	DLBCL	652
M	1944	76	DLBCL	1 320
Ž	1951	69	DLBCL	5 200
Ž	1954	66	DLBCL	962
Ž	1941	79	DLBCL	906
Ž	1975	45	DLBCL	6 800
M	1950	70	DLBCL	726
M	1943	77	DLBCL	888
M	1949	71	DLBCL	842
M	1941	79	DLBCL	1 520
Ž	1952	68	DLBCL	3 360
Ž	1943	77	DLBCL	1 520
Ž	1953	67	DLBCL	24 400
Ž	1937	83	DLBCL	460
M	1947	73	DLBCL	710
Ž	1952	68	DLBCL	6 120
M	1941	79	DLBCL	1 260
Ž	1949	71	DLBCL	3 080
Ž	1959	61	DLBCL	374
M	1948	72	DLBCL	1 380
M	1945	75	DLBCL	7 400
M	1950	70	DLBCL	5 740
M	1957	63	DLBCL	4 420
M	1943	77	DLBCL	3 800
M	1977	43	DLBCL	488
Ž	1954	66	HL	6 760
M	1952	68	HL	1 400
Ž	1986	34	HL	3 000
M	2002	18	HL	1 840
M	1994	26	HL	1 840
M	1966	54	HL	450
Ž	1974	46	HL	294
M	1984	36	HL	1 920
Ž	1986	34	HL	1 164
M	1994	26	HL	802

Tab. 12: Pacienti s regresí/remisí lymfomu.

Pohlaví	Ročník	Věk	Diagnóza	c cfDNA [ng·ml ⁻¹]
Ž	1950	70	DLBCL	1 210
Ž	1947	73	DLBCL	1 790
Ž	1957	63	DLBCL	570
Ž	1951	69	DLBCL	1 120
M	1938	82	DLBCL	660
Ž	1945	75	DLBCL	1 060
M	1950	70	DLBCL	946
M	1974	46	DLBCL	650
Ž	1958	62	DLBCL	756
Ž	1956	64	DLBCL	552
M	1973	47	HL	932
Ž	1980	40	HL	606
Ž	1961	59	HL	1 390

Tab. 13: Pacienti s progresí lymfomu/relapsem onemocnění.

Pohlaví	Ročník	Věk	Diagnóza	c cfDNA [ng·ml ⁻¹]
M	1931	89	DLBCL	7 900
M	1963	57	DLBCL	3 260
Ž	1942	78	DLBCL	31 200
Ž	1953	67	DLBCL	24 200
Ž	1943	77	DLBCL	2 300
M	1948	72	DLBCL	8 160
Ž	1945	75	DLBCL	2 280
M	1949	71	HL	2 900

Tab. 14: Kontrola – zdraví dárči.

Číslo	c cfDNA [ng·ml ⁻¹]	Číslo	c cfDNA [ng·ml ⁻¹]
1	374	11	878
2	730	12	1 100
3	530	13	760
4	406	14	468
5	684	15	626
6	416	16	438
7	676	17	652
8	514	18	390
9	504	19	396
10	1 050	20	948

5.2. Statistické zpracování výsledků

Průměrný věk celého souboru 76 pacientů byl 61 let, přičemž nejmladší byl pacient ve věku 18 let, nejstaršímu bylo 89 let. Průměrný věk pacientů s diagnózou DLBCL byl 69 let, což je věk vyšší než u pacientů s HL, jimž bylo průměrně 43 let.

Pacienti, u nichž byla naměřena klesající hodnota cfDNA (Tab. 8), vykazovali PET negativní remisi/kompletní remisi lymfomu díky úspěšné terapii, kdy lymfom dobře reagoval na léčbu. Průměrná koncentrace cfDNA 1. odběru (v době diagnózy) byla $11\,778\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, 2. odběru v průběhu léčby $2\,017\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 3. odběru po ukončení terapie $940\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Pacienti se stoupající či kolísavou hodnotou cfDNA (Tab. 9) v závislosti na vývoji choroby měli komplikovaný průběh onemocnění, kdy lymfomy špatně reagovaly na léčbu a došlo k progresi onemocnění. U některých pacientů došlo k relapsu onemocnění, což korelovalo s vyšší hodnotou koncentrace cfDNA. Průměrná koncentrace cfDNA při 1. odběru byla $1\,723\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, při 2. odběru $18\,958\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a při 3. odběru $76\,280\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. V některých případech brzy poté došlo k úmrtí pacienta.

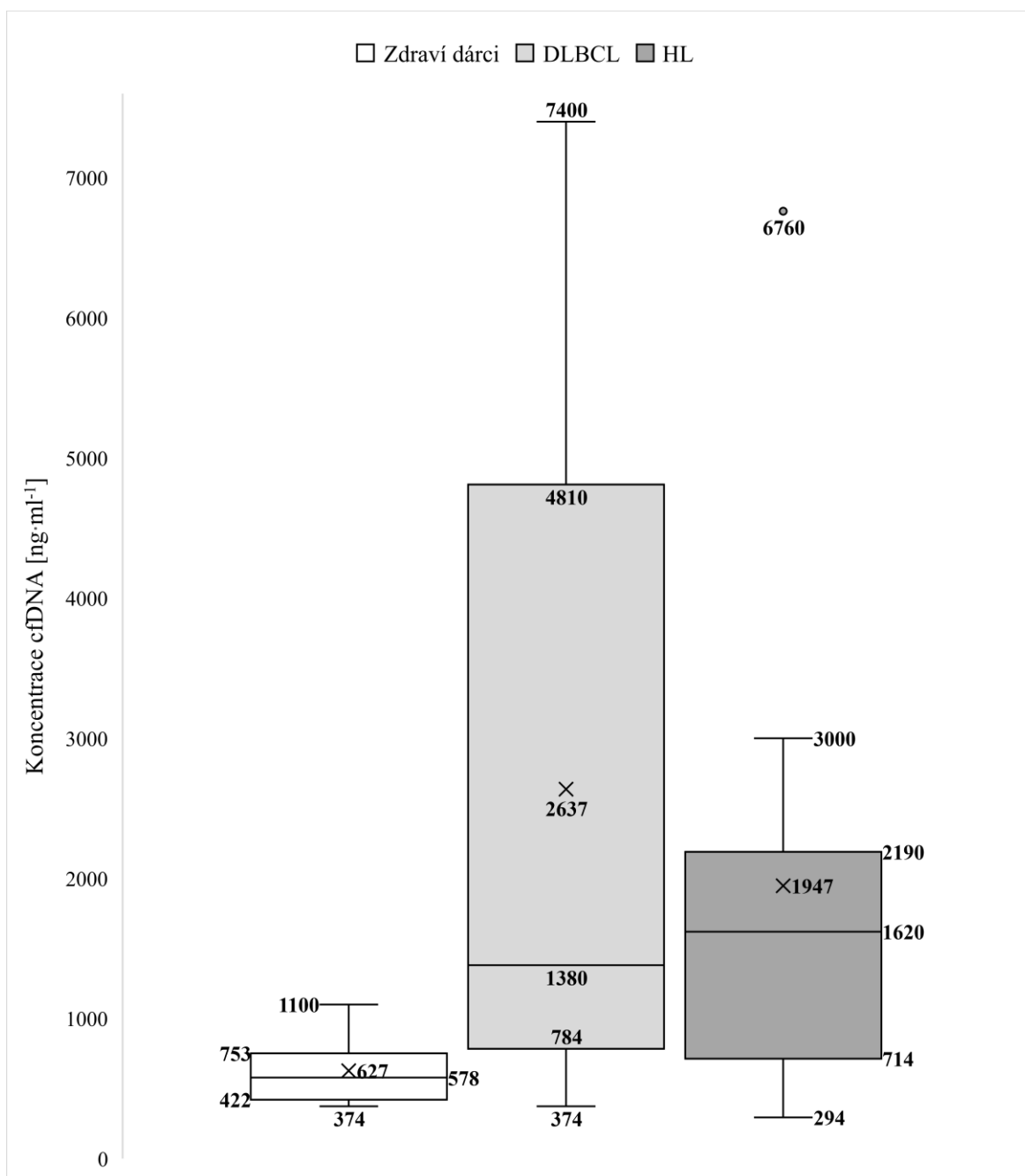
Pacienty s konstantní hodnotou cfDNA (Tab. 10) tvořila různorodá skupina, kde převažovali klinicky stabilizovaní pacienti. Průměrná koncentrace cfDNA při 1. odběru byla $1\,217\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a při 2. odběru $1\,491\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

U nově diagnostikovaných pacientů (Tab. 11) byla průměrná koncentrace cfDNA $4\,616\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, u těch s regresí onemocnění (Tab. 12) $942\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u pacientů s progresí choroby (Tab. 13) $10\,275\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Zdraví dárce (Tab. 14), kteří sloužili jako kontrola, měli průměrnou koncentraci cfDNA $627\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

5.2.1. Boxplot

Pro porovnání mezi hladinami koncentrací pacientů a zdravých dárců (Obr. 5) byla použita data koncentrací cfDNA 20 zdravých dárců (Tab. 14), 25 pacientů s nově diagnostikovaným DLBCL (Tab. 11) a 10 pacientů s nově diagnostikovaným HL (Tab. 11). Dvě příliš odlehlé hodnoty pacientů s DLBCL, kteří měli velmi vysokou koncentraci cfDNA 61 000 ng·ml⁻¹ a 24 400 ng·ml⁻¹, do tohoto grafu pro jeho lepší přehlednost dat nebyly zahrnuty.



