

Doktori (Ph.D.) értekezés

**Citogenetikailag tipizált diffúz nagy B-sejtes limfóma
(DLBCL)
klinikai prognosztikai monitorizálása**

Dr. Balikó Anett



Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos
Programvezető: Prof. Dr. Pajor László
Témavezető: Dr. Alizadeh Hussain

Pécsi Tudományegyetem

OGYDHT, Pécs

2023

Tartalomjegyzék

| | |
|--|----|
| 1. Bevezetés | 7 |
| 1.1. A DLBCL általános jellemzői és WHO osztályozása | 7 |
| 1.2. A DLBCL diagnózisa | 9 |
| 1.3. A DLBCL prognózisa, prognosztikai rendszerek | 9 |
| 1.4. A DLBCL vizsgáló módszerei | 10 |
| 1.4.1. Immunhisztokémia (IHC) | 10 |
| 1.4.2. FISH | 11 |
| 1.5. Diagnosztikai és prognosztikai markerek áttekintése | 13 |
| 1.5.1. BCL6 | 13 |
| 1.5.2. BCL2 | 13 |
| 1.5.3. MYC | 14 |
| 1.5.4. MIB1/Ki67 | 15 |
| 1.6. DLBCL osztályozása a sejteredet szerint | 15 |
| 1.6.1. DLBCL klasszifikációja immunhisztokémiai módszerekkel | 17 |
| 1.6.2. A DLBCL molekuláris klasszifikációja | 18 |
| 1.7. DLBCL staging és restaging | 21 |
| 1.8. A DLBCL kezelése | 23 |
| 1.8.1. A DLBCL standard kezelése | 23 |
| 1.8.2. Új terápiás lehetőségek | 24 |
| 2. Célkitűzések | 26 |
| 3. Anyag és módszer | 27 |
| 3.1. Minták | 27 |
| 3.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok | 28 |
| 3.3. Interfázis FISH vizsgálatok | 29 |
| 3.4. Klinikai adatgyűjtés | 31 |
| 3.5. Statisztikai módszerek | 31 |
| 4. Eredmények | 33 |
| 4.1. Klinikai jellemzők | 33 |
| 4.2. Immunhisztokémia eredmények | 34 |
| 4.3. Interfázis FISH eredmények és összefüggéseik | 36 |
| 4.4. Túlélési eredmények | 39 |
| 5. Összefoglalás | 46 |

| | |
|---|----|
| 6. Következtetések | 49 |
| 7. Az új eredmények összefoglalása | 50 |
| Irodalomjegyzék | 51 |
| Köszönetnyilvánítás | 64 |
| A disszertáció alapját képező publikációk | 65 |
| Egyéb publikáció | 66 |

Rövidítések jegyzéke

| | |
|---------|--|
| ABC | aktivált B-sejtes, activated B-cell like |
| ALK | anaplastic lymphoma kinase |
| BiTE | bispecifikus antitest, bispecific T-cell engager, |
| BCL2 | B-sejtes lymphoma protein 2, B-cell lymphoma 2 |
| BCL6 | B-sejtes lymphoma protein 6, B-cell lymphoma 6 |
| B2M | béta-2 mikroglobulin |
| CAR-T | kiméra antigén receptor-T, chimeric antigen receptor T |
| CD | cluster of differentiation, sejtfelszíni antigén |
| CI | konfidencia intervallum, confidence interval |
| CNS-IPI | központi idegrendszer IPI |
| COO | sejteredet, cell of origin |
| CR | komplett remisszió, complete remission |
| CREBBP | (cAMP response element binding)-binding protein |
| DAB | 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid |
| DEL | double expresszor limfóma |
| DHL | double hit limfóma |
| DLBCL | diffúz nagy B-sejtes limfóma, diffuse large B-cell lymphoma |
| DNS | dezoxiribonukleinsav |
| EBV | Epstein-Barr-vírus |
| ECOG | Eastern Cooperative Oncology Group |
| EFS | eseménymentes túlélés, event-free survival |
| EFS24 | 24 hónapos eseménymentes túlélés, event-free survival 24 |
| ESMO | European Society for Medical Oncology |
| EZH2 | enhancer of zeste homologue 2 |
| FITC | fluoreszcens izotiocianát |
| FDG | ¹⁸ fluoro-dezoxiglükóz |
| FISH | fluoreszcens in situ hibridizáció, fluorescence in situ hybridization |
| FFPE | formalinban-fixált paraffinba ágyazott, formalin-fixed paraffin-embedded |
| FOXP1 | forkhead box protein 1 |
| GCB | centrum germinativum B-sejtes, germinal centre B-cell like |
| GCET1 | germinal center B-cell expressed transcript-1 |
| GEP | génexpressziós profil, gene expression profile |

| | |
|-------------|---|
| GNA13 | G protein subunit alpha 12 |
| HGBL | magas malignitású B-sejtes limfóma, high grade B-cell lymphoma |
| HHV8 | humán herpeszvírus 8 |
| HR | esély-hányados, hazard ratio |
| HSR | homogéneen festődő régió, homogeneously staining region |
| iFISH | interfázis fluoreszcens in situ hibridizáció, interphase FISH |
| IgG | immunglobulin G |
| IHC | immunhisztokémia, immunohistochemistry |
| IPI | nemzetközi prognosztikai index, international prognostic index |
| KMT2D | histone-lysine N-methyltransferase D |
| KPI | Kyoto prognosztikus index, Kyoto prognostic index |
| KSHV | Kaposi szarkóma-asszociált herpeszvírus |
| LDH | laktát dehidrogenáz |
| LMO2 | LIM domain only 2 |
| MEF2B | myocyte enhancer binding factor 2B |
| MLL | mixed lineage leukemia |
| MUM1 | multiple myeloma oncogene 1 |
| MYC | myelocytomatosis oncogene cellular homologue |
| MYD88 | myeloid differentiation primary response 88 |
| NFK β | nukleáris faktor kappa B, nuclear factor kappa B |
| NGS | újgenerációs szekvenálás, next generation sequencing |
| NCCN | National Comprehensive Cancer Network |
| NCCN-IPI | National Comprehensive Cancer Network IPI |
| NHL | non-Hodgkin limfóma |
| OS | overall survival, teljes túlélés |
| PR | parciális válasz, partial response |
| R-IPI | módosított nemzetközi prognosztikai index, revised IPI |
| RIT | radioimmunoterápia |
| RNS | ribonukleinsav |
| SGK1 | serum glucocorticoid-regulated kinase 1 |
| SUV | standard felvételi érték, standardized uptake value |
| TET2 | tet metilcitozin dioxigenáz 2, tet methylcytosine dioxygenase 2 |
| THL | triple hit limfóma |
| TLG | teljes lézió glikolízis, total lesion glycolysis |

| | |
|---------|--|
| TMTV | metabolikus tumor tömeg, total metabolic tumor volume |
| TNFRSF1 | tumor necrosis factor receptor superfamily member 1 |
| WES | teljes exom szekvenálás, whole exome sequencing |
| WHO | Egészségügyi Világszervezet, World Health Organization |
| WTS | teljes transzkriptom szekvenálás, whole transcriptome sequencing |

1. Bevezetés

1.1. A DLBCL általános jellemzői és WHO osztályozása

A diffúz nagy B-sejtes limfóma (DLBCL) a nyirokrendszer B-limfocita eredetű, agresszív, rosszindulatú daganata, melyet a gyors növekedés jellemez. A DLBCL világszerte a non-Hodgkin limfóma (NHL) leggyakoribb altípusa, a felnőttkori NHL-k mintegy 30-40%-a, az agresszív limfómák 80%-a (1).

Incidenciája az Európai Unióban 3-4/100000/év, 50-60 éves kor felett gyakoribb (2). Diagnóziskor az átlag életkor 66 év, az öt éves túlélés a korrall csökken: 55 éves kor alatt 78% szemben a 65 év felettiéknél tapasztalt 54 %-kal (3).

A DLBCL többféle betegség entitást foglal magába, melyek nagyon különböznek klinikai, szövettani és biológiai jellegzetességeiket tekintve.

Ezt a heterogenitást tükrözi az Egészségügyi Világszervezet (WHO) legújabb, 2023-ban publikált osztályozása is (4).

A WHO klasszifikáció a DLBCL csoporton belül számos prognózisát, etiológiáját, genetikáját és klinikai megjelenését tekintve eltérő entitást különböztet meg. Megjelölnek szervspecifikus folyamatokat, vírusasszociált limfómákat, speciális genetikai eltérést hordozó altípusokat, átmeneti limfómákat és immundeficienciával járó entitásokat is. Az esetek legnagyobb része (több mint 80%-a) továbbra is a diffúz nagy B-sejtes limfóma, NOS kategóriába sorolandó, mely szintén heterogén entitás rendkívül változó prognózissal. A DLBCL, NOS kategóriába sorolt esetek 30-40%-a primer extranodális megjelenésű, a betegek átlag életkora 65-70 év a betegség felismerésekor (5).

Nagy B-sejtes limfómák

- Diffúz nagy B-sejtes limfóma, NOS
- T-sejt/hisztiocita-gazdag B-sejtes limfóma
- Diffúz nagy B-sejtes limfóma/high grade B-sejtes limfóma *MYC* és *BCI2* átrendeződéssel
- ALK-pozitív nagy B-sejtes limfóma
- Nagy B-sejtes limfóma *IRF4* átrendeződéssel
- High grade B-sejtes limfóma 11q átrendeződéssel
- Limfomatoid granulomatózis
- EBV-pozitív diffúz nagy B-sejtes limfóma
- Krónikus gyulladással asszociált diffúz nagy B-sejtes limfóma
- Fibrin-asszociált nagy B-sejtes limfóma
- Folyadék túltöltéssel-asszociált nagy B-sejtes limfóma
- Plazmoblasztos limfóma
- Immunprivilegizált régiók nagy B-sejtes limfómája
- Primer cutan diffúz nagy-B-sejtes limfóma, láb típusú
- Intravaszkuláris nagy B-sejtes limfóma
- Primer mediasztinális nagy B-sejtes limfóma
- Mediasztinális szürke zóna limfóma
- High grade B-sejtes limfóma, NOS

Burkitt limfóma

- Burkitt limfóma

KSHV/HHV8-asszociált B-sejtes limfoid proliferációk és limfómák

- Primer effúzionális limfóma
- KSHV/HHV8-pozitív diffúz nagy B-sejtes limfóma
- KSHV/HHV8-pozitív germinotrop limfoproliferatív betegség

Immundeficienciával és diszregulációval asszociált B-sejtes limfoid proliferációk és limfómák

- Immundeficienciából/diszregulációból eredő hiperpláziák
- Immundeficienciából/diszregulációból eredő polimorf limfoproliferatív betegségek
- EBV-pozitív mucocutan fekély
- Immundeficienciából/diszregulációból eredő limfómák
- Immun-asszociált limfoid proliferációk és limfómák veleszületett zavara

DLBCL NOS – tovább nem osztályozható DLBCL; EBV – Epstein–Barr-vírus, KSHV– Kaposi szarkóma-asszociált herpeszvírus; HHV8 – humán herpeszvírus 8

1.2. A DLBCL diagnóza

A diagnózis felállításához excíziós minta vagy core biopszia szövettani, immunhisztokémiai és fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) vizsgálata szükséges. A finomtű biopszia során nyert minta nem elegendő a megfelelő patológiai értékeléshez. A hematoxin-eozin festéssel készült szövettani képre általánosságban jellemző, hogy a tumorsejtek közepes vagy nagy limfociták kerek vagy ovális sejtmaggal és vezikuláris kromatinnal. A klasszikus DLBCL morfológia centroblasztos, immunoblasztos és anaplasztikus lehet. A DLBCL-NOS eseteken kívül a többi entitást tekintve nem mindig van jelen diffúz növekedési mintázat, emiatt a legújabb WHO osztályozás a diffúz nagy B-sejtes limfóma helyett a nagy B-sejtes limfóma elnevezést használja az altípusok jelölésénél (4). Immunhisztokémiai vizsgálatokkal a tumorsejtek CD19, CD20 és CD22 pozitivitást mutatnak. A pontosabb altípus meghatározáshoz rutinszerűen további sejtfelszíni (CD5, CD138, CD10), citoplazmatikus (BCL2, CD30, ALK) és magi fehérjék (MUM1, BCL6, MYC, FOXP1) vizsgálata is történik. A genetikai eltérések FISH technikával vizsgálhatók a rutin gyakorlatban (*MYC*, *BCL6*, *BCL2* transzlokáció/amplifikáció), diagnosztikus kétség esetén napjainkban a célzott szekvenálás is elérhető (EZH2, MLL, CREBBP, MYD88, TET2 stb.) (6).

1.3. A DLBCL prognóza, prognosztikai rendszerek

Az elmúlt két évtizedben számos fázis III tanulmány megerősítette, hogy a standardnak számító R-CHOP kezelés (rituximab, ciklofoszfamid, hidroxidaunorubicin, vinkrisztin és prednizon) a betegek 50-60 %-át meggyógyítja. Azoknak a betegeknek, akik első vonalban R-CHOP immunkemoterápiát kapnak, és a diagnózist követő 24 hónapon belül eseménymentesek (EFS24), kiváló a teljes túlélésük, hasonló a nemben és korban illesztett általános populációhoz (7-9).

Az esetek 10-15 %-a primer progrediáló vagy refrakter betegség, míg kb. 30-40%-uknál az első két évben relapszus következik be (10). A relabált vagy refrakter betegeknek csak a 20 %-a gyógyítható további immunkemoterápiával és ezt követően autológ hemopoetikus őssejt átültetéssel (11).

Számos prognózist becselő rendszert dolgoztak ki, melyek segítséget adnak a diagnóziskor a betegek kockázatának felmérésében, és a terápiás döntéshozatalban. Ezek közül a leggyakrabban használt a Nemzetközi Prognosztikai Index (International Prognostic Index, IPI), melyben 5 klinikai paraméter szerepel: 60 évnél magasabb életkor, emelkedett laktát-dehidrogenáz (LDH) szint, egynél több extranodális régió érintettsége, III-IV-es stádium,

ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) által meghatározott gyenge általános állapot (2-4). Mindegyik paraméter megléte 1-1 pontot ér, ennek alapján négy rizikó csoport különíthető el: alacsony, alacsony-közepes, magas-közepes és magas rizikójú alcsoportok (12).

Az anti-CD20 monoklonális antitest terápia (rituximab) bevezetését követően az IPI prognosztikai értéke jelentősen csökkent különösen a magas rizikójú csoportokban (13-14).

Számos próbálkozás történt a rituximab érában új prognosztikai rendszerek kidolgozására. A revised IPI (R-IPI) ugyanazokat a paramétereket tekinti rizikófaktornak mint az IPI, de a rizikócsoportok száma háromra csökkent (15). A National Comprehensive Cancer Network IPI (NCCN-IPI) az IPI-nél jobban elkülönítette az alacsony és a magas rizikójú csoportokat négy kategóriát alkotva (16).

Bár ezek a kockázat becslő rendszerek a klinikai gyakorlatban széles körben használtak, de nem alkalmasak a magas rizikójú, rossz prognózisú betegek azonosítására (17).

A Kyoto Prognosztikus Index (KPI) alkalmas egy extrém rossz prognózisú csoport meghatározására, és pontos, új túlélést becslő modell lehet DLBCL-ben (18).

Az utóbbi évek kutatásai eredményeképpen lehetővé vált a DLBCL altípusainak sokkal részletesebb klasszifikációja a genetikai abnormalitások mintájára és a génexpressziós vizsgálatok eredményeire alapozva (19-21).

A technikai komplexitás és az anyagi korlátok megnehezítik ezeknek a prognosztikus rendszereknek a rutinszerű alkalmazását a mindennapi klinikai gyakorlatban.