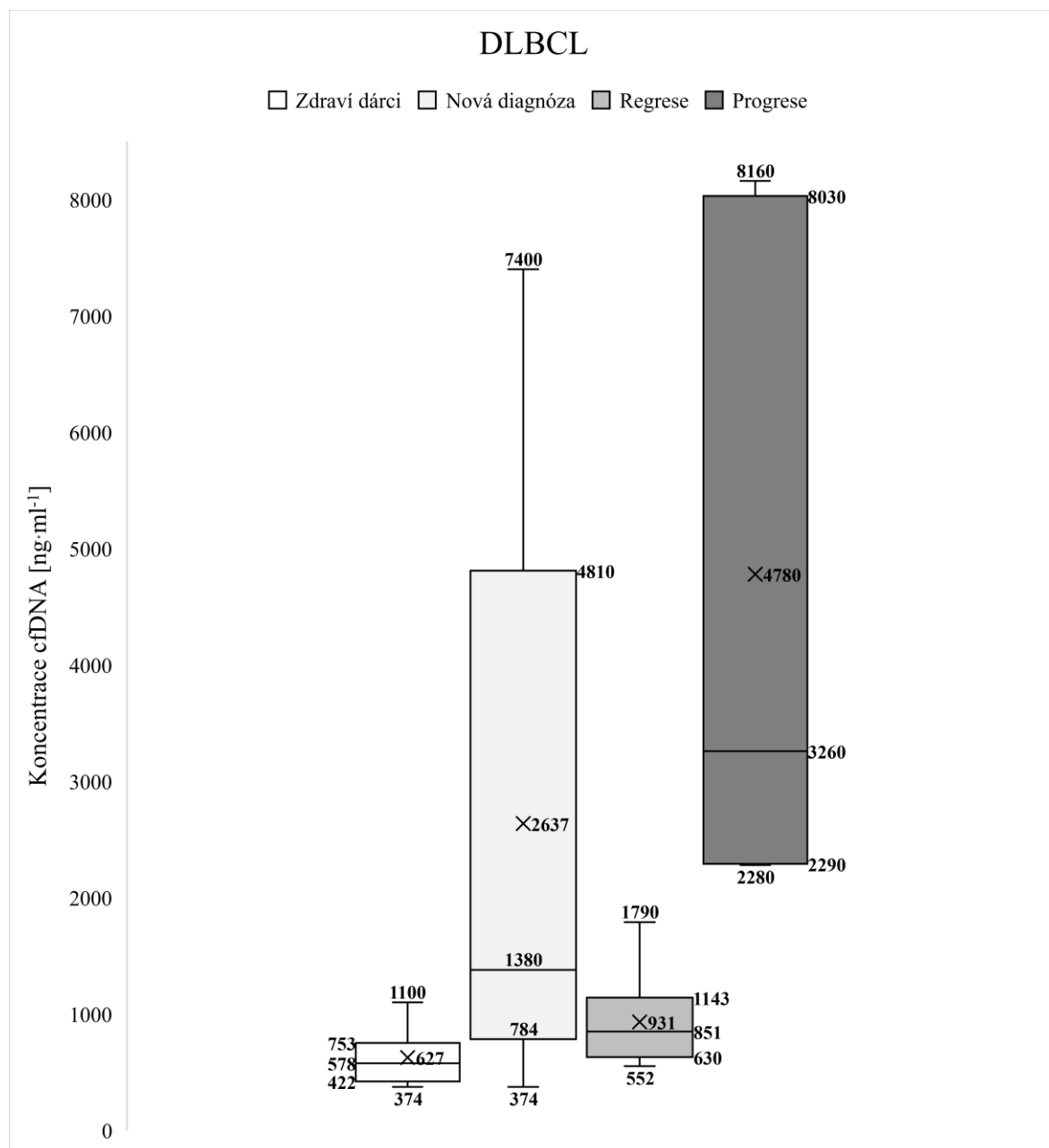
Obr. 5: Boxplot znázorňující hladiny koncentrace cfDNA zdravých dárců, pacientů s nově diagnostikovaným DLBCL a pacientů s nově diagnostikovaným HL. „Vousy“ reprezentují minimální a maximální hodnotu souboru, „x“ průměrnou hodnotu. Jednotlivé obdélníky reprezentují 1. a 3. kvartil, vymežující hodnota mezi nimi je medián souboru.

Ze zhotoveného krabicového grafu můžeme vyčíst, že u zdravých dárců (kontrola) medián činil $578 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (dolní kvartil $422 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, horní kvartil $753 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). Průměrná koncentrace cfDNA byla z daného souboru dat nejnižší, činila $627 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (rozmezí $374\text{-}1\,100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Pacienti s nově diagnostikovaným DLBCL měli medián vyšší než zdraví dárce, jeho hodnota činila $1\,380 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (dolní kvartil $784 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, horní kvartil $4\,810 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). Průměrná koncentrace cfDNA byla z daného souboru nejvyšší, činila $2\,637 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ s velkou variabilitou mezi pacienty (rozmezí $374\text{-}7\,400 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Medián koncentrací cfDNA pacientů s nově diagnostikovaným HL byl $1\,620 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (dolní kvartil $714 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, horní $2\,190 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), průměrná koncentrace byla $1\,947 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, (rozmezí $294\text{-}3\,000 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), odlehlá hodnota činila $6\,760 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Pro porovnání mezi hladinami koncentrací pacientů s DLBCL a zdravých dárců (Obr. 6) byla použita data koncentrací cfDNA 20 zdravých dárců (Tab. 14), 25 pacientů s nově diagnostikovaným DLBCL (Tab. 11), 10 pacientů s regresí DLBCL (Tab. 12) a 5 pacientů s progresí DLBCL (Tab. 13), přičemž dvě příliš vysoké hodnoty pacientů s progresí onemocnění ($31\,200\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $24\,200\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) nebyly do grafu zahrnuty.



Obr. 6: Boxplot znázorňující hladiny koncentrace cfDNA u pacientů s nově diagnostikovaným DLBCL, regresí DLBCL a progresí DLBCL v porovnání se zdravými dárci. „Vousy“ reprezentují minimální a maximální hodnotu souboru, „x“ průměrnou hodnotu. Jednotlivé obdélníky reprezentují 1. a 3. kvartil, vymežující hodnota mezi nimi je medián souboru.

Medián koncentrací cfDNA zdravých dárců měl hodnotu 578 ng.ml⁻¹ (dolní kvartil 422 ng.ml⁻¹, horní kvartil 753 ng.ml⁻¹). Průměrná koncentrace cfDNA činila 627 ng.ml⁻¹ (rozmezí 374-1 100 ng.ml⁻¹).

Pacienti s nově diagnostikovaným DLBCL měli vyšší medián než zdraví dárči v hodnotě 1 380 ng.ml⁻¹ (dolní kvartil 784 ng.ml⁻¹, horní kvartil 4 810 ng.ml⁻¹). Průměrná koncentrace činila 2 637 ng.ml⁻¹ s velkou variabilitou mezi pacienty (rozmezí 374-7 400 ng.ml⁻¹).

Pacienti s regresí DLBCL měli, oproti kontrole, medián vyšší, jeho hodnota činila 851 ng.ml⁻¹ (horní kvartil 1 143 ng.ml⁻¹, dolní kvartil 630 ng.ml⁻¹), avšak oproti nově diagnostikovaným nižší. Průměrná koncentrace 931 ng.ml⁻¹ se blížila zdravým dárcům, rozmezí bylo však variabilnější (552-1790 ng.ml⁻¹).

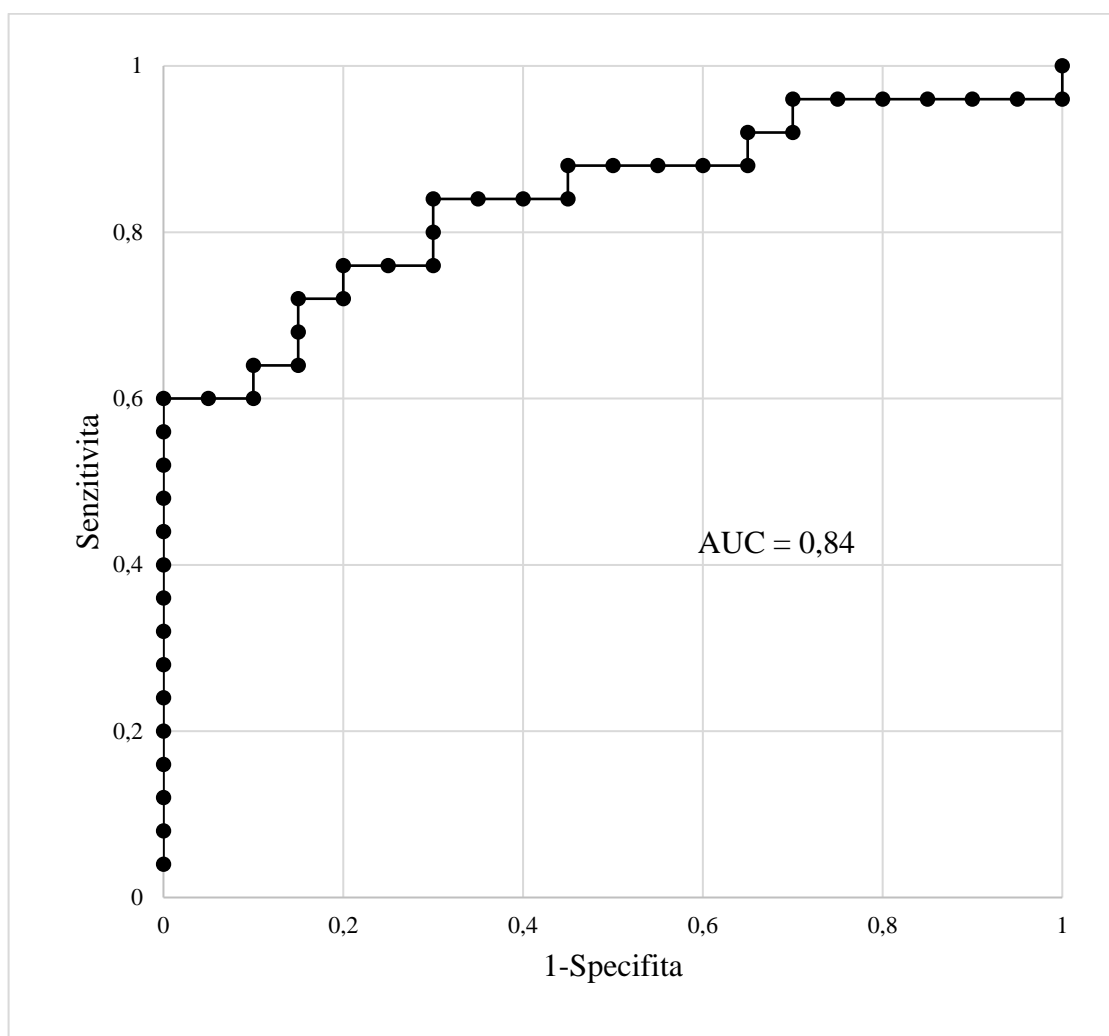
Pacienti s progresí choroby měli medián výrazně vyšší než kontrola, činil 3 260 ng.ml⁻¹ (dolní kvartil 2 290 ng.ml⁻¹, horní 8 030 ng.ml⁻¹). Průměrná koncentrace byla také velmi vysoká, činila 4 780 ng.ml⁻¹ (rozmezí 2 280-8 160 ng.ml⁻¹).

5.2.2. Stanovení ROC křivky pro diagnostické účely

ROC křivky jsou nástrojem pro grafické znázornění souvislosti mezi klinickou senzitivitou a specifitou diagnostického testu. Oblast pod ROC křivkou (area under the ROC curve, AUC) poskytuje představu o užitečnosti daného testu, kdy větší plocha pod křivkou znamená užitečnější test. Tyto křivky se používají pro výběr nejvhodnější cut-off hodnoty, která má nejvyšší skutečnou pozitivní míru zároveň s nejnižší falešně pozitivní mírou. Cut-off hodnota slouží k rozdělení spojité škály dat na jednotlivé kategorie (Ekelund, 2011).

Ke zhotovení ROC křivky (Obr. 7) byla použita data hladin koncentrace cfDNA 20 zdravých dárců (Tab. 14) a 25 pacientů s nově diagnostikovaným DLBLC (Tab. 11). Odlehlé hodnoty 2 pacientů ($61\,000\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, $24\,400\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) do této analýzy nebyly zahrnuty.

AUC zhotovené ROC křivky je 84 %, spadá tedy do kategorie dobrých testů potenciálně vhodných pro diagnostické účely.

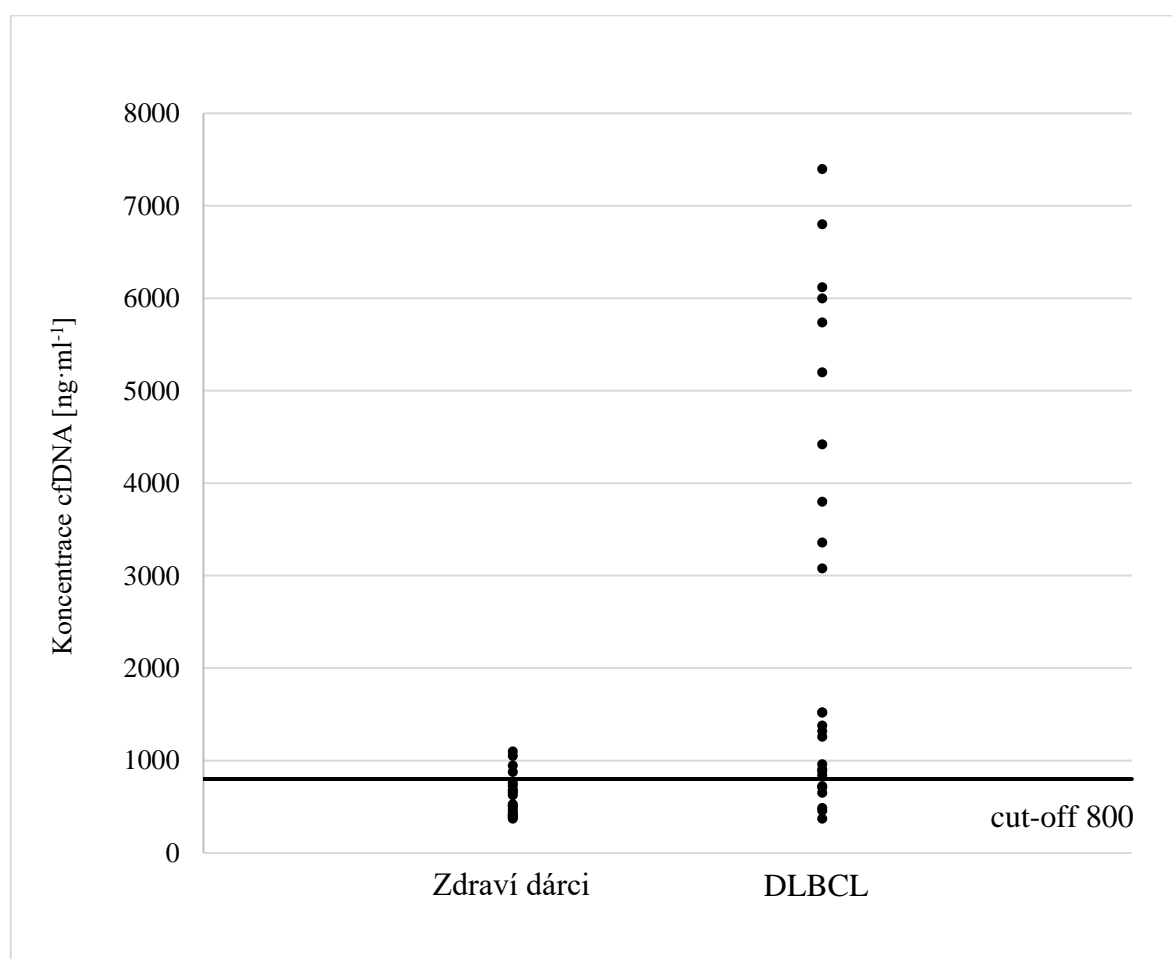


Obr. 7: ROC křivka (zhotoveno dle Ekelund, 2011).

Z vypočtených hodnot (Tab. 15) vyplývá, že nejvhodnější cut-off hodnota je 800 ng·ml⁻¹ (Obr. 8), jelikož má relativně vysokou specifitu (80 %) i senzitivitu (76 %). Cut-off hodnota 600 ng·ml⁻¹ má sice vysokou senzitivitu (88 %), ale pouze 50 % specifitu. Naopak vysokou specifitu (90 %) má cut-off 1 000 ng·ml⁻¹, senzitivita je ovšem nízká (60 %).

Tab. 15: Specifita, senzitivita, PPV (pozitivní prognostická hodnota) a NPV (negativní prognostická hodnota) jednotlivých cut-off hodnot.

Cut-off [ng·ml ⁻¹]	Specifita	Senzitivita	PPV	NPV
600	0,50	0,88	0,69	0,77
700	0,70	0,84	0,78	0,78
800	0,80	0,76	0,83	0,73
900	0,85	0,68	0,85	0,68
1 000	0,90	0,60	0,88	0,64

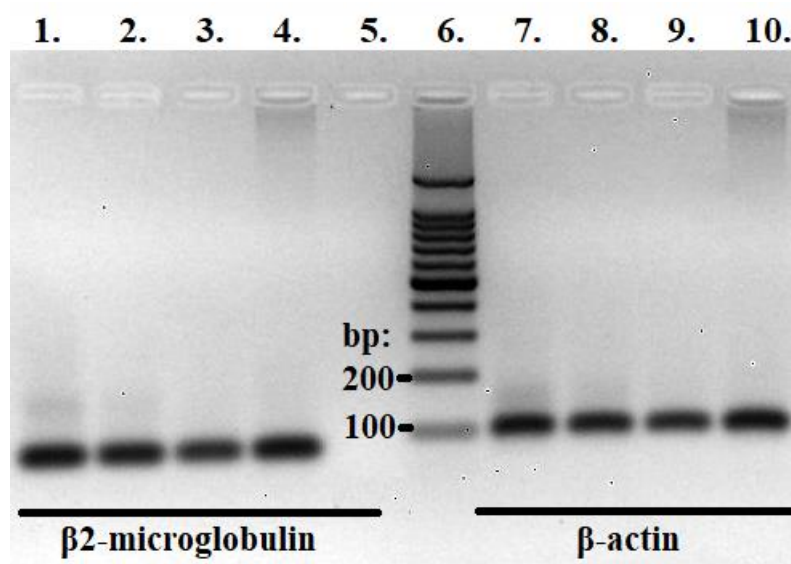


Obr. 8: Cut-off 800 ng·ml⁻¹.