1.4. A DLBCL vizsgáló módszerei

1.4.1. Immunhisztokémia (IHC)

Az immunhisztokémia fehérjék in situ szövetstruktúrához kapcsolt kimutatására alkalmas molekuláris morfológiai módszer, mely egy fehérjét néhány aminosav sorrendjének és megfelelő konformációjának alapján azonosít. Az immunhisztokémia a sejtalkotó antigéneket specifikus antitestek kapcsolódása után teszi láthatóvá szövettani metszeteken. A diagnosztikus patológia egyik legfontosabb módszere, az adott sejtek, illetve entitás azonosítása mellett segíthet a daganatok prognózisának felmérésében és a terápiás válaszkészségre utaló egyedi jellemzők feltárásában is. A diagnosztikus gyakorlatban legtöbbször fehérjék mutathatóak ki a keletkezésük, illetve a működésük helyén, specifikus antigén-antitest kötés alapján. Az immunkötődés mikroszkópos vizsgálatát a rendszerbe épített enzimek (pl. tormaperoxidáz) illetve fémkolloidok (pl. arany) színes terméket

eredményező katalitikus reakciója vagy fluorokrómok teszik lehetővé. A módszer előnye, hogy egyedi sejt- vagy akár szubcelluláris szintű megfigyeléseket tesz lehetővé a komplex szöveti struktúra megtartása mellett. Pontosan megítélhető, hogy az adott fehérje a daganatsejt melyik kompartmentjében (sejtmag, citoplazma, membrán) lokalizálható és milyen mennyiségben. A minta lehet natív/alkoholban fixált sejt, fagyasztott metszet vagy formalinban fixált, majd paraffinba ágyazott sejt/szövet metszete. Praktikus okokból a formaldehid-rögzítés és paraffinbeágyazás módszere terjedt el, mely mintákon egyes antigének akár évtizedek múlva is kimutathatóak. A másodlagos antitestek az adott primer antitest immunglobulin-alesztályainak széles körét felismerni képes, tisztított poliklonális immunglobulinok. A reakciótermék láthatóvá tétele történhet immunenzimatikus és immunfluoreszcens módszerrel. Az immunperoxidáz-reakciók előhívásához hidrogénperoxid-szubsztrát és általában DAB (3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid-barna) kromogén használatos. A reakcióban elbontott hidrogénperoxid-szubsztrát oxigénje oxidálja a kromogént, melyből rosszul oldódó, polimerizált csapadék válik ki az antitestkötődés helyén. Az immun alkalikus foszfátáz reakció szubsztrátja valamilyen alfa-naftol-foszfát, kromogénje lehet diazóniumsó (pl. új fukszin, ibolyavörös) vagy indol-foszfát és tetrazóliumsó (p. Nitro Blue Tetrazólium, sötét-lilás kék). A reakciók ún. azofesték képződésen alapulnak, ahol a foszfátcsoporttól enzimhasítással megfosztott alfa-naftol gyűrű béta pozíciójába kötődő di/tetrazónium vegyület létrejöttével keletkezik csapadék. Az immunfluoreszcens módszer során az antitestek jelzésére fluorokrómokot használnak, melyek megfelelő hullámhosszú UV vagy látható fényel gerjeszthetők (abszorpció), ennek hatására magasabb hullámhosszon sötét látótérben fluoreszcens fényt bocsátanak ki (emisszió). Az immunfluoreszcens jelek hagyományos fluoreszcens mikroszkóppal vagy fluoreszcens digitális mikroszkóppal vizsgálhatók. Az immunfluoreszcens módszert leginkább az immunológiai háttérű vesebetegségek diagnosztikájában alkalmazzák.

Az immunhisztokémia jelentősége különösen a daganatpatológiában alapvető, ahol a tumorsejtek differenciál diagnosztikája mellett a replikációs aktivitás és aktivált/foszforilált fehérjék is detektálhatók. Ezek a fehérjék terápiás célpontok lehetnek, így közvetlenül befolyásolják a klinikai döntéseket (22).

1.4.2. FISH

Az in situ hibridizációval szöveti vagy bármilyen sejtpreparátumból származó sejtekben eredeti helyén tudunk komplementer DNS szakaszokat hibridizálni jelölt próbákkal. Legelterjedtebb változata a fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH). A fluoreszcens jelölés

lehet direkt módon a próbához kötött. Az indirekt jelölések közül a leggyakoribbak a biotin vagy digoxigenin hapténnel jelölt próbák, melyeket azonban további detektálási lépésekkel lehet láthatóvá tenni. A nukleinsav próbához kapcsolt biotint avidin-FITC (fluoreszcens izotiocianát) reakcióval lehet kimutatni. A nukleotidokkal konjugált digoxigenin nagy affinitású peroxidáz vagy alkalikus foszfatáz enzimmel konjugált antidigoxigenin antitestekkel kapcsolható. Az enzimek által katalizált kromogén kicsapódás vagy kemilumineszcencia a jelet felerősíti a direkt fluorokrómmal jelölt próbák alkalmazásához képest. A módszer diagnosztikus célokra, kromoszómahibák (deléció, transzlokáció, amplifikáció, inverzió, kópiaszám-eltérések) célzott kimutatására alkalmas. Az ún. interfázis-FISH módszer lehetőséget ad nem osztódó, interfázisban lévő sejtek vizsgálatára, ezáltal alkalmazható sejtszuszpenzió, sejttenyészetben, fagyasztott vagy paraffinos metszeteken is. Az interfázis sejtmagban lényegesen lazább kromatin állapota miatt akár 100-500 kilobázis (kb) nagyságú aberrációk is kimutathatók. A szimultán hibridizációs próbák többszínű jelölése és kimutathatósága különösen hasznos, amikor a szerkezeti eltérések különböző kromoszómák régióit érintik, vagy ha több kromoszómát érintő számbeli eltérést szükséges egyszerre kimutatni. A választott szondakombinációknak olyan jelmintázatot kell eredményeznie, ami eltér a kérdéses citogenetikai eltérés megléte vagy hiánya esetén. A DNS-próbákat a már ismert genetikai eltérések kimutatására tervezik, és három fő típusban sorolhatók. A kromoszóma „painting” próbák metafázis kromoszómákon adnak értékelhető eredményt, a vizsgálatot elsősorban kutatási céllal végzik. A centroméra-specifikus próbákat a kromoszómák heterokromatinjára (tandem ismétlődő szekvenciák) tervezik, és a kromoszómák számbeli eltéréseit lehet kimutatni ezzel a módszerrel. A lókuszszerkezetes próbák gén- és törésspecifikus próbák, szerkezeti eltérések detektálására alkalmasak: deléció, transzlokáció, inverzió, amplifikáció. Egy vagy két gént jelölnek meg különböző színekkel (általában zöld és vörös színnel), így kimutatható az adott gén vagy gének érintettsége. A lókuszszerkezetes próba a mutáció típusától függően többféle lehet. A deléciós próbák egy adott génszakasz hiányának kimutatására alkalmasak. Amplifikációs próbák, melyek egy génszakasz sokszorozódását detektálják. A disszociációs (split) vagy „break apart” próbák egy gén töréspontjának két oldalát jelölik két eltérő színnel, általában zölddel és vörössel. Normál esetben a szignálok egymáshoz nagyon közel helyezkednek el, és átfedésük miatt sárga jelet adnak, míg transzlokációkor a szignálok szétválnak, egymástól távolabb piros és zöld jelet adnak.

A FISH szerepe a patológiában a daganatok genetikai hátterének egyre pontosabb megismerésével folyamatosan bővül. Alkalmas a morfológia és az immunfenotípus által

meghatározott diagnózis genetikai hátterének megerősítésére, az adott daganat altípus besorolására, prognosztikai csoport besorolásra. A klinikai gyakorlatban használható reziduális betegség nyomon követésére és célzott terápia indikálására is (22).

1.5. Diagnosztikai és prognosztikai markerek áttekintése

1.5.1. BCL6

A *BCL6* humán proto-onkogén a centrum germinativum eredetű B-sejtekben (GCB) expresszálódik elsősorban, és a 3q27 kromoszóma átrendeződések vizsgálatakor azonosították (23-24).

A *BCL6* egy 92-98 kDa molekulatömegű, nukleáris cinkujj fehérje és transzkripciós represszorként funkcionál a csíracentrumon belül. A B-sejtek plazmasejtes irányú terminális differenciálódásához és a centrum germinativumon belül a B-sejt apoptózis megelőzéséhez a *BCL6* gén csendesítése szükséges, és ennek zavara fontos tényezője a limfómagenezisnek (25). A *BCL6* fehérje fontos szerepet játszik a csíracentrumok létrehozásában és több tanulmány is igazolta kedvező prognosztikai szerepét DLBCL-ben (26-30).

Az összes genetikai aberráció közül a *BCL6* (3q27) átrendeződés a leggyakoribb DLBCL-ben, előfordulása 20-35% (31). A *BCL6* (3q27) gyakran érintett kromoszóma transzlokációk által, és ezek a genetikai eltérések az aktivált B-sejtes (ABC) eredetű DLBCL-ben gyakoribbak. A *BCL6* átrendeződés és a betegek túlélése közötti összefüggés nem teljesen egyértelmű, főleg a rituximab érában. Egyes vizsgálatok az eltérés túlélésre gyakorolt kedvező hatását igazolták (32-33), más vizsgálatokban nem volt prognosztikai szerepe (29, 34), de kedvezőtlen mutációként is leírták (35).

1.5.2. BCL2

A *BCL2* gén a B-sejt érés során csak átmenetileg expresszálódik, központi szerepet játszik az apoptózis gátlásában, és ez által a limfómagenezisben, illetve felelőssé tehető a kemoterápiával szembeni rezisztenciáért is. A *BCL2* protein génje a 18q21-es kromoszómán helyezkedik el, és központi regulátora a mitokondriális apoptózis szabályozásnak (36). A (14;18) transzlokáció a *BCL2* gén fokozott expresszióját eredményezi, mivel a *BCL2* gén az immunglobulin nehézlánc gén enhancer génszakasza mellé kerül. A *BCL2* mutációk a DLBCL-es esetek 15-20%-ában mutathatóak ki (37) és gyakoribbak a centrum germinativum B-sejtes (GCB) alcsoportban (38).

A *BCL2* átrendeződés prognosztikai szerepe vitatott. A rituximab érában kedvezőtlenebb túlélést jelent a *BCL2* transzlokáció, de csak a GCB alcsoporton belül (39-40). A *BCL2* protein expressziós ráta DLBCL-ben 47-58 %, a pozitivitás küszöbértéke 50-75% (41).

Egyes tanulmányok szerint a *BCL2* expresszió nem prediktív a túlélést tekintve (42-43).

Más kutatók eredményei szerint a *BCL2* protein fokozott expressziója DLBCL-ben kedvezőtlen prognózissal társul (44).

Ismertek olyan közlések is, hogy a GCB típusú DLBCL-ben a fokozott *BCL2* expresszió *IgH::BCL2* transzlokáció eredménye, és nem befolyásolja a betegség kimenetelét. Az ABC típusú daganatokban a fokozott fehérje expresszió a *BCL2* gén amplifikáció és az NFK β útvonalon keresztüli transzkripciós aktivitás fokozódás eredménye, és kedvezőtlen kimenetellel társul (45-46).

1.5.3. MYC

A MYC fehérje transzkripciós faktor, a gének több mint 15%-át szabályozza, ezáltal serkentve a proliferációt (47).

A *MYC* egy potens onkogén, melyet a (14;18)-es kromoszóma transzlokáció targetjeként fedeztek fel Burkitt limfómában. A legtöbb mutáció következménye a MYC onkogén potenciáljának erősödése, targetjei funkcionális domének (48). A DLBCL-es esetek 5-14%-ánál írták le a *MYC* (8q24) transzlokációt. A *MYC* átrendeződés DLBCL-ben gyakoribb 60 éves kor felett, előrehaladott stádiumban, magasabb IPI érték és extranodális manifesztáció esetén, de ezeket az eredményeket nem minden tanulmány támasztja alá konzekvensen. A *MYC* átrendeződés a legtöbb tanulmány szerint kedvezőtlen prognózist jelez és nagyobb rizikóval bír központi idegrendszeri relapszusra (49).

Az utóbbi évek vizsgálati eredményei alapján a *MYC* transzlokáció csak abban az esetben jár kedvezőtlen prognózissal, ha a *MYC* partnere immunglobulin gén, és ha a génmutáció fokozott fehérje expresszióval is jár. A MYC fehérje fokozott expressziója a magban más mechanizmussal is kialakulhat, és önmagában nem prognosztikai tényező (50).

A *MYC* átrendeződés az esetek 60-80%-ában *BCL2* vagy *BCL6* átrendeződéssel is társul. Ezek az ún. double hit vagy triple hit limfómák, a de novo DLBCL-es betegek 5-7%-a (51), a 2016-os WHO klasszifikációban külön entitásként szerepel „High grade B-sejtes limfóma *MYC* és *BCL2* és/vagy *BCL6* átrendeződéssel” (52). Ez a DLBCL-es altípus extrém rossz prognózissal bír, az átlag túlélés kevesebb, mint 6 hónap (53-57).

Az alcsoport genetikai jellegzetességeinek felfedezését követően a Hematolinfoid Tumorok WHO osztályozásának ötödik kiadásában újra értékelték, és átnevezték ezt az alcsoportot:

Diffúz nagy B-sejtes limfóma/high-grade B-sejtes limfóma *MYC* és *BCL2* átrendeződéssel (DLBCL/ HGBL-MYC/BCL2) (4).

A *MYC* és *BCL2* átrendeződéssel bíró limfoid tumorok gén expressziós profilja kizárólagosan centrum germinativum eredetű, míg a *MYC* és *BCL6* átrendeződést hordozó limfómák ettől teljesen különböző genetikai spektrummal bírnak (58).

DLBCL-ben a *MYC* protein pozitivitás 5-40% (59-61). Néhány tanulmány szerint DLBCL-ben a *MYC* és *BCL2* protein együttes expressziója 30%-ban fordul elő, ezek az ún. „double expressor” limfómák (DEL) (62). Tekintettel arra, hogy a C-MYC/BCL2 immunhisztokémiai vizsgálatok nehezen reprodukálhatók, ezért a C-MYC/BCL2 együttes pozitivitása nem szerepel tényezőként a terápiás döntéshozatalban.

A *MYC* gén amplifikációt a DLBCL-es esetek 2-20%-ában írták le, hatása a *MYC* protein expresszióra és a prognózisra bizonytalan (63-64).

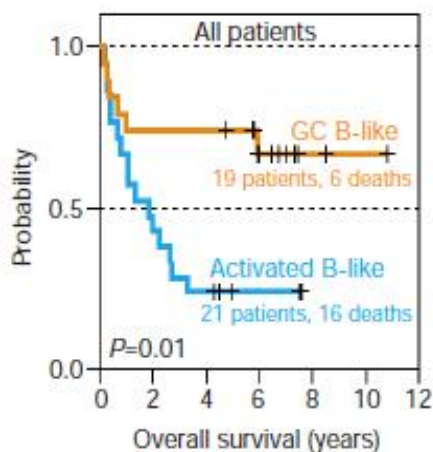
1.5.4. MIB1/Ki67

A MIB1 egy monoklonális antitest, melyet a Ki67 nukleáris antigén felismerésére fejlesztettek ki. A Ki67 a sejtciklus proliferációs fázisaiban fejeződik ki (G1, S, G2, M fázisban), a MIB1 expressziója a tumor proliferációs rátáját jelzi. A Ki67 expresszió és a limfóma prognózisának összefüggése még vitatott kérdés. Egyes tanulmányok szerint a magas Ki67 index kedvezőtlen prognózissal társul (a küszöbérték:60-75%) (65), más vizsgálatok eredményei alapján pedig nincs összefüggés a Ki67 index és a prognózis között (66). Egyes vizsgálatok szerint a magas Ki67 index fokozott *MYC* aktivitásra utalhat, így ez esetekben célszerű lehet a *MYC* gén FISH vizsgálata (65).

1.6. DLBCL osztályozása a sejteredet szerint

A terápiára adott eltérő válasz, a biológiai variabilitás a DLBCL molekuláris heterogenitását feltételezi. Ahhoz, hogy a diagnóziskor felismerjük, hogy melyik beteg lesz az, aki nem reagál a konvencionális immunkemoterápiára, nagyon fontos a DLBCL biológiájának megismerése. A DLBCL genetikai feltérképezése és a részletes immunhisztokémiai és citogenetikai vizsgálatok az új terápiák felfedezéséhez is elengedhetetlenek. A DLBCL különböző biológiai altípusainak felismerése mérföldkőnek számít ezen a kutatási területen. Alizadeh és munkatársai 2000-ben microarray technika segítségével a DLBCL két altípusát azonosították, melyek génexpressziós mintázata a B-sejt differenciáció különböző fázisaira jellemzőek. Az egyik altípus esetén a B-sejtek a centrum germinativumra jellemző géneket expresszálnak (centrum germinativum B-sejtes DLBCL, GCB DLBCL), a másik altípus

esetén a génextpresszió a perifériás vérben in vitro aktivált B-sejtekre jellemző (aktivált B-sejtes DLBCL, ABC DLBCL) (67). Ez a két sejteredet (cell of origin, COO) szerint meghatározott altípus különbözik mind a genetikát mind a prognózist tekintve. Az ABC altípus jelentősen kedvezőtlenebb prognózissal társul, mint a GCB altípus az immunterápia bevezetése ellenére is. Alizadeh és munkatársainak eredményei alapján a DLBCL-es betegek átlagos öt éves túlélése 52 % volt, a GCB típusba sorolt betegek öt éves túlélése 76 %, szemben az ABC típusú DLBCL-es betegeknél tapasztalt 16%-kal. (1.ábra). A betegek túlélési adatait vizsgálták a különböző IPI alcsoportokban is. Eredményeik szerint az alacsony rizikójú (IPI 0-2) betegek esetében is szignifikánsan kedvezőtlenebb az ABC csoportba tartozó betegek teljes túlélése a GCB szubtypusúakkal összehasonlítva.