5.3. Kvantitativní stanovení koncentrace cfDNA pomocí technologie Sybrgreen koncentrační křivkou housekeeping genů

5.3.1. Zkouška primerů pro qPCR

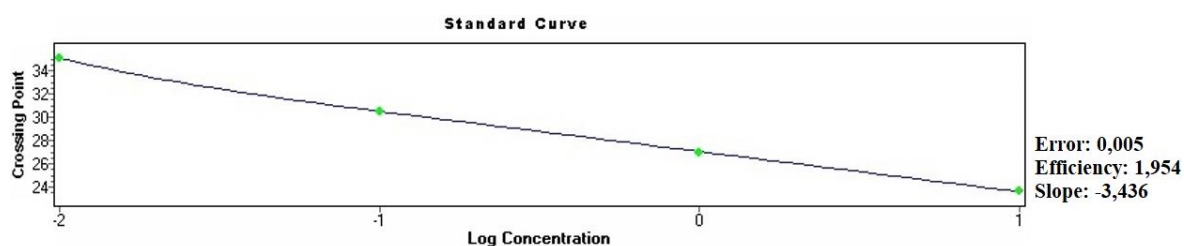
Zkouška primerů (Obr. 9) byla provedena z důvodu, aby bylo zjištěno, zda primery skutečně fungují, a také kvůli kontrole, zda vytvářejí specifické produkty reakce. Byly pozorovány specifické amplikony o délce 77 bp (β 2-microglobulin) a 101 bp (β -actin).



Obr. 9: Agarozová elektroforéza, 2% gel. 1. jamka – pacient, naneseno 95,8 ng cfDNA; 2. jamka – pacient, naneseno 90 ng cfDNA; 3. jamka – zdravý dárce, naneseno 60 ng cfDNA; 4. jamka – genomická DNA, naneseno 100 ng gDNA; 5. jamka – kontrolní MIX; 6. jamka – marker 100 bp promega; 7. jamka – pacient, naneseno 95,8 ng cfDNA; 8. jamka – pacient, naneseno 90 ng cfDNA; 9. jamka – zdravý dárce, naneseno 60 ng cfDNA; 10. jamka – genomická DNA, naneseno 100 ng gDNA. „Smear“ v jamkách není způsoben amplifikací, ale vysokou koncentrací cfDNA v jamce. Genomická DNA obsahuje i větší fragmenty, které se zachytily na začátku gelu. Primery pro β 2-microglobulin – velikost amplikonů: 77 bp, β -actin – velikost amplikonů: 101 bp.

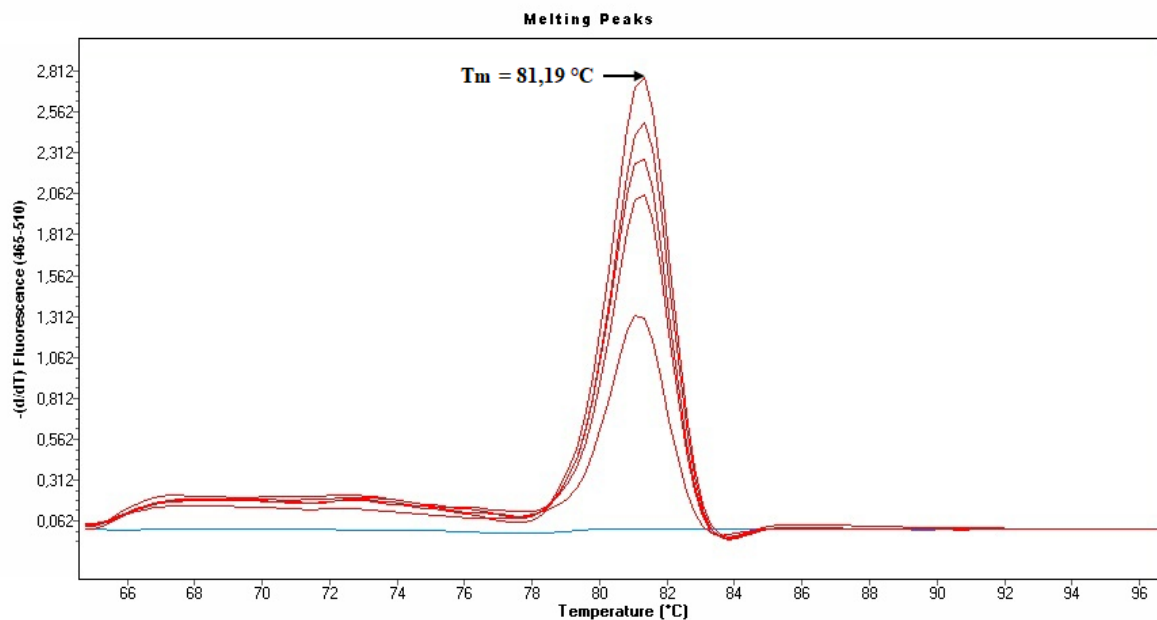
5.3.2. Kvantitativní stanovení koncentrace cfDNA pomocí technologie Sybrgreen koncentrační křivkou housekeeping genů

Po ověření primerů jednokolovou PCR reakcí byla vytvořena kalibrační řada, která byla připravena desítkovým ředěním ze vstupní koncentrace $100 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ izolované gDNA zdravého dárce a měla koncentraci $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $0,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $0,01 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a $0,001 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Koncentrace $0,001 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ byla kvůli nestabilitě produktů vyřazena. Výsledná kalibrační řada (Obr. 10) měla následující parametry: chyba (error): 0,005, efektivita reakce k danému genu (efficiency): 1,954, sklon (slope): -3,436.

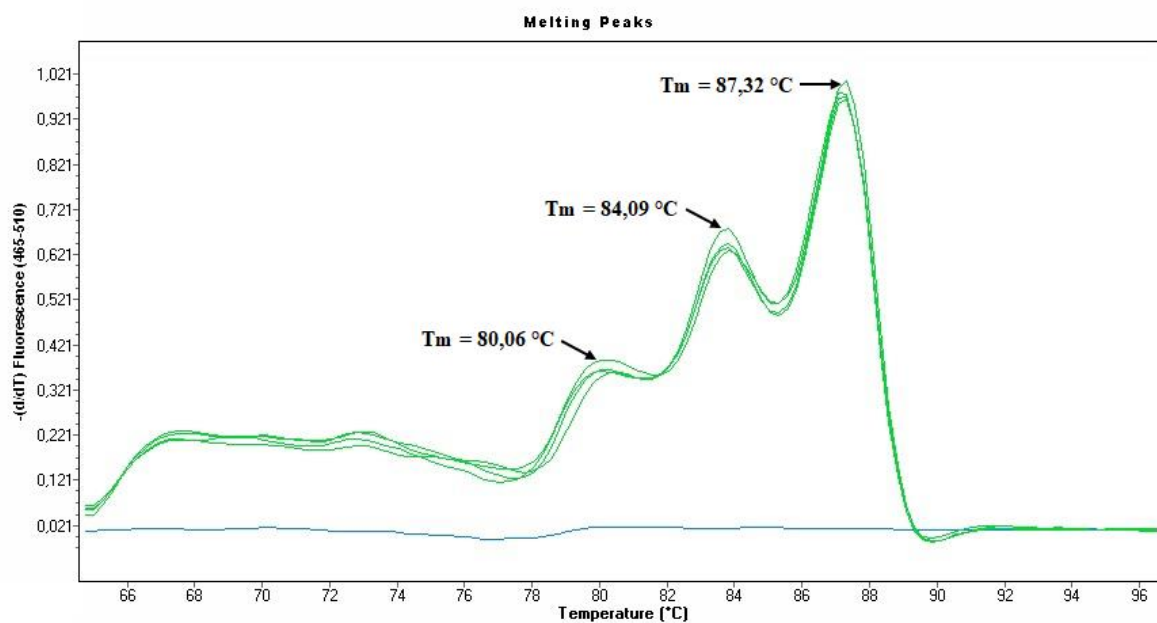


Obr. 10: Standardní křivka – β 2-microglobulin. Výsledná kalibrační řada o koncentraci: $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $1 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, $0,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $0,01 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Chyba (error): 0,005, efektivita reakce k danému genu (efficiency): 1,954, sklon (slope): -3,436.

Dále byla analyzována křivka tání produktů jednotlivých primerů pro β 2-microglobulin (Obr. 11) a β -actin (Obr. 12). Při teplotě tání (T_m) dochází k rozpadu dsDNA a tím k uvolnění Sybregreenu.

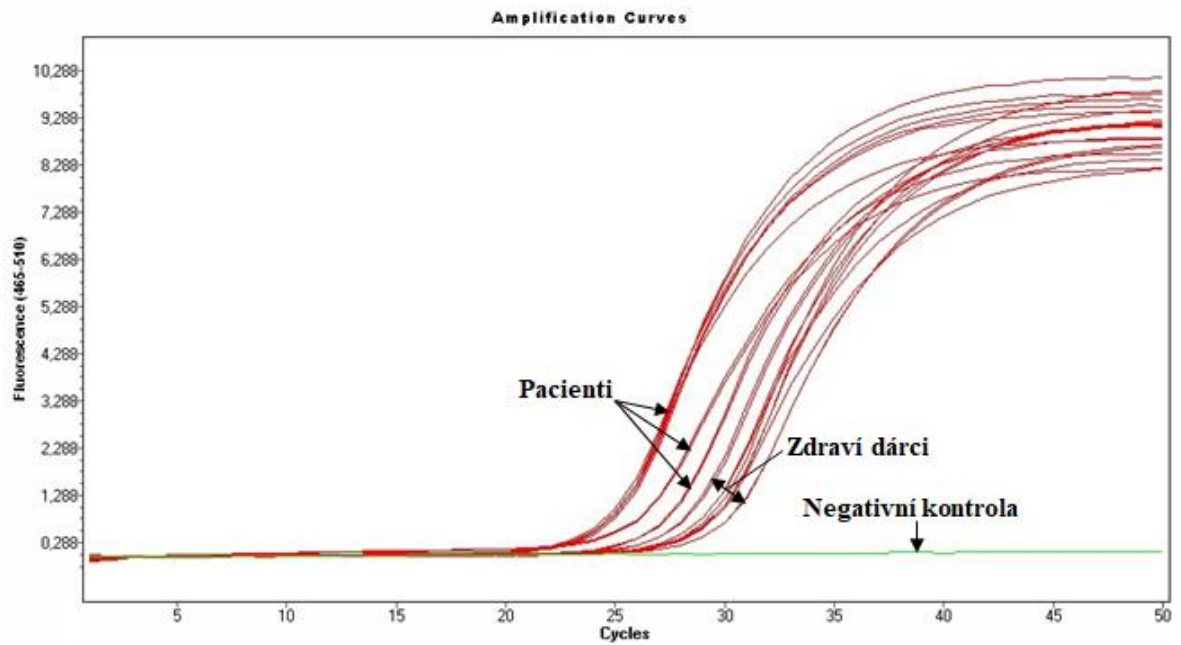


Obr. 11: Křivka tání – β 2-microglobulin. T_m produktu je 81,19 °C.



Obr. 12: Křivka tání – β -actin. T_m produktu je 87,32 °C. První 2 peaky ($T_m = 80,06$ °C, $T_m = 84,09$ °C) značí nespecifické PCR produkty či polymorfismy způsobené změnou sekvence DNA.

Výsledné amplifikační křivky (Obr. 13) pacientů a zdravých dárců zhotovené pomocí primerů pro β 2-microglobulin. Pacienti mají Ct (cycle of treshold, cyklus prahu) znatelně nižší než zdraví dárči.



Obr. 13: Amplifikační křivky – β 2-microglobulin. Pacienti – Ct nižší, zdraví dárči – Ct vyšší.

Touto metodou kvantitativního stanovení koncentrace cfDNA bylo změřeno celkem 8 vzorků vybraných zdravých dárců (Tab. 14) a 10 vzorků vybraných nově diagnostikovaných pacientů s DLBCL (Tab. 11). Byly použity pouze primery pro β 2-microglobulin, jelikož primery pro β -actin nefungovaly jednoznačně specificky. Finální koncentrace cfDNA byla získána přepočtením z kalibrační křivky. Naměřené koncentrace replikátů byly nejprve převedeny z jednotek $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ na $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, poté byla stanovena finální koncentrace vzorku a vypočten variační koeficient (Tab. 16), jenž měl průměrnou hodnotu 0,91 % (rozmezí 0-3,33 %). Pro porovnání hodnot koncentrace cfDNA naměřených pomocí přístroje Qubit fluorometru a kvantitativním stanovením pomocí technologie Sybrgreen koncentrační křivkou housekeeping genů u zmíněných vybraných osob byl vypočten medián rozdílů hodnot koncentrací cfDNA, který činil $240\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (průměr $516\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, rozmezí $5\text{-}2\ 160\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Tab. 17) a zhotoven krabicový graf (Obr. 14).

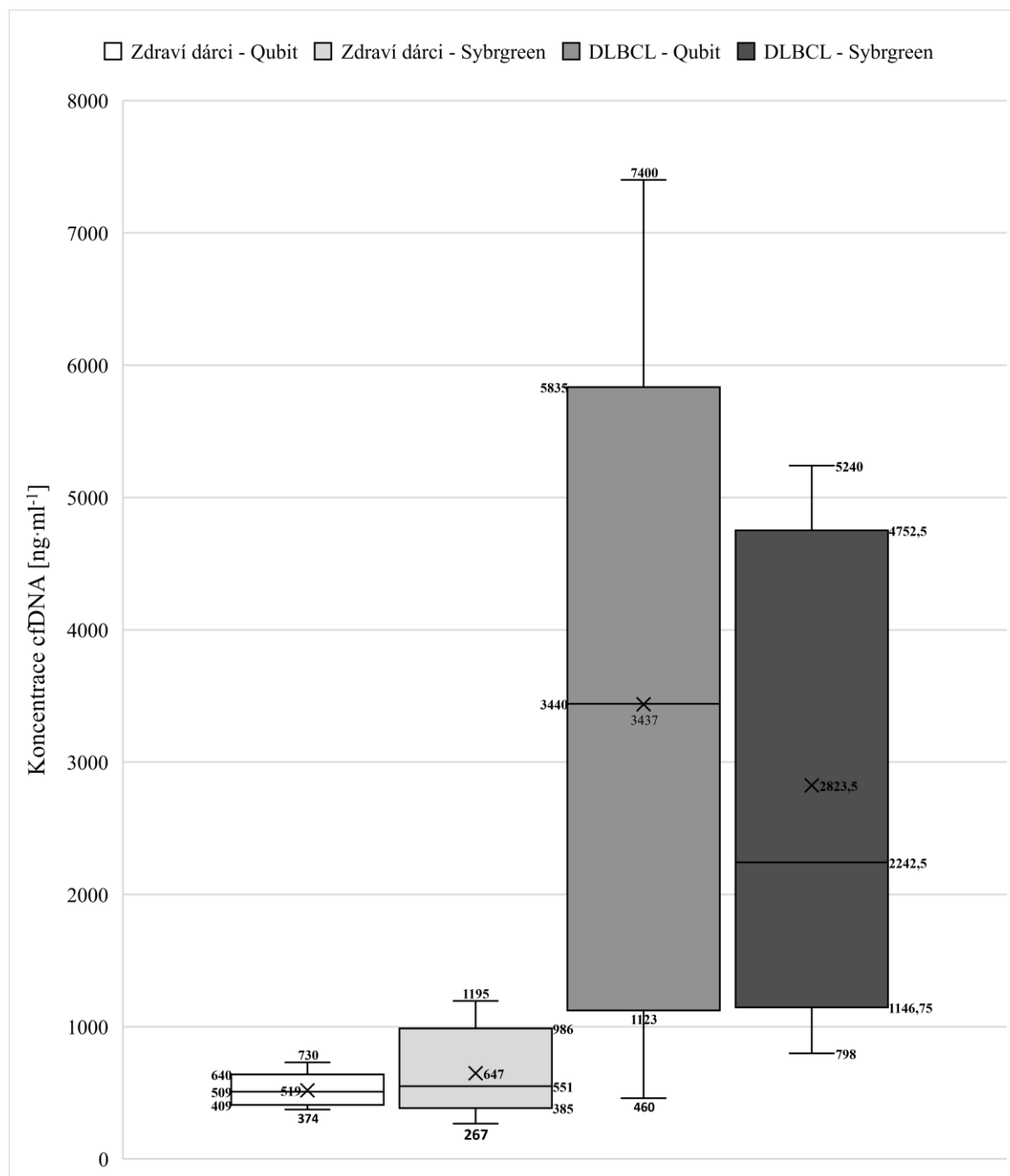
Tab. 16.: Hodnoty koncentrace cfDNA získané kvantitativním stanovením pomocí technologie Sybrgreen koncentrační křivkou housekeeping genů, β 2-microglobulin.