1. ábra: GCB és ABC altípusba sorolt DLBCL-es betegek túlélése (67)

A rituximab hozzáadása a standard CHOP terápiához javította az eredményeket, de a túlélésbeli különbség GCB és ABC csoport között megmaradt. A GCB csoportba sorolt betegek 5 éves túlélése 80% körüli szemben az ABC csoportban tapasztalt 50%-kal a rituximab érában (68).

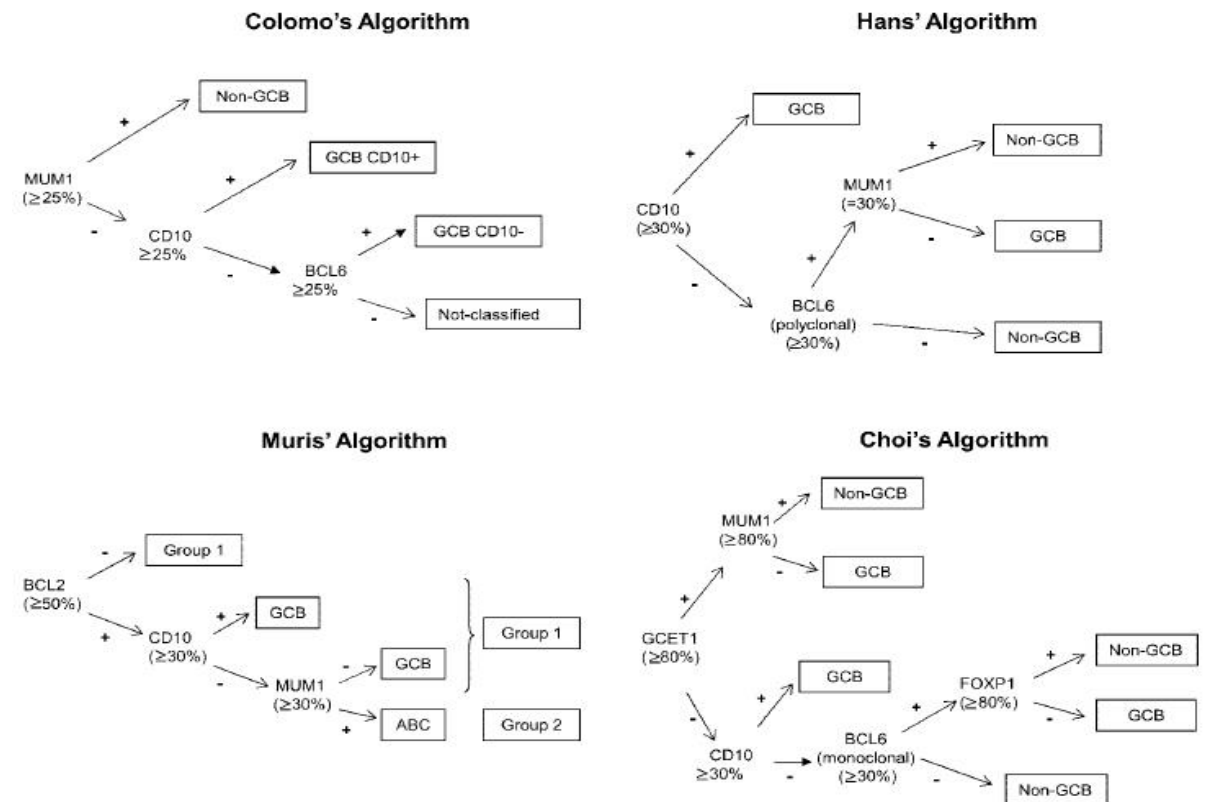
A GEP (gén expressziós profil) vizsgálatok alapján a GCB szubtypusú DLBCL-re a következő gének fokozott expressziója jellemző: *EZH2*, *GNA13*, *MEF2B*, *KMT2D*, *TNFRSF14*, *B2M*, *CREBBP*, *SGK1*. Ezek a gének a normális GC B-sejtekben is aktívak. Gyakori eltérés GCB szubtypus esetén a *IGH::BCL2* fúzió, ami (14;18) (q32;q21) transzlokáció következtében jön létre (69).

Az ABC szubtypust alkotó sejtek a csíracentrumot már elhagyták, vagy korai plazmablasztos fenotípust mutatnak. Jellemző a B-sejt jelátviteli utak és az NFκB fokozott aktivitása, a *MUM1* és a *c-FLIP* gének túlműködése az egészséges ABC eredetű B-sejtekhez hasonlóan

(26). Gyakoriak a B-sejt receptor jelátviteli utak mutációi pl. *MYD88*, *CD79B*, *PIM1*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *TP53* és a genetikai eltérések, melyek a B-sejt differenciációt blokkolják pl. a *BCL6* átrendeződés (69).

1.6.1. DLBCL klasszifikációja immunhisztokémiai módszerekkel

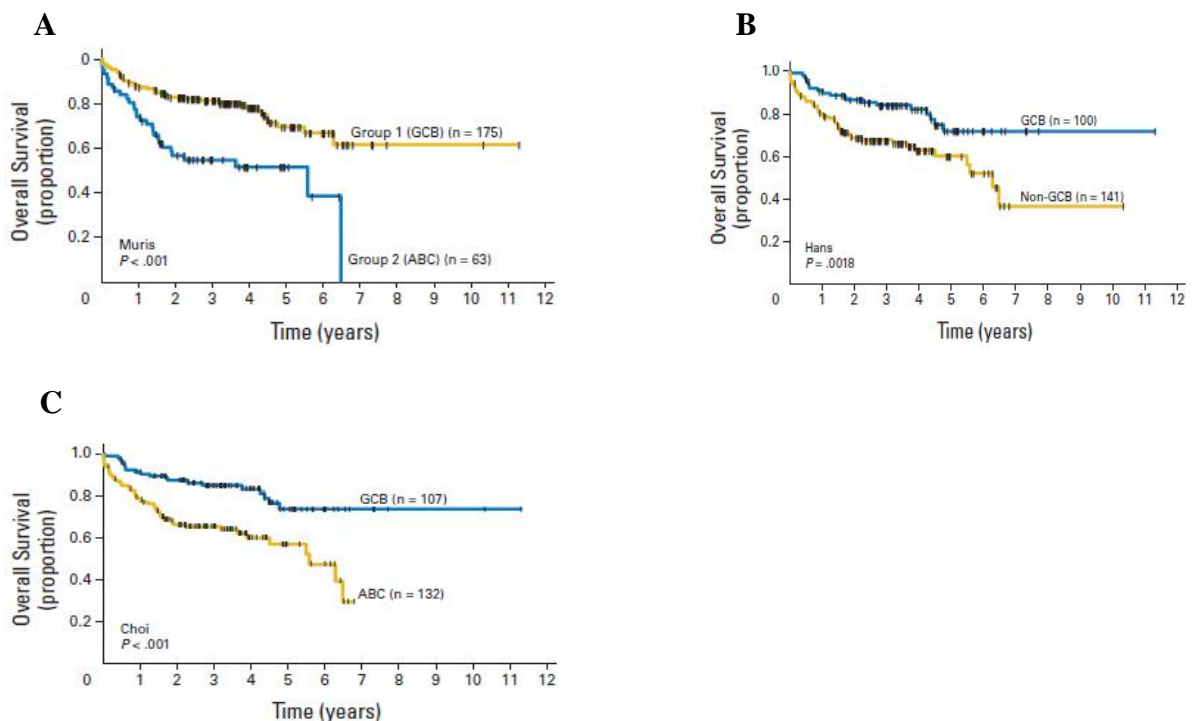
Mivel a GEP technikák nem elérhetőek a mindennapi klinikai gyakorlatban, ezek helyettesítésére különböző immunhisztokémiai algoritmusokat dolgoztak ki, melyek néhány biomarker segítségével lehetővé teszik a molekuláris vizsgálatok eredményeinek rutinszerű alkalmazását, ezáltal a sejteredet meghatározását a protein expresszió alapján. A szövettani kép önmagában nem elegendő a diagnózis felállításához. Általánosságban a centroblasztos daganatok inkább GCB, míg az immunoblasztos DLBCL inkább ABC eredetű, de a morfológiai alapon elkülönített csoportok túlélése nem tér el szignifikánsan (6). A biomarkerek közül a GCB markerek a következők: CD10, BCL6, GCET1 és LMO2, az ABC markerek: MUM1/IRF4 és a FOXP1 (2. ábra).



2. ábra DLBCL sejteredet szerinti osztályozásai immunhisztokémiai módszerekkel (70).

A legelőször bevezetett, és a gyakorlatban leggyakrabban használt a Hans algoritmus, három marker kimutatásán alapul: CD10, BCL6, MUM1. A fenti markerek hozzáadásával további

algoritmusokat dolgoztak ki a sejteredet immunhisztokémiai alapú meghatározására (Colomo, Muris, Choi). Egyes tanulmányok szerint az immunhisztokémiai algoritmusokkal meghatározott DLBCL altípusok jól korrelálnak a GEP eredményekkel, és azokhoz hasonlóan szignifikáns különbség mutatkozik a GCB és ABC altípus teljes túlélése között (3. ábra). Az utóbbi évek kutatásai alapján azonban a GEP technikák által meghatározott sejteredet jobban korrelál a túléléssel összehasonlítva az immunhisztokémia alapuló sejteredet meghatározással (71). Az ABC eredetű tumorok elkülönítése immunhisztokémia módszerekkel bizonytalan, emiatt IHC módszerrel meghatározott alcsoport esetén ABC helyett a non-GCB megjelölést használjuk.



3. ábra: A Muris (A), a Hans (B) és a Choi (C) algoritmus alapján GCB és non-GCB (ABC) csoportba sorolt DLBCL-es betegek túlélése (72).

1.6.2. A DLBCL molekuláris klasszifikációja

Az Alizadeh féle sejteredet meghatározás a génexpressziós profil alapján lehetőséget adott a DLBCL-es betegek pontosabb rizikó becslésére. A GCB és az ABC szubtípusok különböző, jellegzetes genetikai térképpel bírnak. Az esetek 10-20%-a azonban ezzel a módszerrel nem klasszifikálható (71), ezért felmerült további módszerek kidolgozásának igénye. GEP vizsgálatot végezni friss, fagyasztott mintákon a mindennapi klinikai gyakorlatban nem rutinszerű eljárás. A diagnosztikai módszerek fejlődésével elvégezhetővé váltak a molekuláris

vizsgálatok formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetmintákon, ezáltal lehetőség nyílt a DLBCL-es esetek további molekuláris osztályozására.

2018-ban Schmitz és munkatársai 574 DLBCL-es beteg friss, fagyasztott mintáit vizsgálták teljes exom és transzkriptom szekvenálással (WES és WTS) (19). A szerzők bizonyították, hogy a máshova nem osztályozható DLBCL kategória esetén *NOTCH2* mutáció és *BCL6* transzlokáció figyelhető meg egyszerre, és a GCB és ABC altípustól teljesen elkülöníthető kategóriáról van szó. Olyan algoritmust dolgoztak ki, mely a genetikai aberrációk együttes előfordulásán alapszik, ennek alapján négy genetikai szubtypust határoztak meg, és az esetek 47%-át tudták így besorolni. Az MCD altípusra *MYD88L265P* és *CD79B* mutációk jellemzőek, általában az ABC típusok sorolhatók ebbe a kategóriába. A BN2 altípusra *BCL6* fúzió és *NOTCH2* mutáció jellemző, az N1 csoport *NOTCH1* mutáció jelenlétével jellemezhető, és általában ABC szubtypusú. Az EZB altípusú esetek sejteredet szerint a GCB szubtypusba tartoznak, az *EZH2* mutáció és a *BCL2* transzlokáció egyidejű jelenlétével jellemezhetőek. A különböző szubtypusokban sorolt DLBCL-es betegek prognózisa és molekuláris karakterisztikája az adott alcsoportra jellegzetes, tehát ezek a szubtypusok is különböző prognosztikai alcsoportokat definiálnak. Az ABC alcsoportban az MCD és N1 kategóriába sorolt betegek kedvezőtlenebb prognózissal bírnak, a BN2 típusba sorolt ABC DLBCL-es betegek jó prognózissal jellemezhetőek a többi ABC DLBCL-es beteghez viszonyítva. A GCB DLBCL-es betegek közül az EZB szubtypusba tartozóak rosszabb prognózissal jellemezhetőek a többi GCB DLBCL-es beteggel összehasonlítva. Ez a munkacsoport pontos targeteket jelölt ki az egyes nagy rizikójú alcsoportokon belül, pl. az MCD kategóriába sorolt betegek jól reagálnak ibrutinib kezelésre a konstitutívan aktív B-sejt receptor jelátvitel miatt.

Chapuy és munkatársai 2018-ban hasonló átfogó genetikai vizsgálatokat folytattak 304 R-CHOP-val kezelt DLBCL-es beteg mintáit felhasználva (73). Más algoritmust alkalmazva, mint Schmitz és munkatársai, öt DLBCL alcsoportot azonosítottak a jellemző genetikai tulajdonságaik alapján (cluster 1-5, C1-C5), melyekbe az esetek 96%-át tudták besorolni. C1 típusra jellemző a *BCL6* transzlokáció és a *NOTCH2* vagy *SPEN* mutáció, ezek alapján a BN2 szubtypussal identikus kategória. A C2 altípusra a *TP53* mutáció jellemző. A C3 típusba többnyire GCB eredetű DLBCL-es betegek tartoznak, *BCL2* transzlokációval és az epigenetikai regulátorok mutációival jellemezhető (*EZH2*, *CREBBP* vagy *KMT2D*), a C3 szubtypus és a Schmitz által leírt EZB altípus hasonló entitások. A C4 altípusba általában a hiszton mutációkkal bíró esetek tartoznak. A C5 kategória jellegzetes mutációi a *MYD88* és a *CD79B*, ami az MCD típusal azonos. A klinikai adatokat tekintve a C3 szubtypusú GCB

DLBCL és a C5 szubtypusú ABC DLBCL prognózisa hasonló az MCD és az EZB szubtypusokéhoz.

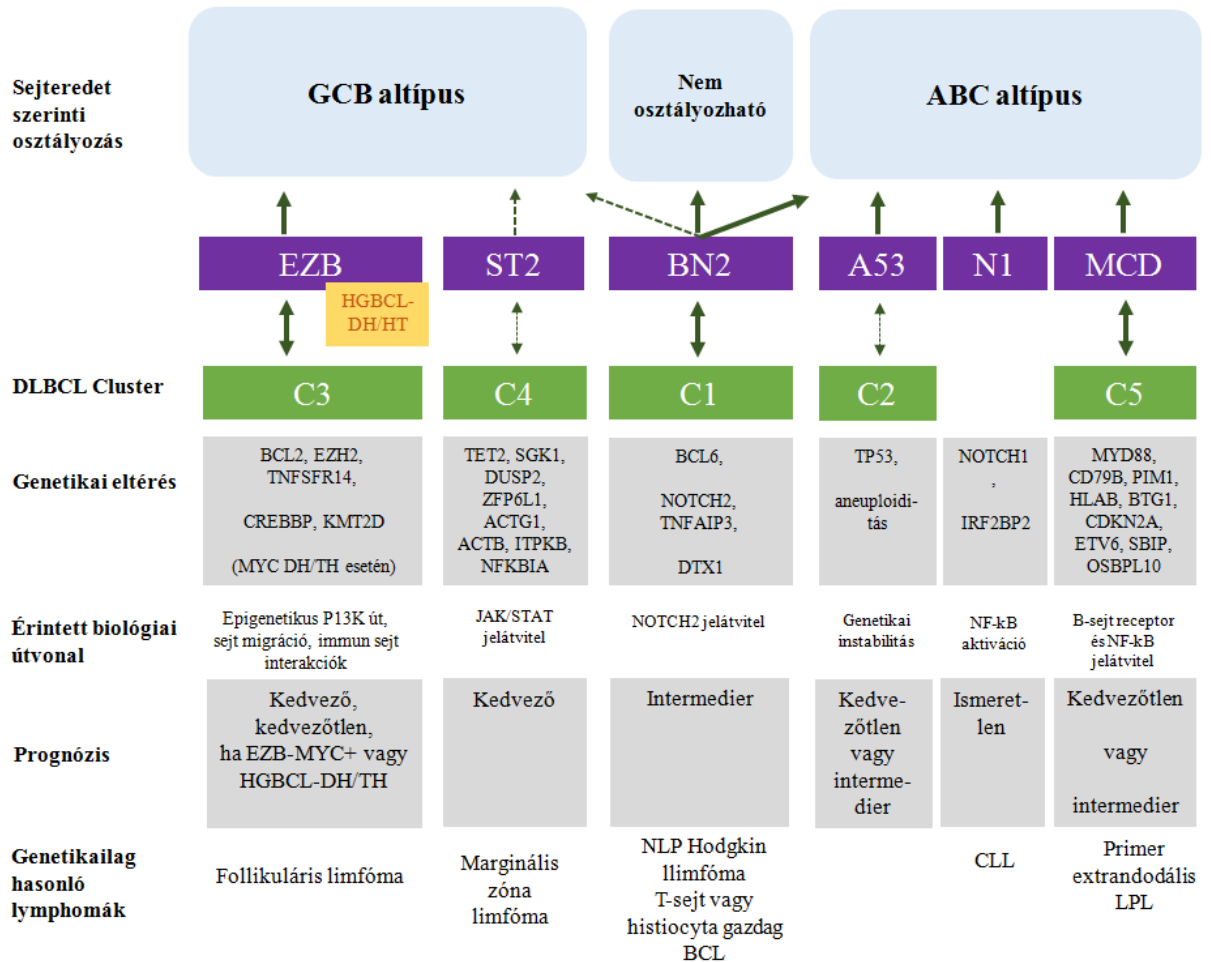
Lacy és munkatársai 2020-ban 928 DLBCL-es beteg mintáját vizsgálták, és öt molekuláris alcsoportot különböztettek meg (74). Az első a MYD88 klaszter, mely többek között *MYD88* mutációval jellemezhető, és ide tartozott a primer központi idegrendszeri limfómák és a primer herelimfómák többsége. Ez az alcsoport kedvezőtlen prognózisú, és döntően ABC-DLBCL eseteket foglal magában, az MCD és a C5 klaszterhez hasonló. A jó prognózisú BCL2 csoport a t(14:18) transzlokációval jellemezhető, ezen kívül gyakoriak még *KMT2D*-, *CREBBP*-, *EP300*- és *TNFRSF14*- génmutációk. SOCS1/SGK1 csoport a primer mediasztinális limfóma genetikai jellegzetességeit hordozza. A TET2/SGK1 csoporthoz hasonlóan kedvező kimenetelű, a C4 klaszternek megfelelő genetikai eltéréseket reprezentál, és GCB-DLBCL-es esetek tartoznak ezekbe a kategóriákba. A NOTCH2 csoport *NOTCH2*, *BCL6* és *CD70* mutációkkal jellemezhető, intermedier prognózisú, és sejteredet szerint mindhárom kategóriába sorolható DLBCL-es eseteket magába foglal (75).