Vzorek	Naměřená c [$\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Finální c [$\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Variační koeficient [%]	Vzorek	Naměřená c [$\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Finální c [$\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Variační koeficient [%]
Dárce	$\frac{1\ 190}{1\ 200}$	1 195	0.30	DLBCL	$\frac{1\ 250}{1\ 260}$	1 255	0.28
Dárce	$\frac{1\ 030}{1\ 090}$	1 060	2.00	DLBCL	$\frac{5\ 240}{5\ 240}$	5 240	0.00
Dárce	$\frac{568}{596}$	582	1.70	DLBCL	$\frac{4\ 620}{4\ 730}$	4 675	0.83
Dárce	$\frac{381}{368}$	375	1.23	DLBCL	$\frac{4\ 420}{4\ 330}$	4 375	0.73
Dárce	$\frac{268}{266}$	267	0.26	DLBCL	$\frac{2\ 300}{2\ 350}$	2 325	0.76
Dárce	$\frac{801}{729}$	765	3.33	DLBCL	$\frac{821}{822}$	822	0.04
Dárce	$\frac{538}{499}$	519	2.66	DLBCL	$\frac{780}{816}$	798	1.59
Dárce	$\frac{419}{413}$	416	0.51	DLBCL	$\frac{4\ 990}{4\ 980}$	4 985	0.07
				DLBCL	$\frac{1\ 600}{1\ 600}$	1 600	0.00
				DLBCL	$\frac{2\ 160}{2\ 160}$	2 160	0.00

Tab. 17: Porovnání hodnot koncentrace cfDNA zdravých dárců a pacientů s nově diagnostikovaným DLBCL naměřených pomocí přístroje Qubit fluorometru a kvantitativním stanovením pomocí technologie Sybrgreen koncentrační křivkou housekeeping genů.

Zdraví dárci		DLBCL	
Koncentrace [ng·ml⁻¹]			
Qubit	Sybrgreen	Qubit	Sybrgreen
374	1 195	460	822
730	1 060	710	798
530	582	6 120	4 985
406	375	1 260	1 600
416	267	3 080	2 160
676	765	1 380	1 255
514	519	7 400	5 240
504	416	5 740	4 675
		4 420	4 375
		3 800	2 325

Pro porovnání metod stanovení koncentrace cfDNA pomocí přístroje Qubit fluorometru a kvantitativního stanovení pomocí technologie Sybrgreen koncentrační křivkou housekeeping genů (Obr. 14) byly použity vzorky vybraných zdravých dárců (Tab. 14) a pacientů s nově diagnostikovaným DLBCL (Tab. 11) – viz. Tab. 17.



Obr. 14: Boxplot sloužící k porovnání metod stanovení koncentrace cfDNA. „Vousy“ reprezentují minimální a maximální hodnotu souboru, „x“ průměrnou hodnotu. Jednotlivé obdélníky reprezentují 1. a 3. kvartil, vymežující hodnota mezi nimi je medián souboru.

Medián koncentrací cfDNA zdravých dárců stanovený pomocí Qubit fluorometru byl $509 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (průměr $519 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, rozmezí $374\text{-}730 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), pomocí technologie Sybrgreen $551 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (průměr $647 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, rozmezí $267\text{-}1195 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). Rozmezí bylo větší u stanovení pomocí technologie Sybrgreen.

Naopak u pacientů s DLBCL byl medián při stanovení Qubit fluorometrem vyšší, činil $3\,440 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (průměr $3\,437 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, rozmezí $460\text{-}7\,400 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), při stanovení pomocí technologie Sybrgreen $2\,703 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (průměr $2\,950 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, rozmezí $798\text{-}5\,240 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

6 DISKUZE

Tato práce pojednává o cfDNA a jejím potenciálním využití při diagnostice a léčbě lymfoidních malignit. Byly do ní zahrnuty vzorky 20 zdravých dárců (kontrola) a 76 pacientů s lymfomy, z nichž bylo 53 s diagnózou DLBCL a 23 s HL. Průměrný věk celého souboru pacientů byl 61 let (rozmezí 18-89 let). Průměrný věk pacientů s HL (43 let) byl nižší než pacientů s DLBCL (69 let) – HL se nejčastěji vyskytuje u mladých dospělých osob (Bräuninger *et al.*, 2006). Vzorků pacientů s HL bylo výrazně méně než těch s DLBCL, čemuž je přizpůsobeno statistické zpracování výsledků, které je primárně zaměřeno na pacienty s DLBCL. Pro zjištění kvality vyzolované cfDNA byla provedena elektroforéza na 1,5% agarózovém gelu, na které byly pozorovány fragmenty DNA příslušné délky 180-200 bp vznikající při apoptóze (Ivanov *et al.*, 2015). Byly zachyceny i delší fragmenty o délce cca 320-480 bp, což jsou „násobky 180 bp oligomerů“.

Při sledování dynamiky cfDNA pacientů s DLBCL a HL její množství korelovalo s aktuálním stavem pacienta. Kvantifikací cfDNA u pacientů s lymfomy se zabýval ve své studii již zmíněný Hohaus *et al.* (2009), jehož výsledky ukázaly, že průměrné hladiny cfDNA u pacientů s HL i DLBCL byly výrazně vyšší než hladiny kontrol. Jeho studie také ukázala prognostický vliv cfDNA. Koncentraci cfDNA u DLBCL sledovali Eskandari *et al.* (2019), kteří poukázali na její význam v době diagnózy.

U osob s klesající koncentrací cfDNA (průměr 1. odběru 11 778 ng·ml⁻¹, 2. odběru 2 017 ng·ml⁻¹ a 3. odběru 940 ng·ml⁻¹) došlo dle PET/CT k regresi onemocnění – remisi či kompletní remisi lymfomu, kdy se hodnoty koncentrace cfDNA po terapii přiblížily hodnotám zdravých dárců (průměr 627 ng·ml⁻¹, rozmezí 374-1 100 ng·ml⁻¹). Naopak u pacientů se stoupající či kolísavou koncentrací cfDNA (průměr 1. odběru 1 723 ng·ml⁻¹, 2. odběru 18 958 ng·ml⁻¹ a 3. odběru 76 280 ng·ml⁻¹) došlo k progresi onemocnění způsobenou perzistencí onemocnění, kdy lymfom nereagoval na léčbu, či relapsem onemocnění. U některých osob brzy poté došlo k úmrtí. Pacienty s konstantní hladinou cfDNA (průměr 1. odběru 1 217 ng·ml⁻¹, 2. odběru 1 491 ng·ml⁻¹) tvořila různorodá skupina s převahou klinicky stabilizovaných pacientů. V některých případech nebyl k dispozici poslední odběr vzorku, což mohlo způsobit zkreslení výsledků.

Ze zhotoveného boxplotu porovnávajícím koncentrace cfDNA zdravých dárců a pacientů s lymfomy (DLBCL, HL) je patrné, že medián hodnot koncentrací cfDNA zdravých dárců (medián 578 ng·ml⁻¹, průměr 627 ng·ml⁻¹, rozmezí 374-1 100 ng·ml⁻¹) je nižší než u pacientů s nově diagnostikovaným DLBCL (medián 1 380 ng·ml⁻¹, průměr 2 637 ng·ml⁻¹, variabilní rozmezí 374-7 400 ng·ml⁻¹) i nově diagnostikovaným HL (medián 1 620 ng·ml⁻¹, průměr 1 947 ng·ml⁻¹, rozmezí 294-3 000 ng·ml⁻¹). Příliš odlehlé, velmi

vysoké hodnoty koncentrace cfDNA 2 pacientů, které do srovnání nebyly zahrnuty, mohly být způsobeny velkou nádorovou masou. Tyto výsledky jsou v souladu se staršími studii, např. studií z roku 2009, kterou provedl Hohaus *et al.*, která ovšem byla provedena jinou metodou kvantifikace pomocí qPCR.

Z provedeného porovnání koncentrace cfDNA pacientů s DLBCL oproti zdravým dárčům pomocí boxplotu je zřejmá korelace jejího množství v krvi s aktuálním zdravotním stavem pacienta. Nově diagnostikovaní pacienti (medián 1 380 ng·ml⁻¹, průměr 2 637 ng·ml⁻¹, rozmezí 374-7 400 ng·ml⁻¹) měli hodnoty koncentrace variabilní, vyšší než zdraví dárči (medián 578 ng·ml⁻¹, průměr 627 ng·ml⁻¹, rozmezí 374-1 100 ng·ml⁻¹). Pacienti, u kterých došlo k regresi onemocnění (medián 851 ng·ml⁻¹, průměr 931 ng·ml⁻¹, rozmezí 552-1790 ng·ml⁻¹), měly hodnoty koncentrace cfDNA blíží se zdravým osobám. Osoby s progresí choroby (medián 3 260 ng·ml⁻¹, průměr 4 780 ng·ml⁻¹, rozmezí 2 280-8 160 ng·ml⁻¹) měly znatelně vyšší hladiny koncentrace cfDNA než zdraví dárči i nově diagnostikovaní pacienti. Příliš odlehlé hodnoty 2 pacientů s progresí onemocnění do srovnání nebyly zahrnuty. Jelikož vzorků pacientů s HL bylo výrazně méně, nebylo pro ně možné provést odpovídající srovnání. Sledováním koncentrace cfDNA u DLBCL se ve své studii publikované roku 2019 zabývali Eskandari *et al.* – dle jejich výsledků může kvantifikace cfDNA v době diagnózy umožnit identifikaci pacientů s vysokou hladinou cfDNA, u nichž je předpokládán agresivní průběh onemocnění a nepříznivá prognóza.

ROC křivka zhotovená ze souboru dat koncentrací cfDNA zdravých dárčů a pacientů s nově diagnostikovaným DLBCL, sloužící k poskytnutí představy o užitečnosti daného diagnostického testu, měla hodnotu AUC 84 %, což je poměrně vysoká hodnota značící možné diagnostické využití testu. Při stanovení nejvhodnější cut-off hodnoty se jako nejlepší ukázala cut-off hodnota 800 ng·ml⁻¹, jelikož měla relativně vysokou specifitu i senzitivitu. Byli ovšem pozorováni jak falešně negativní, tak falešně pozitivní pacienti. Tato cut-off hodnota by mohla sloužit jako doplňkový diagnostický parametr k zhodnocení celkového stavu pacienta, kdy by hodnoty nižší než cut-off mohly značit remisi lymfomu.