Wright és munkatársai 2020-ban közzölték eredményeiket, hét szubtypusra egészítették ki az addig definiált négy alcsoportot (MCD, BN2, N1 és EZB). Ez a klasszifikációs algoritmus (LymphGen) a vizsgált kohorsz 63,1%-át tudta osztályozni (76). Az új A53 csoportba sorolt esetek *TP53* inaktivációval és aneuploiditással jellemezhetőek. Az ST2 csoportra a JAK/STAT jelátviteli út mutációi jellemzőek, ezen kívül további három gén gyakran párhuzamosan jelen levő mutációi vannak jelen: *SGK1*, *TET2*, *P2RY8*. Az ST2 klaszterbe sorolt esetek többsége centrum germinativum eredetű DLBCL. Az EZB csoportot további két altípusra osztották: EZB/MYC- és EZB/MYC+. Ez utóbbi rossz prognózissal társul és a double/triple hit (DH, TH) és transzformált folliculáris limfómának felel meg (4. ábra) (77).

A különböző kutatócsoportok által meghatározott molekuláris csoportok nem mutatnak 100%-os konkordanciát, ennek oka valószínűleg a különböző bioinformatikai analitikai módszerek alkalmazása a kutatásokban. Schmitz és Chapuy tanulmányai bizonyították, hogy a DLBCL molekuláris genetikai osztályozásának klinikai jelentősége van. A mostanában megjelent adatok alapján NGS vizsgálatok eredményeire alapozva a DLBCL-NOS 150 ismétlődő, driver mutációval jellemezhető, esetenként átlagosan ezeknek a mutációknak 8%-a van jelen (78).

Ezek a molekuláris alcsoportok egyelőre még nem szerepelnek a legújabb WHO osztályozásban (WHO-HAEM5), mivel prognózist és terápiát befolyásoló jelentőségük igazolásához további klinikai vizsgálatok szükségesek.

A molekuláris osztályozás ismerete egyrészt betekintést nyújt a DLBCL patogenezisébe, másrészt a jövőben segíthet a klinikusoknak azon betegcsoport meghatározásában, akik a standard immunokemoterápiára nem vagy nem megfelelően reagálnak, és más terápiák alkalmazására lehet szükség.



4. ábra: A DLBCL molekuláris osztályozása és az alcsoportok biológiai jellemzői (79)

1.7. DLBCL staging és restaging

A kezelés előtti stádium megállapításra és a terápia hatásosságának le mérésére az Ann Arbor klasszifikáció és a Lugano kritériumokat használjuk (80-81).

A diagnózis felállítását követően a betegség stádiumának és kiterjedésének meghatározásához, majd a terápia hatékonyságának a megítéléséhez is képalkotó vizsgálat elvégzése szükséges. Az utóbbi években magas szenzitivitása miatt a CT használatát felváltotta a ¹⁸fluoro-dezoxiglükóz (FDG) pozitron-emissziós tomográfia computer tomográfiával kombinálva (PET-CT) (82). A PET-CT a strukturális képalkotás mellett metabolikus információkat is szolgáltat, mely a tumorok fokozott glükózanyagcseréjéből

adódik. A daganat metabolikus aktivitásának jellemzésére a szemikvantitatív, ún. standard felvételi értéket (standardized uptake value, SUV) használjuk, mely megadja, hogy az adott régióban a radiofarmakon koncentrációja hányszorosa annak, mintha az egész testben egyenletesen oszlana el. A teljes metabolikus tumortömeg (total metabolic tumor volume, TMTV) és a teljes lézió glikolízis (total lesion glycolysis, TLG) a maximális SUV érték mellett további fontos szemikvantitatív paraméterek, melyek prognosztikai szerepét több tanulmány is vizsgálta (83-85).

A terápia hatékonyságának le mérésére mind az interim, mind a záró PET-CT-n a Deauville 5 pontos skála alkalmazása javasolt, a máj és a mediasztinális vérpool aktivitását alkalmazva referencia értéknek. A Deauville score 1-2-3 komplett metabolikus választ jelez (82). A SUVmax érték százalékos csökkenése (delta SUVmax) egy szemikvantitatív paraméter, mely alkalmas a beteg prognózisának becslésére. Egy vizsgálat adatai szerint a 67,5 %-os delta SUVmax a cut off érték, mely a jó és rossz prognózisú betegeket elkülöníti (87).

2-4 ciklus kezelés alkalmazása után készült interim PET-CT eredmény prognosztikai szerepe ellentmondásos.

Munkacsoportunk (Ritter és mtsai.) 85 DLBCL-es beteg két központban készült staging PET-CT vizsgálatából nyert in vivo radiomikai és klinikai adatainak a prognosztikai jelentőségét vizsgálta. A követés során a 2 éves eseménymentes túlélést jelölték meg klinikailag releváns végpontnak, mely 64,7 %-nak bizonyult. Chi² teszt segítségével vizsgálták a klinikai jellemzők és a progresszió összefüggéseit. Eredményeik szerint a 2 éven belül progrediáló betegcsoporton belül szignifikánsan nagyobb arányban voltak jelen magas IPI-vel és stádiummal jellemzett, illetve a non-GCB csoportba sorolt betegek. Automatizált gépi tanulás segítségével egy kétéves eseménymentes túlélést előrejelző modellt hoztak létre. A túléléssel szignifikáns összefüggést mutató radiomikai paraméterek: a tumor maximális átmérője, a TMTV, TLG és két, a tumor heterogenitását jelző érték. A SUVmax és a klinikai paraméterek kevésbé voltak prediktívek az EFS24 tekintetében (9).

A csontvelő érintettség aránya DLBCL-ben 15-20%, és kedvezőtlen kimenetelt jelez (86).

Amennyiben a staging képalkotó vizsgálat PET-CT, és nincs vérkép eltérés, a csontvelő vizsgálat nem kötelező. A PET-CT találati aránya a csontvelőben 75% körüli, alacsony tumortömeg esetén adhat álnegatív eredményt.

Mostanában a keringő tumor DNS mérése ígéretes és aktívan vizsgált módszer a kezelésre adott válasz felmérésében (88).

1.8. A DLBCL kezelése

1.8.1. A DLBCL standard kezelése

Diagnóziskor a betegség pontos altípusának meghatározása a WHO legújabb, 2023-ban megjelent klasszifikációja alapján fontos, a kezelést is meghatározó tényező. Az esetek kb. 80%-a sorolható a diffúz nagy B-sejtes limfóma, NOS kategóriába. A DLBC, NOS standard, első vonalbeli kezelése hazánkban továbbra is az R-CHOP immunokemoterápia. Ezzel a terápiával a betegek 50-60%-a meggyógyítható (79).

Diagnóziskor meg kell határozni a CNS-IPI-t is a központi idegrendszeri érintettség megítélésére. Ez a rizikó becsülő skála az IPI 5 paraméterén kívül a vese- és mellékvese érintettséget tekinti további rizikó tényezőnek. Azoknál a betegeknél, akik magas rizikójúak, koponya MRI elvégzése, liquor citológia és áramlási citometria javasolt (89).

Annak ellenére, hogy 5 randomizált tanulmány közül egyik sem erősítette meg a szisztémás vagy intratekális profilaxis hatékonyságát, az NCCN és az ESMO (European Society for Medical Oncology) irányelvek továbbra is javasolják alkalmazásukat magas rizikójú betegek esetében (90).

Azokban az esetekben, amikor FISH vizsgálattal *MYC* és *BCL2* és/vagy *BCL6* gén átrendeződés azaz double vagy triple hit limfóma (DHL, THL) igazolódik (ezek a WHO 2016-os klasszifikációja alapján az ún. high-grade B-sejtes limfómák *MYC* és *BCL2* és/vagy *BCL6* átrendeződéssel), az R-CHOP kezelés nem elég hatékony, dózis-korrigált (dose-adjusted) R-EPOCH (rituximab, etopozid, prednizolon, vinkrisztin, ciklofoszfamid) kezelés javasolt (91).

A *MYC* átrendeződéssel járó DLBCL-es esetek túlélése kedvezőtlenebb R-CHOP terápiát követően összehasonlítva a *MYC* átrendeződésre negatív esetekhez képest (49).

Egy multicentrikus, fázis II tanulmány a lenalidomid kezelés hatékonyságát igazolta *MYC* átrendeződéssel járó esetekben az R-CHOP kezeléshez első vonalban hozzáadva (92).

Az esetek kb. 30%-a sorolható a diagnóziskor I-és II-es stádiumba. Ilyen korai stádiumú betegség esetén (ha nem bulky tumorról van szó, azaz a tumor átmérő <7,5 cm) 3 ciklus R-CHOP és irradiáció vagy 4 ciklus R-CHOP is elegendő lehet, amennyiben az interim PET CT komplett remissziót jelez. A betegek kb. 70%-a előrehaladott stádiumú (III-IV) a diagnóziskor, ezekben az esetekben 6 ciklus R-CHOP kezelés javasolt.

A betegek 10-15%-a primer refrakter az elsővonalbeli R-CHOP kezelésre (nem kerül komplett remisszióba vagy 6 hónapon belül relabál), és 20-25 % azoknak az aránya, akik a kezdeti jó reagálás után 2 éven belül visszaesnek (11).

A relabált vagy refrakter betegek kb. 50%-a alkalmas autológ hemopoetikus őssejt transzplantációra, ők általában platina alapú mentő terápiát kapnak, ezek a következő protokollok: R-DHAP (rituximab, dexametazon, citarabin, ciszplatin) R-ICE (rituximab, ifoszfamid, carboplatin, etopozid), R-GDP (rituximab, gemcitabin, dexametazon, ciszplatin). Amennyiben a PET CT alapján reagáltak a mentő kezelésre, szintén kb. a betegek 50%-a, akkor autológ hemopoetikus őssejt transzplantáció elvégzése javasolt. A gyógyulása arány 25-35% körüli (93). Az autológ hemopoetikus transzplantációra nem alkalmas vagy utána relabáló és a mentő kezelésre refrakter betegek további kezelése már individuális.

Az allogén hemopoetikus őssejt transzplantáció is lehet kuratív, amikor az autológ transzplantáció nem hoz gyógyulást. Ugyanakkor a magas transzplantációval kapcsolatos mortalitás miatt az innovatív gyógyszerek megjelenésével párhuzamosan egyre jobban háttérbe szoruló terápiás lehetőség (79).

Megemlíthető terápiás modalitás még a radoimmunoterápia (RIT). A leggyakrabban használt a ⁹⁰Yttrium-jelölt ibritumomab tiuxetan (⁹⁰YIT), ami egy egér eredetű anti-CD20 monoklonális antitest a radioaktív, béta sugárzó ⁹⁰yttriummal kombinálva. A jelenleg érvényben lévő ESMO irányelvei között nem szerepel a RIT a DLBCL terápiás lehetőségei között. Munkacsoportunkkal az Egyesült Arab Emírségek limfóma regisztere alapján a regionális kórházak 2004 és 2008 között diagnosztizált ⁹⁰YIT kezelésben részesült betegeinek eredményeit elemeztük egy retrospektív, egykarú, kohorsz vizsgálat keretein belül. A kezelés indikációs köre messze szélesebb volt az FDA által elfogadottnál az ASCT korlátozott elérhetősége miatt. Non-Hodgkin limfómával 111 beteget regisztráltak ebben az időszakban, közülük 54 részesült ⁹⁰YIT kezelésben, az alábbi indikációkban: korai stádiumú (I-II), nem bulky, indolens B-sejtes NHL, szisztémás rituximab tartalmú immunokemoterápia után relabáló folliculáris limfóma, folliculáris limfómából átalakult agresszív limfóma, szisztémás rituximab tartalmú immunokemoterápia után relabált DLBCL. A másod- vagy többedvonalban kezelt (nagyraészt DLBCL-es) betegeknél a median EFS 33 hónapnak bizonyult. Eredményeink hasonlóak a más vizsgálatokban leírt adatokhoz elfogadható mellékhatás profil mellett (94).

1.8.2. Új terápiás lehetőségek

A CAR-T (kiméra antigén receptor-T) sejtes kezelés jelentős paradigmaváltást eredményezett a refrakter és relabált betegek terápiáját tekintve. A CAR-T-sejtek gén módosított autológ T-sejtek, melyek targetje legtöbb esetben a CD19 sejt felszíni antigén. A pivotális vizsgálatokban relabált vagy refrakter DLBCL-es betegeknél az axicabtagene ciloleucel, a

tisagenlecleucel és a lisocabtagene maraleucel 52-82%-os teljes válaszarányt és 40-54%-os komplett remissziót eredményezett (95-97). A liso-cel és az axi-cel másodvonalon is törzskönyvezésre került. Jelenleg Magyarországon csak klinikai vizsgálat keretein belül érhető el a kezelés. Az autológ transzplantációt kiváltó szerepe is igazolást nyert.

A polatuzumab vedotin, egy toxin-konjugált antitest, targetje a CD79b, a B-sejt receptor komplex alkotója. Transzplantációra alkalmatlan betegek kezelésére elfogadásra került rituximabbal és bendamustinnal kombinálva (98).

A tafasitamab egy humanizált citolitikus CD19-ellenes antitest, lenalidomiddal kombinálva hatékonyak bizonyult transzplantációra alkalmatlan betegek kezelésére (99).

Toxin-konjugált antitest a loncastuximab tesirine is: humanizált anti-CD19 monoklonális antitest a citotoxikus pyrrolobenzodiazepin dimerhez (PBD) kapcsolva. A pivotális vizsgálatban relabált vagy refrakter DLBCL-es betegeket vontak be, akik már legalább két vonalbeli kezelésben részesültek, és legalább egy évig kapták a kezelést. A teljes válasz arány 48% volt, és a betegek 24%-ánál sikerült komplett remissziót elérni (100).

A bispecifikus antitestek (BiTe) targetjei a tumorsejtek és a T-sejtek, sejtmediált citotoxicitást eredményeznek. Az anti CD19 blinatumomab volt az első lymphomában alkalmazott BiTe terápia. Egy fázis 2 tanulmányban relabált/refrakter betegek esetében a teljes válasz arány 43% volt 19%-os komplett remisszió mellett. Súlyos, a terápia leállítását eredményező neurológiai mellékhatás az esetek 22%-ában lépett fel (101).

A glofitamab és az epcoritamab targetjei a CD3 és a CD20 antigének, a válaszarány meggyőző többedik kezelési vonalban is (102-103). A mosunetuzumab (anti-CD20/CD3) fázis 1 tanulmányban hatékonyak bizonyult relabált vagy refrakter betegek esetében, akik átlagban már 3 korábbi terápiás vonalban részesültek, és a betegek egy része CAR-T sejtes kezelésem is túl volt (104).

Az apoptózist célzó BCL2-gátló venetoclax, a B-sejt receptor jelátvitelt gátlók (Bruton tirozin kináz gátló ibrutinib és a lenalidomid) és az epigenetikai regulátorok (EZH2-gátló tazemetostat) monoterápiában kevésbé hatékonyak relabáló vagy refrakter betegségben, de a kombinációs kezelésekkel számos klinikai vizsgálat van folyamatban (105-108).

2. Célkitűzések

Kutatásunk céljaként a PTE Pathológiai Intézetben diagnosztizált, az ország különböző centrumaiban kezelt DLBCL-es betegek szövettani anyagainak immunhisztokémia és interfázis FISH vizsgálatát tűztük ki. A rendelkezésünkre álló, formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetblokkokból DNS és RNS izolálást terveztünk más munkacsoport által végzendő, next generation sequencing (NGS) alapú genomikai és NanoString alapú expressziós profil vizsgálatokhoz.

A patológiai vizsgálatokkal párhuzamosan a betegek klinikai és túlélési adatainak feldolgozását terveztük. Vizsgálatunk fő célja, hogy értékeljük az IPI és a molekuláris biomarkerek szerepét, ezek segítségével klinikailag könnyen alkalmazható prognosztikus modellt hozunk létre az eseménymentes és teljes túlélés becslésére.

Célul tűztük ki, hogy a kombinált immunhisztokémiai, iFISH és expressziós profil adatok alapján a DLBCL-en belül homogén betegcsoportokat hozunk létre. Ezen csoportok klinikai stádium, IPI score és túlélési adatait statisztikailag hasonlítjuk össze a prognosztikai csoportok meghatározása érdekében. A fenotípus adatokat összevetjük a klinikai stádium és monitorizálási adatokkal. Célunk volt, hogy az immunhisztokémiai adatokat felhasználva a Hans algoritmust követve meghatározzuk a vizsgált populációban a GCB és a non-GCB szubtípusba tartozó DLBCL-es betegek arányát, meghatározzuk a prognózisukat, és összevetjük a klinikai adatokkal, illetve összehasonlítjuk az eredményeinket a nemzetközi kutatási eredményekkel.

A DLBCL-es betegek 30-40%-a a jelenlegi terápiákkal nem gyógyítható meg. Vizsgálatunk vezérelve a túlélést leginkább meghatározó biomarkerek azonosításának igénye volt. Célunk a betegséget fenotípus- és genotípus szinten meghatározó tényezők pontosabb megismerése.

Vizsgálatainkkal a betegség komplex patomorfológiai, fenotípus, citogenetikai, expressziós profil, szignál transzdukciós, mutációs, valamint klinikai prognosztikai monitorizálását kívántuk elvégezni.

3. Anyag és módszer

Jelen kutatási programban a PTE Pathológiai Intézetben 2010 január és 2017 március között diagnosztizált és az ország hét különböző hematológiai centrumában kezelt DLBCL-es betegek anyagait vizsgáltuk a „DLBCL Nemzeti Innovációs Onkogenomikai és Precíziós Onkoterápiás Program” keretein belül. A multicentrikus, retrospektív kohorsz vizsgálatot a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Regionális Kutatásetikai Bizottsága (RIKEB) és az Egészségügyi Tudományos Tanács Kutatásetikai Bizottsága (ETT TUKEB) az 50268-8/2017 szám alatt fogadta el.

3.1 Minták

Retrospektíve összesen 342 DLBCL-es beteg diagnosztikus, kezeletlen, formalinban fixált, paraffinba ágyazott blokkját vizsgáltuk. A 342 esetből 95-öt kizártunk hiányos klinikopatológiai adatok miatt, így összesen 247 beteg eredményeit értékeltük tovább a vizsgálatban.

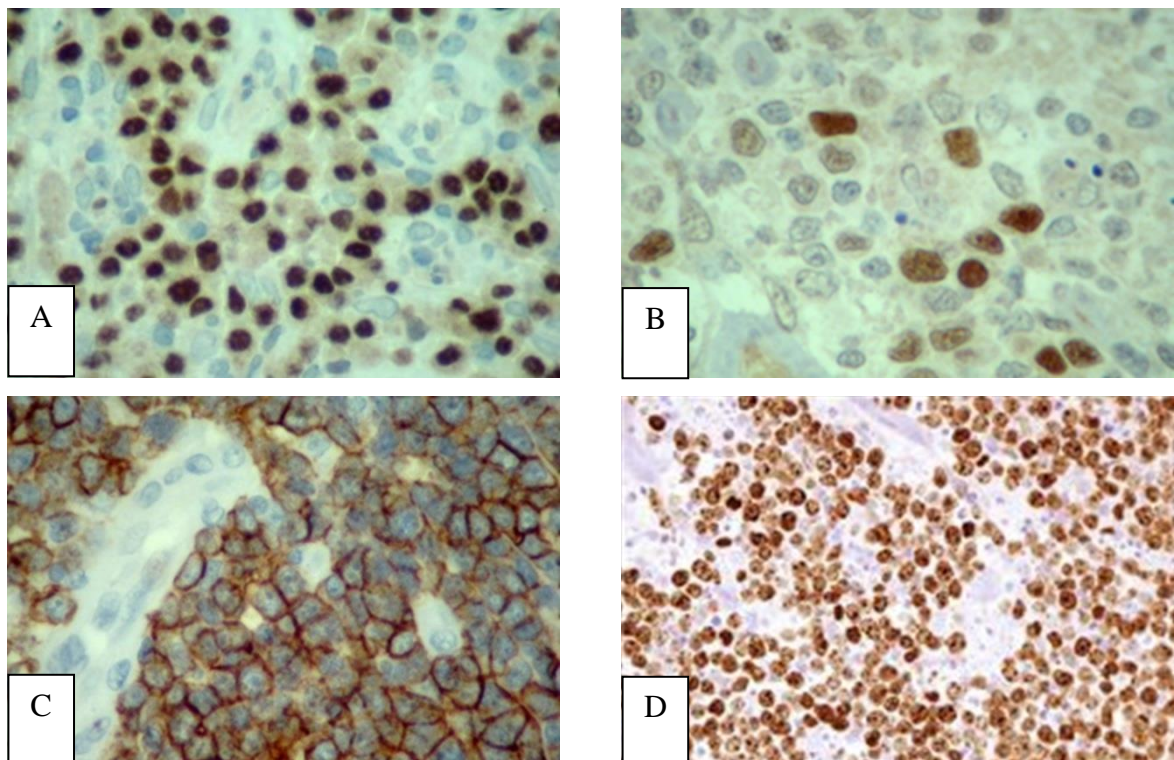
Minden mintát két tapasztalt patológus véleményezett. A végleges patológiai eredmény a vizsgálatunk alatt érvényben lévő érett B-sejtes limfómák 2016-os WHO klasszifikáció diagnosztikus kritériumai alapján került megállapításra (52). Jelen tanulmányunk tárgyát a DLBCL-NOS (not otherwise specified, máshova nem osztályozott) csoportba tartozó betegségek képezték. A Burkitt limfóma eseteket a WHO meghatározás alapján kizártuk. A ritka és szubjektív morfológiai jegyek alapján véleményezett, ún. diffúz magas malignitású B-sejtes limfóma (HGBL) esetek a tanulmányban részt vettek.

A vizsgálatba bevont DLBCL-es beteg diagnosztikus, kezeletlen, formalinban fixált, paraffinba ágyazott blokkján a tumor fenotípus stratifikációja és proliferációs jellemzése történt meg CD10, CD20, BCL2, BCL6, MUM1, MYC és MIB1/Ki-67 markerekkel immunhisztokémiai eljárással. A vizsgált kohorsz szövettani blokkjait interfázis citogenetikával *IGH::MYC*, *IGH::BCL2*, *BCL6* génátrendeződésekre, valamint *MYC*, *BCL2* és *BCL6* gén nyeresre vizsgáltuk. A formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetblokkokból DNS-t izoláltunk más munkacsoport által végzendő, next generation sequencing (NGS) alapú genomikai vizsgálatokra. A FFPE blokkokból RNS-t izoláltunk. Ebből expressziós profil vizsgálatok történtek kollaborációban, NanoString technológiával, Pan CancerProgression / SignalPathway platformoknak megfelelően vagy sense / antisense NGS eljárással. 173 mintában volt genom expressziós profil (GEP) vizsgálat elvégezhető.

3.2. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a standard protokollnak megfelelően CD10, 56C6 klón; CD20, L26 klón (Visionbiosystems Novocastra, UK); MUM1/IRF4, MUM1p klón; BCL2, 124 klón; BCL6, PG-B6p klón (Dako, Dánia); MYC, Y69 klón (Abcam, UK); Ki-67, B56 klón (Hisztopatológia Kft., Magyarország) specifikus primér antitesteket, valamint Envision+ System-130 HRP (DakoCytomation, Dánia) és Bond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems, UK) előhívó reagenseket használtunk (5. ábra).

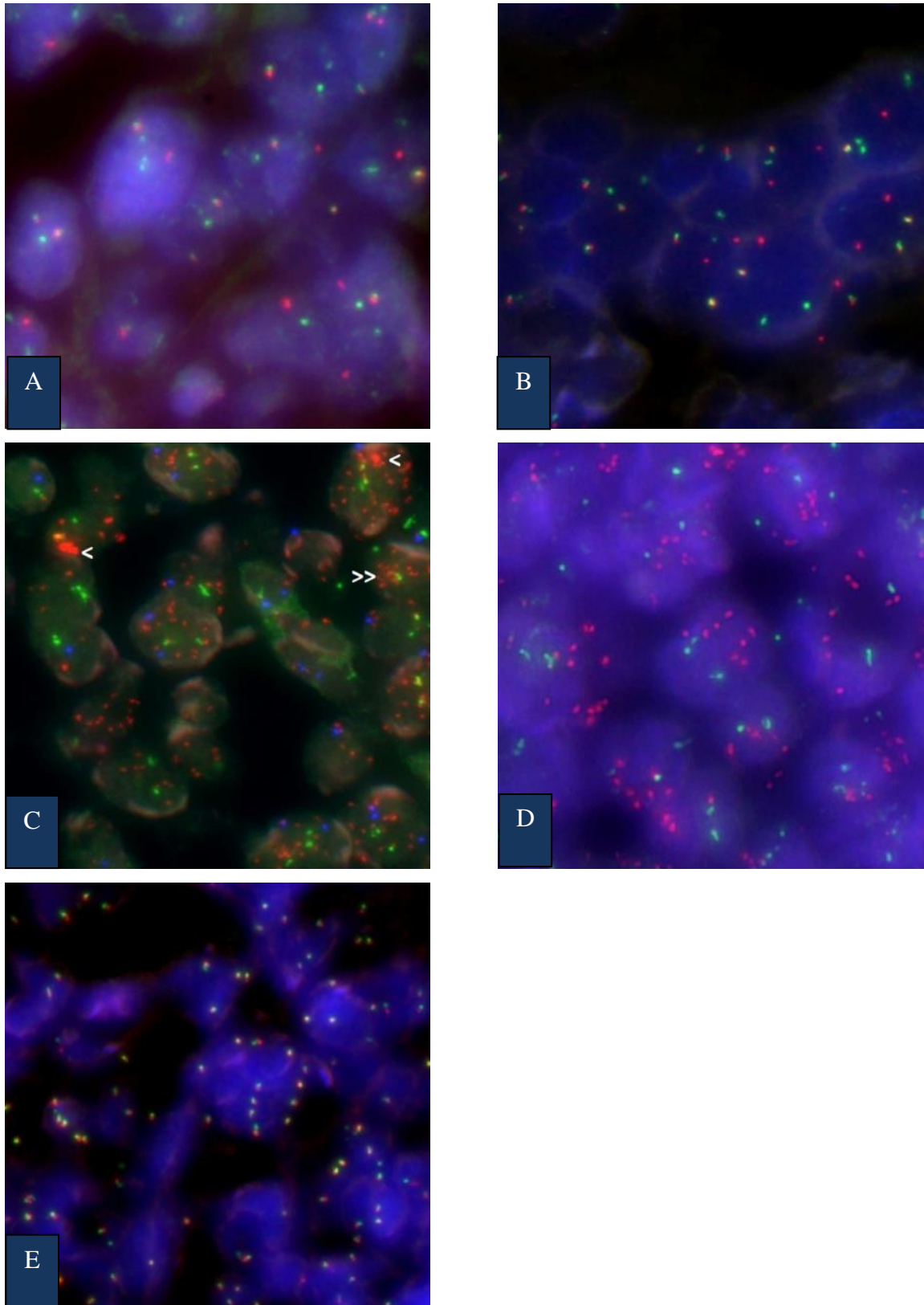
A Hans algoritmus szerint pozitívnak tekintjük a tumort egy adott markerre, ha legalább 30%-os membrán vagy intracitoplazmatikus pozitivitást mutat. A GCB altípusba soroljuk a tumort, ha CD10+ (BCL6+/-, MUM1+/-) illetve, ha CD10-, BCL6+, MUM1- fenotípust mutat. Minden más fenotípust (CD10-, BCL6+, MUM1+ vagy CD10-, BCL6-, MUM1+) a non-GCB csoportba sorolunk (26). A dupla expresszor limfóma (DEL) definíciója a kombinált MYC ($\geq 40\%$) és BCL2 ($\geq 50\%$) immunhisztokémiai pozitivitás (109).



5. ábra: Immunhisztokémiai reakciók. A: MUM1 pozitívítás a sejtmagban, B: BCL6 expresszió, C: CD10 pozitív DLBCL, D: MIB1 festés- magas proliferációs index (Dr. Pajor László anyagából)

3.3. Interfázis FISH vizsgálatok

A paraffinba ágyazott blokkok 5µm-es metszetein a DLBCL-ben ismert leggyakoribb genetikai eltéréseiket detektáltuk interfázis fluoreszcens in situ hibridizációs eljárással. Fluoreszcens szondával a következő génmutációkat vizsgáltuk: *IGH::MYC*, *IGH::BCL2*, *BCL6* génátrendeződés, valamint *MYC*, *BCL2* és *BCL6* gén nyerés. Ehhez Vysis *IGH/MYC/CEP8 TC-DF*, Vysis *LSI BCL6 (ABR) DC Break Apart* szonda készleteket (Abbott Molecular Inc., USA) használtunk. A FISH reakciók eredményeit Zeiss Axioplan-MOT II fluoreszcens mikroszkópban értékeltük ki „grid sampling” és „color rationing” módszerekkel (110). Az *IGH::BCL2* és az *IGH::MYC* átrendeződésüket dupla fúziós FISH szondákkal vizsgáltuk, mivel a non-*IGH::BCL2* átrendeződés ritka DLBCL-ben, a non-*IGH::MYC* fúzió prognosztikai jelentősége pedig nem egyértelmű. A non-*IGH::BCL2* és a non-*IGH::MYC* fúziók jelmintázata *BCL2* vagy *MYC* gén nyerésként mutatkozott a vizsgálati anyagunkban. Átrendeződésre pozitívnak értékeltük a tumort *IGH::MYC*, *IGH::BCL2* és *BCL6* szonda esetén, ha a fúziós vagy a disszociált FISH jel a sejtmagok legalább 50%-ában megjelent. A *MYC*, *BCL2* és *BCL6* nyerés definíciója magában foglalja a releváns kromoszóma poliploiditásának a hiányát és/vagy legalább egy géntöbblet kimutathatóságát a sejtmagok legalább 50%-ában, illetve „dupla parányok” („double minutes”) és/vagy „gyöngyfűzészerű jelek” („beaded lace-like”) és/vagy megszámlálhatatlan (homogénean festődő régió- „HSR vagy felhőszerű- „cloudy-like”) jelölődés jelenlétét (6. ábra).



6. ábra: Típusos iFISH jel mintázatok. A: *MYC*-piros (P), *IGH*-zöld (Z) jel, *IGH::MYC* átrendeződés-sárga fúziós jel; B: *BCL6* telomerikus 3q27 régió P jel, centromerikus 3q27 régió Z jel, intakt *BCL6* gén-kolocalizált szignálok, *BCL6* gén törés-önálló Z / P jelek; C: *MYC* (P), *IGH* (Z), CEP8-Aqua (A), ~9-szeres P/Z illetve P/A arány (kb. 16 *MYC* géntöbbslet),

< homogéneen festődő régió – HSR, << felhőszerű iFISH jelölődés; D: *BCL2* P jel, *IGH* Z jel, ~ 3.5-szörös P/Z amplifikáció (~ 5 *BCL2* géntöbblet), E: ~ 4-szeres P-Z kolokalizált jel / mag (~ 6-szoros *BCL6* géntöbblet), telomerikus 3q27 régió Z jel, centromerikus 3q27 régió P jel; D és E gyöngyfűzér szerű iFISH jel mintázat – intrakromoszómális gén sokszorozódás (111)

3.4. Klinikai adatgyűjtés

A betegek részletes klinikai és laboratóriumi eredményeit a kórlapokból gyűjtöttük ki. A betegek vizsgált klinikai adatai a következők voltak: életkor a diagnózis idején, a beteg neme, LDH érték a diagnózis idején, IPI érték, általános állapot ECOG szerint, túlélési adatok (teljes túlélés: overall survival - OS, eseménymentes túlélés: event-free survival - EFS, 24 hónapos eseménymentes túlélés - EFS24) és az alkalmazott terápiák. Az első vonalbeli kezelés az esetek döntő többségében R-CHOP volt, egy-egy egyedi esetben alkalmaztak ettől eltérő terápiát, ezek között szerepel: R-DHAP, ofatumumab-DHAP, alemtuzumab-CHOP, R-GEMOX (rituximab, gemcitabin oxaliplatin), R-EPOCH (rituximab, etoposid, prednizon, vinkrisztin, ciklofoszfamid, hidroxidaunorubicin), R-CEOP (rituximab, ciklofoszfamid, etopozid, vinkrisztin, prednizon).