Pro srovnání metody stanovení koncentrace cfDNA pomocí přístroje Qubit fluorometru s jinou kvantitativní metodou byla provedena kvantifikace pomocí technologie Sybrgreen koncentrační křivkou housekeeping genů, při které byly použity primery pro β -actin a β 2-microglobulin. Díky jednokolové PCR reakci a křivce tání bylo zjištěno, že primery pro β 2-microglobulin jsou vhodné pro naši kvantitativní analýzu, naopak primery pro β -actin byly z důvodu tvorby nespecifit v PCR reakci zamítnuty – zlepšení nepřinesla ani změna teploty amplifikace na 62 °C. Na agarózovém gelu nebyly nukleotidové změny bází u primerů pro β -actin pozorovány – mohla by být provedena kontrola pomocí Sangerova

sekvenování, které zjišťuje pořadí nukleových bází v sekvencích DNA, to ale nebylo cílem této práce. U výsledku kvantifikace byl pozorován signifikantní rozdíl v hodnotách Ct pacientů a zdravých dárců, kdy u pacientů byly tyto hodnoty výrazně nižší. Vypočtené variační koeficienty replikátů hodnot cfDNA stanovených pomocí technologie Sybrgreen, vypovídající o relativním významu průměrné odchylky od průměru, měly průměrnou hodnotu 0,91 % (rozmezí 0-3,33 %), spolehlivost stanovení tedy byla poměrně vysoká. Další housekeeping geny využitelné pro stanovení koncentrace cfDNA jsou např. β -globin a glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH) (Aucamp *et al.*, 2016).

Při porovnání metod stanovení koncentrace cfDNA pomocí přístroje Qubit fluorometru a kvantitativního stanovení pomocí technologie Sybrgreen koncentrační křivkou housekeeping genů byl v některých případech poměrně značný rozdíl mezi koncentracemi cfDNA stanovenými těmito metodami (medián rozdílů hodnot koncentrací $240 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, průměr $516 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, rozmezí 5-2 160 $\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), což mohlo být zapříčiněno lidskou chybou. Hodnoty koncentrace cfDNA zdravých dárců stanovené Qubit fluorometrem (medián $509 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, průměr $519 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, rozmezí 374-730 $\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) měly užší rozmezí a nižší medián než hodnoty stanovené pomocí technologie Sybrgreen (medián $551 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, průměr $647 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, rozmezí 267-1195 $\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). Naopak u pacientů s DLBCL hodnoty naměřené Qubit fluorometrem (medián 3 440 $\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, průměr 3 437 $\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, rozmezí 460-7 400 $\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) měly variabilnější rozmezí a vyšší medián než hodnoty získané pomocí technologie Sybrgreen (medián 2 703 $\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, průměr 2 950 $\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, rozmezí 798-5 240 $\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$).

7 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na cfDNA a její využití při diagnostice a léčbě lymfoidních malignit.

V rámci teoretické části byla nejprve popsána historie jejího výzkumu, kdy se postupem času v kombinaci s dalšími markery nádorů krve ukázala jako potenciálně vhodný biomarker pro diagnostiku řady malignit. Dále zde byly představeny nejčastější lymfoidní malignity, kterými se v této práci zabýváme.

V praktické části byla nejprve provedena izolace cfDNA z plazmy pomocí kitu QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit a následně změřena její koncentrace pomocí přístroje Qubit fluorometru 2.0 a kitu Qubit dsDNA HS Assay. Poté byla pomocí elektroforézy ověřena kvalita vyizolované cfDNA. Po rozdělení pacientů do jednotlivých skupin (+ zdraví dárči) dle koncentrace cfDNA byl tento soubor dat statisticky zpracován – byl vypočten průměrný, minimální a maximální věk pacientů, průměrná koncentrace cfDNA, zhotoveny krabicové grafy pro demonstraci změn hladiny koncentrace cfDNA při regresi a progresi onemocnění a zhotovena ROC křivka, která sloužila pro zhodnocení užitečnosti daného diagnostického testu. Byla stanovena nejvhodnější cut-off hodnota potenciálně použitelná jako doplňkový faktor k zhodnocení celkového stavu pacienta. Poté byla cfDNA kvantifikována pomocí technologie Sybrgreen koncentrační křivkou housekeeping genů pro β 2-microglobulin a β -actin. Variační koeficient replikonů cfDNA byl poměrně nízký, spolehlivost stanovení tedy byla poměrně vysoká. Srovnání naměřených koncentrací cfDNA našich 2 použitých analytických metod ukázalo, že se v některých případech poměrně liší, což mohlo být způsobeno lidskou chybou. Jako vhodnější metoda stanovení koncentrace cfDNA se jeví stanovení pomocí přístroje Qubit fluorometru 2.0 a kitu Qubit dsDNA HS Assay, jelikož je to metoda rychlejší, spotřeba materiálu je menší a má také vyšší účinnost.

Soubor osob použitých v této práci je poměrně malý, nelze tedy uzavírat signifikantní závěry. Potenciál cfDNA však potvrzuje již několik studií. Může být alternativním zdrojem nádorové DNA pro identifikaci lymfomů a také možný marker pro sledování MRD, jejíž monitoring by výrazně zpřesnil hodnocení léčebné odpovědi pomocí PET/CT. Korelace dynamiky MRD a výsledku PET/CT výrazně omezí četnost falešně pozitivních výsledků PETu a umožní přesnější volbu léčby.

8 LITERATURA

Alizadeh A. A., Eisen M. B., Davis R. E., Ma C., Lossos I. S., Rosenwald A., Boldrick J. C., Sabet H., Tran T., Yu X., Powell J. I., Yang L., Marti G. E., Moore T., Hudson J. Jr., Lu L., Lewis D. B., Tibshirani R., Sherlock G., Chan W. C., Greiner T. C., Weisenburger D. D., Armitage J. O., Warnke R., Levy R., Wilson W., Grever M. R., Byrd J. C., Botstein D., Brown P. O., Staudt L. M. (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**(6769), 503-511.

Armand P., Oki Y., Neubergh D. S., Faham M., Cummings C., Klinger M., Weng L., Bhattar S., Lacasce A. S., Jacobsen E. D., Davids M. S., Jacobson C., Fisher D. C., Brown J. R., Fowler N. H., Alma Rodriguez M., Wallace M. J., Neelapu S. S., Rodig S., Younes A., Freedman A. S. (2013) Detection of circulating tumour DNA in patients with aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *British Journal of Haematology* **163**(1), 123-126.

Aucamp J., Bronkhorst A. J., Wentzel J. F., Pretorius P. J. (2016) A Quantitative Assessment of Cell-Free DNA Utilizing Several Housekeeping Genes: Measurements from Four Different Cell Lines. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **924**, 101-103.

Bargou R. C., Leng C., Krappmann D., Emmerich F., Mapara M. Y., Bommert K., Royer H. D., Scheidereit C., Dörken B. (1996) High-level nuclear NFkappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/ReedSternberg cells. *Blood* **87**(10), 4340-4347.

Bea S., Zettl A., Wright G., Salaverria I., Jehn P., Moreno V., Burek C., Ott G., Puig X., Yang L., Lopez-Guillermo A., Chan W. C., Greiner T. C., Weisenburger D. D., Armitage J. O., Gascoyne R. D., Connors J. M., Grogan T. M., Braziel R., Fisher R. I., Smeland E. B., Kvaloy S., Holte H., Delabie J., Simon R., Powell J., Wilson W. H., Jaffe E. S., Montserrat E., Muller-Hermelink H. K., Staudt L. M., Campo E., Rosenwald A. (2005) Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* **106**(9), 3183-3190.

Belada D., Trněný M., et al. (2018) *Diagnostické a léčebné postupy u nemocných s maligními lymfomy*. 10. (8. tištěné), doplněné a přepracované vydání. HK Credit, Praha. 266 stran.

Braüninger A., Schmitz R., Bechtel D., Renné C., Hansmann M. L., Küppers R. (2006) Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *International Journal of Cancer* **118**(8), 1853-1861.

Campbell L. J. (2005) Cytogenetics of lymphomas. *Pathology* **37**(6), 493-507.

Camus V., Jardin F., Tilly H. (2017) The value of liquid biopsy in diagnosis and monitoring of diffuse large b-cell lymphoma: recent developments and future potential. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **17**(6), 557-566.

Casulo C., Friedberg J. (2015) Treating Burkitt Lymphoma in Adults. *Current Hematologic Malignancy Reports* **10**(3), 266-271.

Catarino R., Ferreira M. M., Rodrigues H., Coelho A., Nogal A., Sousa A., Medeiros R. (2008) Quantification of Free Circulating Tumor DNA as a Diagnostic Marker for Breast Cancer. *DNA and Cell Biology* **27**(8), 415-421.