Az adatokat tapasztalt hematológus tekintette át. A betegség stádiumot a módosított Ann Arbor és Lugano klasszifikáció alapján állapítottuk meg (81). A komplett remissziót (CR), a parciális választ (PR), a refrakter betegséget, és a relapszust a módosított Cheson-féle kritériumok alapján határoztuk meg. Az EFS definíciója az az idő, ami a kezelés végétől a betegség progressziójáig vagy bármilyen okból bekövetkezett halál idejéig eltelt. Az EFS24 azt jelenti, hogy a beteg a terápia végétől számított 24 hónap múlva is él és minden betegséggel kapcsolatos eseménytől mentes.

3.5. Statisztikai módszerek

A klinikai változók közötti összefüggés megállapítására, valamint a fenó- és genotípus paraméterek megoszlásának vizsgálatára χ^2 tesztet használtunk. Egyváltozós túlélési analízisre a Kaplan-Meier görbét használtuk medián túlélés meghatározással (95 %-os konfidencia intervallummal: CI) és a log-rank próbát alkalmaztuk. A többváltozós Cox-féle regressziószámítást használtuk a túlélés (OS és EFS) független prognosztikai faktorainak meghatározására. Ezek a következők voltak: klinikai adatok (nem és az IPI kategória), immunhisztokémiai eredmények (CD10, *BCL2*, *BCL6*, MUM1 pozitivitás, 90 % feletti MIB-1 expresszió) és a leggyakrabban előforduló genetikai eltérések FISH módszerrel vizsgálva (*BCL6* transzlokáció és *BCL2* nyeres). Általánosan a $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag

szignifikánsnak. A statisztikai analízishez az R statistical software version 4.2.0 (112) és a survminer package v0.4.9 statisztikai szoftvert használtuk (113).

4. Eredmények

4.1. Klinikai jellemzők

Az 1. táblázat foglalja össze a vizsgálatba bevont 247 beteg klinikai adatait. Az átlag életkor a diagnóziskor 65 év volt (életkori tartomány:19-91 év), a betegek 65,2%-a (161/247) volt 65 év feletti, 46,6% (115/247) férfi és 42,9%-ának (106/247) mértek a diagnóziskor emelkedett LDH értéket. Az IPI csoportok megoszlása a következő volt: IPI 0-1 a betegek 23,5%-a (58/237), IPI 2 a betegek 27,9%-a (69/247), IPI 3 volt a betegek 34,4 %-a (85/247), IPI 4-5 az esetek 14,2%-a (35/247). A betegek majdnem fele, 46,2%-a (114/247) általános állapotát tekintve ECOG 2-4-es volt. A vizsgált betegeknek 74,1%-ánál előrehaladott stádiumot (III-IV) állapítottunk meg a diagnóziskor, mely az irodalmi adatokkal összehasonlítva magasabb arányt jelent. Nodális megjelenésű DLBCL-t az esetek 74,9%-ában (185/247) dokumentáltunk, míg az extranodális betegség aránya 25,1 %-nak (62/247) bizonyult. A páciensek többsége (94,7%) R-CHOP vagy hasonló kezelést kapott első vonalban. A leggyakoribb mentő protokollok az R-ICE és az R-DHAP voltak.

1. táblázat: A betegek klinikai jellemzői

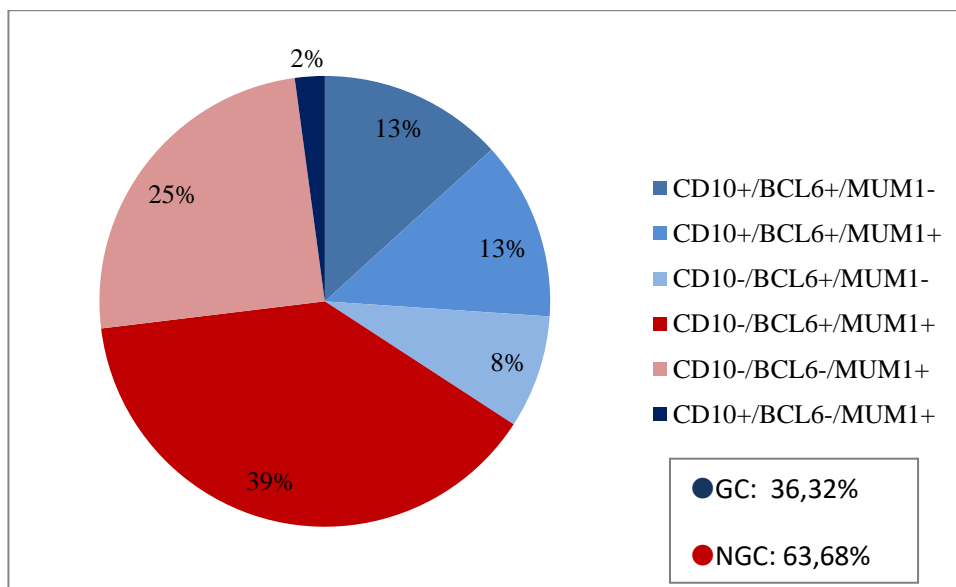
| | n | % |
|---------------------|-----|----|
| Kor (év) | | |
| ≤ 60 | 86 | 35 |
| > 60 | 161 | 65 |
| Nem | | |
| Férfi | 115 | 47 |
| Nő | 132 | 53 |
| IPI | | |
| 0–1 | 58 | 24 |
| 2 | 69 | 28 |
| 3 | 85 | 34 |
| 4–5 | 35 | 14 |
| Megjelenés | | |
| Nodális | 185 | 75 |
| Extranodális | 62 | 25 |
| Stádium | | |
| I-II | 64 | 26 |
| III-IV | 183 | 74 |
| ECOG státusz | | |
| 0–1 | 133 | 54 |
| 2–4 | 114 | 46 |
| LDH | | |
| Normál | 141 | 57 |
| Emelkedett | 106 | 43 |

4.2. Immunhisztokémia eredmények

A Hans algoritmust felhasználva, CD10, BCL6 és MUM1 markerek segítségével a sejteredet alapján a következő csoportokat határoztuk meg:

- 1: CD10+/BCL6-/MUM1- 0 GC GCB1
- 2: CD10+/BCL6+/MUM1- 31 GC GCB1
- 3: CD10+/BCL6+/MUM1+ 30 GCx GCB1

- 4: CD10-/BCL6+/MUM1- 19 GC GCB2
 5: CD10-/BCL6+/MUM1+ 91 NGCx non-GCB2
 6: CD10-/BCL6-/MUM1+ 58 NGC non-GCB1
 7: CD10+/BCL6-/MUM1+ 5 GCx GCB-1



7. ábra: Immunfenotípusos megoszlás a Hans algoritmus szerint a vizsgált DLBCL-es betegek immunhisztokémiai adatai alapján (n=234)

A non-GCB eredetű DLBCL aránya 63,7 % (149/234 eset) volt, a GCB eredetű alcsoport aránya pedig 36,3% (85/234 eset) (7. ábra). A Hans algoritmus alapján publikált más tanulmányok eredményeivel összehasonlítva a mi vizsgált beteganyagukban a GCB limfóma gyakorisága alsó tartomány körüli, még jelentős non-GCB limfóma túlsúlyt tapasztaltunk (114-115).

A Hans besorolás ebben a tanulmányban megbízhatónak bizonyult, mivel más munkacsoport által GEP vizsgálat során azonosított, differenciáltan expresszált gének, valamint a Hans klasszifikáció alapján a DLBCL esetek 82,6%-ban azonos besorolást nyertek (111).

A Hans algoritmus alapján meghatározott alcsoport és a GEP vizsgálatok közötti különbséget magyarázza az a tény, hogy a DLBCL esetek 15-20%-a GEP vizsgálatnál nem osztályozható kategóriába tartozik, és ezeket az eseteket immunhisztológiával sem lehet besorolni (109).

A 2. táblázat foglalja össze az immunhisztokémia eredményeinket és ezek megoszlását a Hans-féle sejteredet szerint. Összesen 234 betegnek volt értékelhető IHC eredménye. A MYC, BCL2, BCL6 és MUM1 protein expresszió aránya 52,1%, 66,2%, 72,6% és 78,6 %

volt. A DEL (MYC és BCL2 koexpresszió) aránya a vizsgált anyagunkban 33,3% volt, és nem fordult elő szignifikánsan gyakrabban a non-GCB altípusban (P=0,112).

MIB-1 antitesttel meghatározott magas proliferációs indexet (>90%) 26,2%-ban találtunk. A BCL6 fehérje expresszió szignifikánsan gyakrabban fordult elő a magasabb proliferációs aktivitással (>90%) jellemezhető esetekben (82,5% vs 69,6%, p=0,047).

2. táblázat: Immunhisztokémiai eredmények a GCB és non-GCB alcsoportokban

| | GCB, n (%) | NGC, n (%) | GCB + NGC, n (%) |
|-------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------------|
| MYC | | | |
| Negatív | 40 (47) | 72 (48) | 112 (48) |
| Pozitív | 45 (53) | 77 (52) | 122 (52) |
| BCL6 | | | |
| Negatív | 6 (7) | 58 (39) | 64 (27) |
| Pozitív | 79 (93) | 91 (61) | 170 (73) |
| MUM1 | | | |
| Negatív | 50 (59) | 0 | 50 (21) |
| Pozitív | 35 (41) | 149 (100) | 184 (79) |
| BCL2 | | | |
| Negatív | 38 (45) | 41 (28) | 79 (34) |
| Pozitív | 47 (55) | 108 (72) | 155 (66) |
| CD10 | | | |
| Negatív | 19 (22) | 149 (100) | 168 (72) |
| Pozitív | 66 (78) | 0 | 66 (28) |
| DEL | | | |
| Negatív | 62 (73) | 94 (63) | 156 (67) |
| Pozitív | 23 (27) | 55 (37) | 78 (33) |

4.3. Interfázis FISH eredmények és összefüggéseik

A 3. táblázat mutatja be az iFISH vizsgálatok eredményeit és ezek arányát az egyes COO alcsoportokban. Összesen 220 betegnek volt értékelhető FISH eredménye. FISH vizsgálattal

MYC transzlokációt 16 esetben találtunk (7,3%) és ezek mindegyike *MYC* protein pozitivitást is mutatott. A *MYC* átrendeződéshez szignifikánsan magasabb arányban társul *MYC* protein expresszió ($p < 0,001$), és gyakoribb eltérés férfiaknál ($p = 0,049$) összehasonlítva *MYC* átrendeződésre negatív esetekkel, de nem mutat összefüggést a COO altípussal ($p = 0,086$). Összesen 4 esetben (1,8%) detektáltunk *MYC* kópiaszám nyerést.

A *BCL2* transzlokációt 7,3 %-ban találtunk, és minden eset a GCB csoportba tartozott ($p < 0,001$). A *BCL2* átrendeződés nem mutatott összefüggést a *BCL2* protein expresszióval ($p = 0,194$) és nem volt szignifikáns különbség a nemek közötti eloszlásban sem ($p = 0,213$). *BCL2* kópiaszám nyerés az esetek 14,1%-ában volt jelen, és nem társult szignifikánsan gyakoribb *BCL2* protein expresszióval ($p = 0,068$), nem mutatott szignifikáns összefüggést a nemmel ($p = 0,303$) és egyik COO alcsoporttal sem ($p = 0,085$).

A leggyakoribb citogenetikai eltérés a *BCL6* transzlokáció volt, az esetek 21,4 %-ában detektáltuk, és szignifikánsan gyakrabban fordul elő a non-GCB alcsoportban (9 eset tartozott a GCB csoportba, 38 a non-GCB csoportba, 4,1% vs. 17,3%, $p = 0,006$). A *BCL6* átrendeződés nem mutatott szignifikáns összefüggést a *BCL6* protein expresszióval ($p = 0,315$) és a nemmel sem ($p = 0,693$). *BCL6* gén nyerést összesen 2 esetben találtunk.

MYC és a *BCL2* transzlokáció együttes előfordulása, ún. „double hit limfóma” 4 esetben volt jelen, és mindegyik eset a GCB csoportba tartozott. Ezek közül 2 volt DEL (*MYC* és *BCL2* proteint is expresszáló limfóma), és 2 esetben csak *BCL2* protein expressziót detektáltunk. Vizsgálati anyagunkban mindhárom gént érintő aberráció nem fordult elő.

A *BCL2* génmutációk szignifikánsan gyakrabban fordulnak elő DEL esetén összehasonlítva a non-DEL esetekkel ($p = 0,003$), de a *MYC* gén eltérései hasonló arányban fordulnak elő a DEL és non-DEL alcsoportokban ($p = 0,999$).

Megfigyeltük, hogy a magas proliferációs rátával jellemezhető (Ki67>90%) daganatok esetén szignifikánsan gyakrabban fordul elő *MYC* transzlokáció ($p = 0,005$).

3. táblázat. Interfázis fluoreszcens in situ hibridizáció eredmények a GCB és non-GCB alcsoportokban

| | GCB, n (%) | NGC, n (%) | GCB + NGC, n (%) |
|---|---------------|---------------|------------------|
| <i>IGH::BCL2</i> | | | |
| transzlokáció | | | |
| Negatív | 64 (80) | 140 (100) | 204 (93) |
| Pozitív | 16 (20) | 0 | 16 (7) |
| <i>BCL2</i> kópiaszám nyerés | | | |
| Negatív | 73 (91) | 116 (83) | 189 (86) |
| Pozitív | 7 (9) | 24 (17) | 31 (14) |
| <i>IGH::MYC</i> | | | |
| transzlokáció | | | |
| Negatív | 71 (89) | 133 (95) | 204 (93) |
| Pozitív | 9 (11) | 7 (5) | 16 (7) |
| <i>MYC</i> kópiaszám nyerés | | | |
| Negatív | 78 (98) | 138 (99) | 216 (98) |
| Pozitív | 2 (2) | 2 (1) | 4 (2) |
| <i>BCL6</i> transzlokáció | | | |
| Negatív | 71 (89) | 102 (73) | 173 (79) |
| Pozitív | 9 (11) | 38 (27) | 47 (21) |
| <i>BCL6</i> kópiaszám nyerés | | | |
| Negatív | 80 (100) | 138 (99) | 218 (99) |
| Pozitív | 0 | 2 (1) | 2 (1) |
| DHL | | | |
| Negatív | 76 (95) | 140 (100) | 216 (98) |
| Pozitív | 4 (5) | 0 | 4 (2) |

4.4. Túlélési eredmények

Az átlagos 52 hónapos követési idő (tartomány:0-131 hónap) alatt 140 beteg esetében észleltünk progressziót vagy relapszust. A kezelésre adott általános válaszarány 78,4% és a komplett remisszió aránya 47% volt. Az EFS24 56,2% volt Kaplan-Meier becsléssel meghatározva (CI:50,4-62,8%). A 108 beteg esetében, akik nem voltak eseménymentesek a kezelés végétől számított 24 hónapban, a medián teljes túlélés a progresszió után 7,1 hónapnak adódott (CI:6,5-8 hónap). Az 5-éves OS 45,4% volt (CI:39,5-52,1%).

A 4. táblázat foglalja össze a Kaplan-Meier becsléssel meghatározott túlélési adatokat (234 beteg esetében álltak rendelkezésre IHC és 220 esetben FISH eredmények). Az IPI érték és a BCL6 protein expresszió volt a teljes- és az eseménymentes túlélésnek is szignifikáns prediktora az egyváltozós analízis eredményei alapján (8-9. ábrák). A magasabb IPI érték rövidebb túléléssel társul, míg a BCL6 protein pozitivitás kedvező prognózist jelent. A MUM1 pozitivitás szignifikánsan kedvezőtlenebb eseménymentes túléléssel jár, a teljes túlélés esetében azonban nem tudtunk különbséget kimutatni MUM1 negatív és pozitív csoport között. A *BCL6* átrendeződésnek, a *BCL2* gén kópiaszám nyereségnek, az *IGH::MYC* és *IGH::BCL2* transzlokációnak nincs prognózist befolyásoló szerepe. Sejteredet szerinti alcsoportokban külön-külön is megvizsgáltuk a citogenetikai eltéréseket hordozó és arra negatív esetek túlélési eredményeit, de a túlélési különbségek az alcsoport analízis során sem bizonyultak szignifikánsnak. Eredményeink alapján a Hans algoritmus szerint meghatározott GCB és non-GCB alcsoportok teljes- és eseménymentes túlélése nem különbözik szignifikánsan (10. ábra). A GCB alcsoportba sorolt betegek 5-éves teljes túlélése 48,5% volt (CI:39-60,4%), a non-GCB alcsoportba tartozó betegek túlélése 42,6%-nak adódott (CI:35,4%-51,3%). A DEL fenotípus esetén sem volt szignifikáns OS vagy EFS különbség a non-DEL esetekkel összehasonlítva. A DEL esetek 5-éves túlélése 43,5% (CI:33,8%-56,1%), a non-DEL fenotípusú betegek 5-éves túlélése 45,3 % volt (CI:38,1%-53,8%). A GCB és non-GCB DLBCL-es betegek, illetve a DEL és non-DEL csoportba sorolt esetek túlélését megvizsgáltuk, és összehasonlítottuk korai (I-II-es) és előrehaladott (III-IV-es) stádiumok esetén is, de nem igazoltunk szignifikáns különbséget az alcsoport analízis során sem. A vizsgált DLBCL-es betegek közül mindössze 4 esetben diagnosztizáltunk double hit limfómát. A medián OS 33,8 hónapnak adódott az esetükben, de a kevés esetszámra tekintettel ez a túlélési adat statisztikai jelentőséggel nem bír.

Az 5. táblázat mutatja be 220 beteg Cox-féle regresszió analízisének eredményeit. A többváltozós számítás szerint a magas IPI érték bizonyult az OS és EFS szignifikáns

független negatív, míg a magas (>90%) MIB-1 és a BCL6 protein expresszió szignifikáns független pozitív prediktorának.

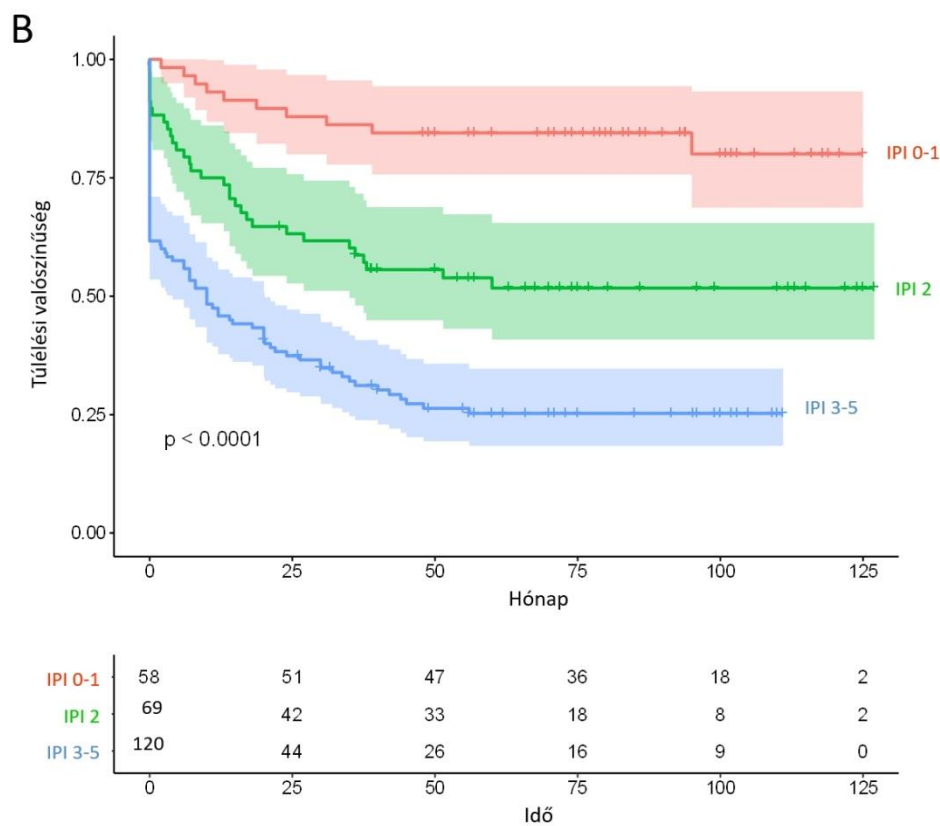
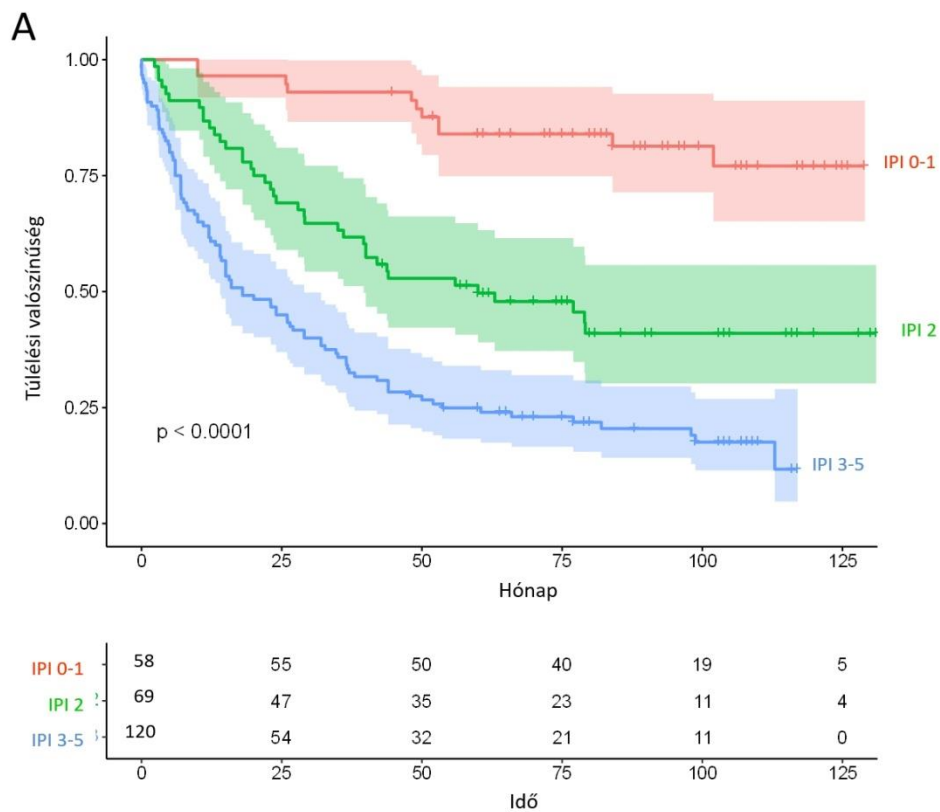
4. táblázat: Kaplan Meier és log-rank tesztek eredményei

| Teljes túlélés | | | | Eseménymentes túlélés | | |
|------------------------|-----------------------------------|---------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------|--------------------------------|
| | Medián túlélési idő (hónap) | 95% CI | p-érték (log-rank teszt) | Medián túlélési idő (hónap) | 95% CI | p-érték (log-rank teszt) |
| Nem | | | | | | |
| Férfi | 44 | 29,1– 98,8 | 0,99 | 42 | 24–n.a. | 0,65 |
| Nő | 48 | 36,5–79 | | 39 | 18,7–n.a. | |
| IPI | | | | | | |
| IPI 0–1 | n.a. | n.a. | <0,0001* | n.a. | n.a.–n.a. | <0,0001* |
| IPI 2 | 60 | 39,6–n.a. | | n.a. | 35–n.a. | |
| IPI 3–5 | 18 | 14–29 | | 10 | 4–20,2 | |
| COO alcsoport | | | | | | |
| GC | 55,9 | 43,8–n.a. | 0,34 | n.a. | 30–n.a. | 0,16 |
| NGC | 36,8 | 26–66 | | 33,7 | 15–n.a. | |
| CD10 expresszió | | | | | | |
| Negatív | 39,8 | 32–77 | 0,49 | 37,5 | 20–n.a. | 0,35 |
| Pozitív | 53 | 40–n.a. | | n.a. | 22–n.a. | |
| BCL6 expresszió | | | | | | |
| Negatív | 23 | 12,3–40 | 0,0007* | 13 | 0–35 | 0,002* |
| Pozitív | 60,5 | 44–113 | | n.a. | 38–n.a. | |
| MUM1 expresszió | | | | | | |
| Negatív | 82 | 50–n.a. | 0,054 | n.a. | 56–n.a. | 0,009* |
| Pozitív | 36,5 | 26–55,9 | | 31 | 17–95 | |
| MIB-1 index | | | | | | |
| ≤ 90% | 40 | 29–60,5 | 0,071 | 30 | 16–95 | 0,072 |
| > 90% | 77 | 32,7–n.a. | | n.a. | 36–n.a. | |

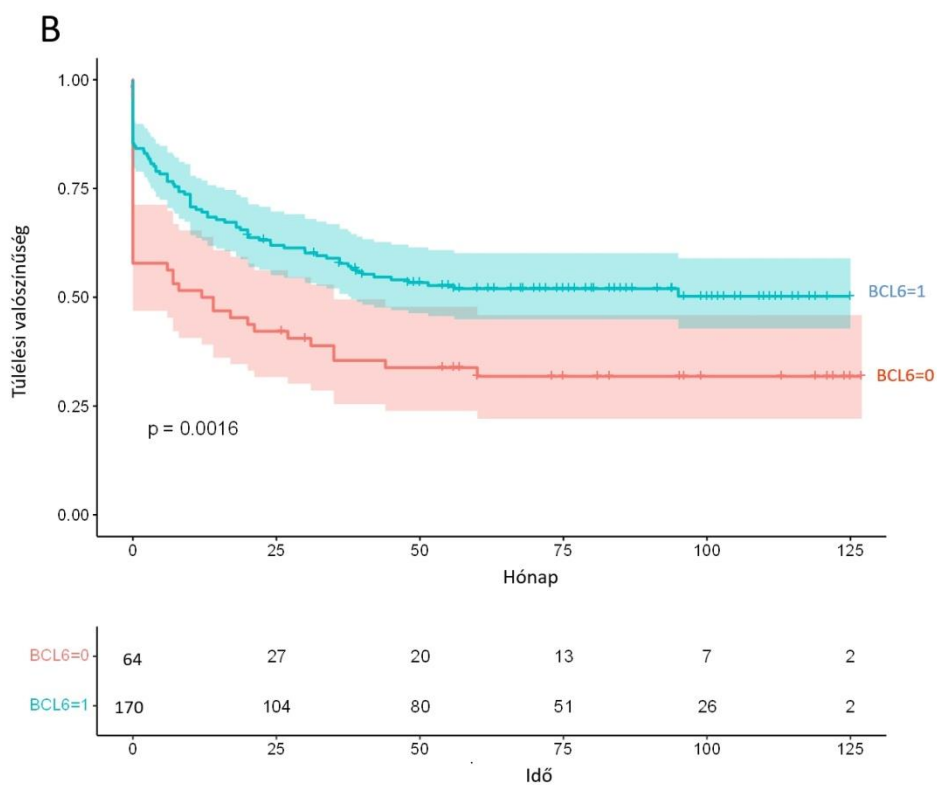
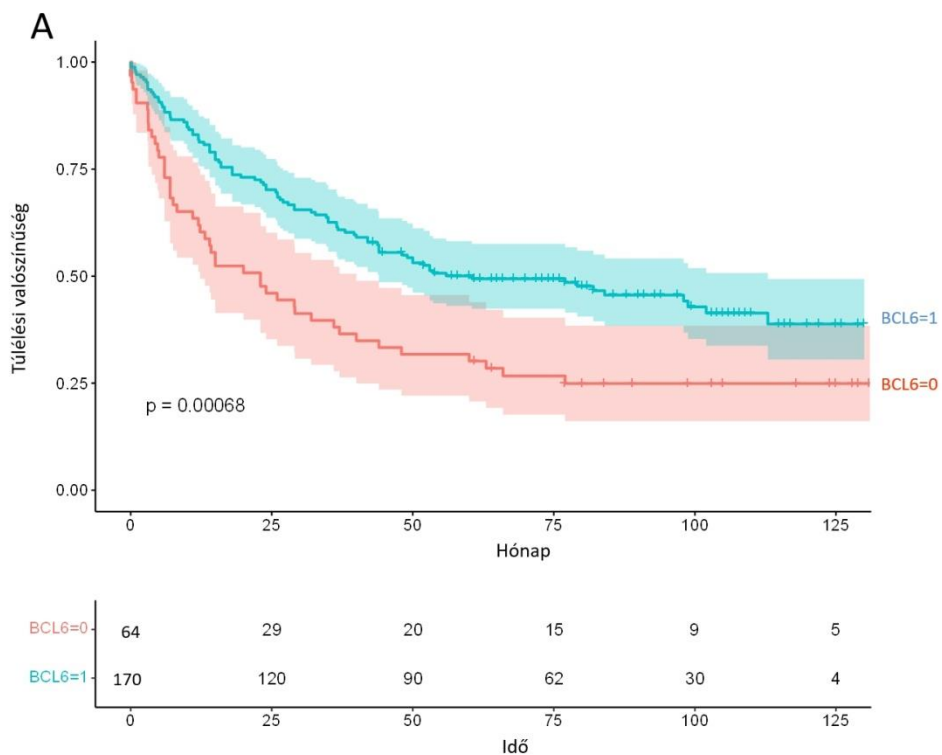
| Teljes túlélés | | | | Eseménymentes túlélés | | |
|------------------------------|-----------------------------------|-----------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------|--------------------------------|
| | Medián túlélési idő (hónap) | 95% CI | p-érték (log-rank teszt) | Medián túlélési idő (hónap) | 95% CI | p-érték (log-rank teszt) |
| MYC expresszió | | | | | | |
| Negatív | 44 | 32,7–77 | 0,8 | 37,5 | 21,2–n.a. | 0,9 |
| Pozitív | 50 | 32–102 | | 48 | 20–n.a. | |
| BCL2 expresszió | | | | | | |
| Negatív | 60,5 | 32,7–n.a. | 0,26 | 56 | 24–n.a. | 0,46 |
| Pozitív | 42 | 32–63 | | 38 | 20–n.a. | |
| BCL6 transzlokáció | | | | | | |
| Negatív | 42,9 | 32–79 | 0,66 | 39 | 22–n.a. | 0,37 |
| Pozitív | 29,1 | 15–n.a. | | 17 | 7–n.a. | |
| BCL2 kópiaszám nyeres | | | | | | |
| Negatív | 44 | 35–79,1 | 0,97 | 39 | 27–n.a. | 0,54 |
| Pozitív | 32 | 23,1–n.a. | | 18 | 9–n.a. | |

n.a: nincs adat (még nem érték el a median túlélést vagy nincs elég adat)

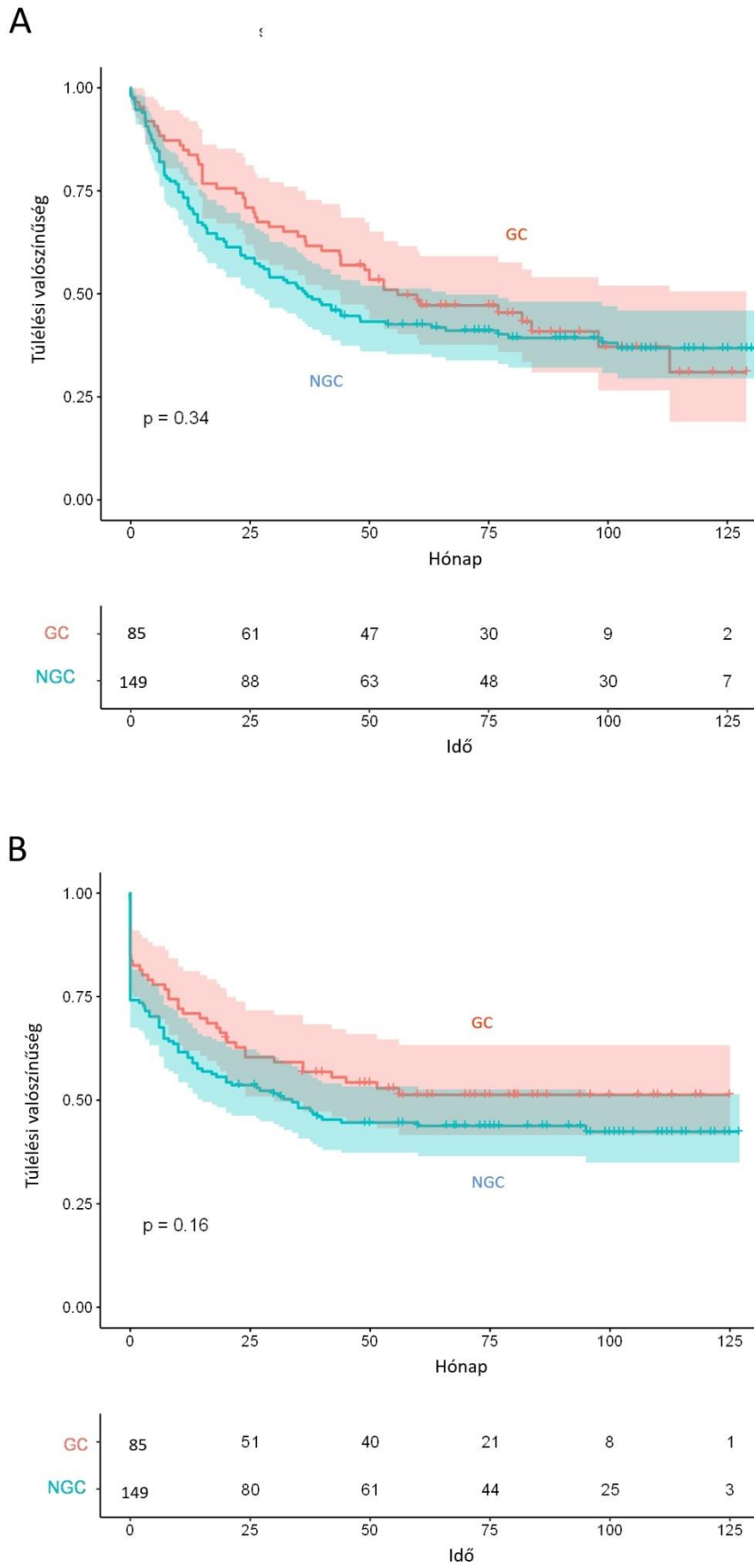
A csillaggal jelölt adatok statisztikailag szignifikánsak.