Ekelund (2011) ROC curves – what are they and how are they used? [online]. Dostupné z: <https://acutecaretesting.org/en/articles/roc-curves-what-are-they-and-how-are-they-used>

- Eskandari M., Manoochehrabadi S., Pashaiefar H., Zaimy M. A., Ahmadvand M. (2019) Clinical significance of cell-free DNA as a prognostic biomarker in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Research* **54**(2), 114-119.
- Frickhofen N., Müller E., Sandherr M., Binder T., Bangerter M., Wiest C., Enz M., Heimpel H. (1997) Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia. *Blood* **90**(12), 4953-4960.
- Gribben J. G., Letai A. G. (2010) Lymphoma genetics. In: *Molecular hematology* (D. Provan and J.G. Gribben eds.), Blackwell Publishing Ltd, New Jersey, USA, 117-126.
- Hohaus S., Giachelia M., Massini G., Mansueto G., Vannata B., Bozzoli V., Criscuolo M., D'Alò F., Martini M., Larocca L. M., Voso M. T., Leone G. (2009) Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Annals of Oncology* **20**(8), 1408-1413.
- Choi S. M., O'Malley D. P. (2018) Diagnostically relevant updates to the 2017 WHO classification of lymphoid neoplasms. *Annals of Diagnostic Pathology* **37**, 67-74.
- Ivanov M., Baranova A., Butler T., Spellman P., Mileyko V. (2015) Non-random fragmentation patterns in circulating cell-free DNA reflect epigenetic regulation. *BMC Genomics* **16**(S13).
- Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F. O., Hesch R. D., Knippers R. (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Research* **61**(4), 1659-1665.
- Kornacker M., Jox A., Vockerodt M., Tesch H., Bohlen H., Diehl V., Wolf J. (1999) Detection of a Hodgkin/Reed-Sternberg cell specific immunoglobulin gene rearrangement in the serum DNA of a patient with Hodgkin's disease. *Br J Haematol* **106**(2), 528-531.
- Kubaczková V., Vrábel D., Sedlaříková L., Bešše L., Ševčíková S. (2017) Cell-free DNA – Minimally invasive marker of hematological malignancies. *European Journal of Haematology* **99**(4), 291-299.
- Leon S. A., Shapiro B., Sklaroff D. M., Yaros M.J. (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Research* **37**(3), 646-650.
- Mandel P., Metais P. (1948) Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* **142**(3-4), 241-243.
- Mitra I., Nair N. K., Mishra P. K. (2012) Nucleic acids in circulation: Are they harmful to the host? *Journal of Biosciences* **37**(2), 301-312.
- Nakamura S., Ponzoni M. (2020) Marginal zone B-cell lymphoma: lessons from Western and Eastern diagnostic approaches. *Pathology* **52**(1), 15-29.
- Pileri S. A., Falini B. (2009) Mantle cell lymphoma. *Haematologica* **94**(11), 1488–1492.
- Proskuryakov S. Y., Konoplyannikov A. G., Gabai V. L. (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research* **283**(1), 1-16.
- Pytlík R., Berková A., Ptáčník V. (2013) Moderní diagnostika a léčba nehodgkinských lymfomů. *Interní Medicína* **15**(3-4): 105-109.

- Qiagen. (2019) QIAamp Circulating Nucleic Acid Handbook [online]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=0c4b31ab-f4fb-425f-99bf-10ab9538c061&lang=en>
- Reed J. C. (2000) Mechanisms of Apoptosis. *The American Journal of Pathology* **157**(5), 1415-1430.
- Rosenwald A., Wright G., Chan W. C., et al. (2002) The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine* **346**(25), 1937-1947.
- Rossi D., Diop F., Spaccarotella E., Monti S., Zanni M., Rasi S., Deambrogi C., Spina V., Bruscazzin A., Favini C., Serra R., Ramponi A., Boldorini R., Foà R., Gaidano G. (2017) Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood* **129**(14), 1947-1957.
- Saikumar P., Dong Z., Mikhailov V., Denton M., Weinberg J. M., Venkatachalam M. A. (1999) Apoptosis: Definition, mechanisms, and relevance to disease. *American Journal of Medicine* **107**(5), 489-506.
- Schraders M., Jong D., Kluin P., Groenen P., van Krieken H. (2005) Lack of Bcl-2 expression in follicular lymphoma may be caused by mutations in the BCL2 gene or by absence of the t(14;18) translocation. *Journal of Pathology* **205**(3), 329-335.
- Schwarzenbach H., Hoon D. S., Pantel K. (2011) Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer* **11**(6), 426-437.
- Spina V., Bruscazzin A., Cuccaro A., Martini M., Di Trani M., Forestieri G., Manzoni M., Condoluci A., Arribas A., Terzi-Di-Bergamo L., Locatelli S. L., Cupelli E., Ceriani L., Moccia A. A., 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 L. M., Gaidano G., Hohaus S., Carlo-Stella C., Rossi D. (2018) Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **131**(22), 2413-2425.
- Stroun M., Anker P., Maurice P., Layutey J., Lederrey C., Beljanski M. (1989). Neoplastic Characteristic of the DNA Found in the Plasma of Cancer Patients. *Oncology* **46**(5), 318-322.
- Stroun M., Lyautey J., Lederrey C., Olson-Sand A., Anker P. (2001) About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clinica Chimica Acta* **313**(1-2), 139-142.
- Suzuki N., Kamataki A., Yamaki J., Homma Y. (2008). Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clinica Chimica Acta* **387**(1-2), 55-58.
- Swerdlow S. H. Campo E., Harris N. L., Jaffe E. S., Pileri S. A., Stein H., Thiele J. (2017). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Revised 4th Edition. IARC, Lyon, 585 stran.
- Tan E. M., Schur P. H., Carr R. I., Kunkel H. G. (1966) Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Clinical Investigation* **45**(11), 1732-1740.
- Thermo Fisher Scientific. (2015) Qubit dsDNA HS Assay Kit – Life Technologies [online]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q32854#/Q32854>

- Thomas R. K., Re D., Wolf J., Diehl V. (2004) Part I: Hodgkin's lymphoma—molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *The Lancet Oncology* **5**(1), 11-18.
- Vasioukhin V., Anker P., Maurice P., Lyautey J., Lederrey C., Stroun M. (1994) Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *British Journal of Haematology* **86**(4), 774-779.
- Wang J., Chang S., Li G., Sun Y. (2017) Application of liquid biopsy in precision medicine: opportunities and challenges. *Frontiers of Medicine* **11**(4), 522-527.
- Wang B. G., Huang H., Chen Y., Bristow R. E., Kassaei K., Cheng Ch., Roden R., Sokoll L. J., Chan D. W., Shih I. (2003) Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Research* **63**(14), 3966-3968.
- Wohlschlaeger Ch., Lange K., Merz H., Feller A. C. (2003) Aberrant immunophenotypes of mantle cell lymphomas. *Leukemia & lymphoma* **44**(2), 269-273.
- Wong F. C. K., Sun K., Jiang P., Cheng Y. K. Y., Chan K. C. A., Leung T. Y., Chiu R. W., Lo Y. M. (2016) Cell-free DNA in maternal plasma and serum: A comparison of quantity, quality and tissue origin using genomic and epigenomic approaches. *Clinical Biochemistry* **49**(18), 1379-1386.
- Yoshida M., Ichikawa A., Miyoshi H., Kiyasu J., Kimura Y., Niino D., Ohshima K. (2015) Low incidence of MYC/BCL2 double-hit in Burkitt lymphoma. *Pathology International* **65**(9), 486-489.
- Zeerleder S. (2006) The struggle to detect circulating DNA. *Critical Care* **10**(3), 142.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ALL	akutní lymfoblastická leukemie
AML	akutní myeloidní leukemie
AUC	area under the ROC curve
bp	páry bází (base pair)
BCR	B-cell receptor
CD	cluster of differentiation (diferencianční skupina)
cHL	klasický Hodgkinův lymfom
CHOP	cyklofosamid-vinkristin-adriamycin-prednison
CT	výpočetní tomografie
Ct	cycle of treshold (cyklus prahu)
CTCs	circulating tumor cells
cfDNA	cell-free DNA (volná cirkulující DNA)
ctDNA	circulating tumor DNA
DLBCL	difúzní velkobuněčný B-lymfom
EBV	virus Epstein-Barrové
FDG	F-fluorodeoxyglukóza
FFTF	freedom from treatment failure (nepřítomnost selhání léčby)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FL	folikulární lymfom
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
gDNA	genomická DNA
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HL	Hodgkinův lymfom
Ig	imunoglobuliny
<i>IgH</i>	geny pro těžké řetězce imunoglobulinů
LDH	laktátdehydrogenasa
MALT	extranodální lymfom z buněk marginální zóny
MDS	myelodysplastický syndrom
MLBCL	mediastinální velkobuněčný B-lymfom
MRD	minimální reziduální choroba
MZBCL	lymfom marginální zóny B-buněk
NHL	nehodgkinské lymfomy
NMZL	nodální lymfom z B-buněk marginální zóny
NPV	negativní prognostická hodnota

PCR	polymerázová řetězová reakce
PET	pozitronová emisní tomografie
PET/CT	integrovaná pozitronová emisní tomografie s výpočetní tomografií
PMBC	mononukleární buňky periferní krve
PPV	pozitivní prognostická hodnota
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
R-CHOP	rituximab-cyklofosfamid-doxorubicin-vincristin-prednison
ROC	receiver operating characteristic
SMZL	splenický lymfom z B-buněk marginální zóny
T_m	melting temperature (teplota tání)