8. ábra: Teljes- (A) és eseménymentes (B) túlélés az IPI 0-1, IPI 2 és az IPI 3-5 alcsoportokban



9. ábra: Teljes- (A) és eseménymentes (B) túlélés a BCL6 pozitív és a BCL6 negatív alcsoportokban



10. ábra: Teljes- (A) és eseménymentes (B) túlélés a GC és NGC alcsoportokban

5. táblázat: Teljes- és eseménymentes túlélés Cox regresszió analízise

| | Teljes túlélés | | | Eseménymentes túlélés | | |
|----------------------------------|----------------|------------------|---------|-----------------------|--------------|---------|
| | HR | CI | P-érték | HR | CI | P-érték |
| Nem | 0,723 | 0,501–1,106 | 0,094 | 0,817 | 0,551–1,212 | 0,315 |
| IPI | | | | | | |
| IPI 1 | ref. | | | ref. | | |
| IPI 2 | 4,732 | 1,952– 11,474 | <0,001* | 3,698 | 1,502–9,106 | 0,004* |
| IPI 3–5 | 10,45 1 | 4,515– 24,193 | <0,001* | 8,600 | 3,702–19,976 | <0,001* |
| CD10 expresszió | 1,581 | 0,975–2,566 | 0,063 | 1,626 | 0,975–2,713 | 0,063 |
| BCL6 expresszió | 0,649 | 0,425–0,990 | 0,045* | 0,623 | 0,398–0,976 | 0,039* |
| MUM1 expresszió | 1,194 | 0,694–2,053 | 0,523 | 1,454 | 0,789–2,679 | 0,230 |
| MIB-1>90% | 0,581 | 0,364–0,927 | 0,023* | 0,597 | 0,367–0,971 | 0,038* |
| MYC expresszió | 1,071 | 0,724–1,585 | 0,732 | 1,141 | 0,758–1,719 | 0,528 |
| BCL2 expresszió | 0,993 | 0,656–1,503 | 0,973 | 0,952 | 0,6183–1,466 | 0,824 |
| BCL6 transzlokáció | 0,967 | 0,617–1,514 | 0,883 | 1,057 | 0,667–1,676 | 0,813 |
| BCL2 kópiaszám nyerés | 0,984 | 0,589–1,643 | 0,950 | 1,105 | 0,649–1,882 | 0,713 |

A molekuláris markereket tekintve a referencia csoport mindig a negatív. A csillaggal jelölt adatok statisztikailag szignifikánsak.

n.a: nincs adat (még nem érték el a median túlélést vagy nincs elég adat)

5. Összefoglalás

A DLBCL klinikai és genetikai heterogenitása továbbra is megnehezíti a kezelésre adott válasz és a várható prognózis előrejelzését. A limfoid neopláziák 2016-os WHO klasszifikációja kötelezővé tette a DLBCL további molekuláris osztályozását, GCB vagy ABC alcsoportba sorolását (52). Ez az irányelv a 2023-ban publikált 5. WHO kiadásban is változatlan maradt (4). A génexpressziós vizsgálatok alapján a DLBCL-es esetek 10-15%-át nem lehet sem a GCB, sem az ABC altípusba besorolni, ezek az esetek alkotják az ún. „nem osztályozható” („unclassified”) kategóriát. Jelen vizsgálatban IHC és FISH módszereket alkalmaztunk rituximabbal kezelt DLBCL-es betegek szövetmintáin, és az eredmények alapján határoztunk meg különböző alcsoportokat, beleértve a Hans algoritmus alapján meghatározott COO szubtypusokat is. Ezután számítottuk, és elemeztük az alcsoportok túlélési eredményeit. Az általunk vizsgált betegcsoportban a COO fenotípusok között nem volt szignifikáns különbség sem a teljes-, sem az eseménymentes túlélést tekintve. Ez az eredmény meglepő volt, mert korábbi vizsgálatok a GCB alcsoport szignifikánsan jobb túlélési adatait demonstrálták (116-118).

A COO besorolás prognosztikai értéke azonban továbbra is ellentmondásos, más kutatócsoportok - a mi eredményeinkhez hasonlóan – nem igazoltak a COO altípusok között túlélésbeli különbséget (119-121). Ez az ellentmondás az irodalomban többféle tényezővel magyarázható. Ezek közül az egyik a tanulmányok retrospektív jellege, és kiemelendő még az alkalmazott különböző kezeléseket és a viszonylagos rövid követési idők (122). A sejteredet alapján GCB és non-GCB alcsoportba sorolt, tanulmányunkban vizsgált betegek arányát és túlélési adatait a 6. táblázat mutatja be, és hasonlítja össze más vizsgálatok eredményeivel.

6. táblázat: Immunfenotípus alapján osztályozott DLBCL-es betegek aránya és túlélési adatai a saját és a dolgozatban idézett tanulmányokban

| Munkacsoport | n (%) | Túlélési adatok | P-érték |
|---------------------------------|----------|-----------------------|---------|
| Saját tanulmány | | 5-éves OS (%) | |
| GCB | 85 (36) | 48.5 | NS |
| NGC | 149 (64) | 42.6 | |
| Hans és mtsai. (26) | | 5-éves OS (%) | |
| GCB | 64 (42) | 76 | <0.001* |
| NGC | 88 (58) | 34 | |
| Barrans és mtsai. (116) | | 5-éves OS (%) | |
| GCB | 59 (35) | 68 | 0.02* |
| NGC | 110 (65) | 58 | |
| Chang és mtsai. (117) | | Medián OS (hó) | |
| GCB | 15 (39) | nem érték el | <0.08* |
| Aktivált GC | 12 (32) | 15–26 | |
| NGC | 11 (29) | 38–40 | |
| Colomo és mtsai. (119) | | 5-éves OS (%) | |
| CD10+GC | 24 (21) | 40 | NS |
| CD10-GC | 30 (26) | 54 | |
| NGC | 60 (53) | 42 | |
| Chadburn és mtsai. (121) | | 1-éves OS (%) | |
| GCB | 33 (59) | 70 | NS |
| NGC | 23 (41) | 75 | |

NS: nem szignifikáns.

A csillaggal jelölt adatok statisztikailag szignifikánsak.

Eredményeink szerint az IPI, a magas MIB-1 expresszió (>90%) és a BCL6 protein expresszió azok a független faktorok, melyek összefüggést mutatnak a teljes- és eseménymentes túléléssel is. A BCL6 expresszió pozitív prognosztikai hatással bír mind a teljes-, mind az eseménymentes túlélésre. A BCL6 fehérje expresszió a GCB alcsoport

jellemzője, és eredményeinkkel összhangban, más tanulmányokban is kedvező prognózissal társult (26-29) (123-124). Vizsgálatunkban nem találtunk összefüggést a BCL6 protein expresszió és a *BCL6* génmutációk között. FISH eredményeink alapján a leggyakoribb citogenetikai eltérés a *BCL6* gén átrendeződés volt, a betegek 21,4 %-ában tudtuk kimutatni, és az esetek többsége a non-GCB alcsoportba tartozott a Hans algoritmus alapján. A *BCL6* transzlokáció és a non-GCB alcsoport asszociációját más vizsgálatok is megerősítették (33, 35, 45, 125). Jelen kutatásban a *BCL6* transzlokáció nem bizonyult prognózist befolyásoló tényezőnek. Más tanulmányokat tekintve az eredmények ellentmondásosak. Egyesek szerint ez az eltérés kedvezőtlen prognózissal jár (35, 126-129), más vizsgálatok nem találtak összefüggést a túléléssel (130-133), míg kedvező túlélési eredményekről is beszámoltak a *BCL6* átrendeződést hordozók esetében (134-135). A többváltozós analízis alapján a BCL2, MUM1 és MYC protein expressziók nem bizonyultak független prognosztikai tényezőnek. A MIB-1 antitesttel jellemzett magas proliferációs index (>90%) jó prognózissal társul mind az OS, mind az EFS tekintetében. A DEL esetek teljes- és eseménymentes túlélése nem különbözött a non-DEL esetekétől.

A kutatásunkban a BCL2 protein expresszió nem bizonyult prognózist meghatározó tényezőnek néhány korábbi tanulmány eredményeivel összhangban (26, 42-43, 136-137). Más kutatók DLBCL-ben a BCL2 protein expressziót kedvezőtlen prognosztikai tényezőnek találták (30, 33, 138-139). Eredményeink alapján a BCL2 protein pozitívitas nem volt összefüggésben a BCL2 gén aberrációkkal.

Tekintettel a DLBCL jelentős heterogenitására, megbízható és könnyen alkalmazható prognózist becselő rendszerre van szükség a mindennapi klinikai gyakorlatban. Az IPI volt az első prognosztikus modell, melyet a megjelenése, 1993 óta használunk a beteg ellátásban. Az IPI világszerte elfogadást nyert, mert könnyen hozzáférhető információkat alkalmaz, és prediktív értékét legalább öt klinikai tanulmány igazolta. Jelentősége az immunokemoterápia érájában még igazolásra vár. Az új terápiák bevezetése valószínűleg megváltoztatja a korábban igazolt prognosztikai faktorokat. Vizsgálatunk eredményei alapján az OS és az EFS legerősebb független rizikófaktora továbbra is az IPI. Ezek alapján még a rituximab érában is jelentős különbség van a különböző IPI csoportok túlélése között.

Kutatásunknak számos erőssége és korlátja van. Vizsgálatunk hátránya a retrospektív jellege, ennek következtében bizonyos analíziseket adathiány miatt nem tudtunk elvégezni, ezt tükrözi a vizsgálatból kizárt betegek száma is. Kiemelendő a bevont betegszám (247 DLBCL-es beteg 7 magyar centrumból), mely részletes és reprezentatív túlélés elemzést tett lehetővé.

6. Következtetések

A prognózis becslés DLBCL-ben számos klinikai és molekuláris faktor figyelembe vételével történhet. Vizsgálataink megerősítik a korábbi publikációk eredményeit, melyek szerint a DLBCL heterogén molekuláris háttérrel és változatos klinikai kimenetellel jellemezhető betegség. Ennek hátterében többféle tényező merül fel: a limfomagenezis a B-sejt fejlődés különböző szakaszaiban történik, különféle jelátviteli mechanizmusok segítségével valósul meg, és epigenetikai tényezők is befolyásolják. Eredményeink alapján az IPI, az immunhisztokémiai módszerrel meghatározott *BCL6* expresszió és a magas (>90%) MIB-1 expresszió bizonyult az OS és az EFS független prediktorainak. A MUM1 pozitivitás az EFS tekintetében szignifikánsan rosszabb túléléssel jár, de a MUM1 pozitivitás a többváltozós modellben nem bizonyult független rizikófaktornak sem az OS, sem az EFS tekintetében. Immunhisztokémiai vizsgálattal meghatározott CD10, *BCL2* és *MYC*, illetve FISH módszerrel vizsgált *BCL6* transzlokáció és a *BCL2* gén kópiaszám nyeres nem mutatott összefüggést a túléléssel. A jelenlegi irányelvek továbbra is javasolják sejteredet alapján a GCB és non-GCB alcsoportok elkülönítését, annak ellenére, hogy klinikai jelentősége nem egyértelmű, és az első vonalban választandó terápia sejteredettől függetlenül továbbra is az R-CHOP kezelés. Vizsgálatunkban a GCB és non-GCB alcsoport túlélési adatai között nem igazolódott szignifikáns különbség. Ezek az eredmények tovább pontosíthatják a DLBCL-es betegek prognózis becslését, és hozzájárulhatnak további vizsgálatok tervezéséhez ebben a témában. Eredményeinket prospektív vizsgálatban is érdemes lenne validálni.

7. Az új eredmények összefoglalása

1. Vizsgálatunk az első magyar multicentrikus, reprezentatív, nagyszámú DLBCL-es betegeket magában foglaló tanulmány, mely a prognosztika alapját képező immunhisztokémiai és citogenetikai adatok feldolgozása mellett részletesen értékeli a betegek túlélési adatait.
2. Kutatásunk igazolja DLBCL-ben a BCL6 fehérje mind az OS-re, mind az EFS-re gyakorolt független, pozitív prediktív szerepét a poszt-rituximab érában. Vizsgálatunk alapjául szolgálhat további prospektív, a B-sejt differenciáció génjei által kódolt proteinek prognosztikai szerepét vizsgáló tanulmányok tervezéséhez DLBCL-ben
3. Tudomásunk szerint mi vizsgálatunk az első nemzetközi szinten is, mely a magas MIB1 expresszió (>90%) független pozitív prediktív értékét bizonyítja mind az OS-t, mind az EFS-t tekintve DLBCL-ben.
4. Vizsgálataink megerősítik az EFS24 prediktív szerepét in vivo klinikai és radiomikai paraméterek alapján DLBCL-es betegekben
5. Munkacsoportunk egyedülálló vizsgálatban igazolta a RIT hatékonyságát relabáló vagy refrakter DLBCL-ben olyan esetekben, amikor az autológ őssejt átültetés nem elérhető. Ennek a terápiás modalitásnak jelenleg nem indikációja a DLBCL Magyarországon. Eredményeink alapján a RIT-nek lenne létjogosultsága olyan refrakter vagy relabáló DLBCL-es betegek esetében, akik az autológ őssejt átültetést nem vállalják, vagy nem alkalmasak rá.

Irodalomjegyzék

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC, 2008.
2. Morgan G, Vornanen M, Puitinen J, et al. Changing trends in the incidence of non-Hodgkin's lymphoma in Europe. Biomed Study Group., 1997. old.: 49–54. Ann Oncol 8 (Suppl 2).
3. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M et al eds. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017. based on November 2019 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2020.
4. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBO, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. Leukemia. 36(7)., 2022. Jul, old.: 1720-1748. doi: 10.1038/s41375-022-01620-2.
5. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Thiele J. WHO classification of tumors of the haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2017.
6. Szepesi Á. A diffúz nagy B-sejtes limfóma genetikai és patológiai sajátosságai [Molecular and histological features of diffuse large B-cell lymphoma]. Magy Onkol. 60(2)., 2016. Jun 6., old.: 99-107.
7. Maurer MJ, Ghesquières H, Jais JP, Witzig TE, Haioun C, Thompson CA, et al. Event-free survival at 24 months is a robust end point for disease-related outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. J Clin Oncol. 32(10)., 2014. Apr 1, old.: 1066-1073. doi:10.1200/JCO.2013.51.5866.
8. Jakobsen LH, Bøgsted M, Brown PN, Arboe B, Jørgensen J, Larsen TS, et al. Minimal Loss of Lifetime for Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Remission and Event Free 24 Months After Treatment: A Danish Population-Based Study. J Clin Oncol. 35(7)., 2017. Mar, old.: 778-784. doi: 10.1200/JCO.2016.70.0765.
9. Ritter Z, Papp L, Zámbo K, Tóth Z, Dezső D, Veres DS et al. Two-Year Event-Free Survival Prediction in DLBCL Patients Based on In Vivo Radiomics and Clinical Parameters. Front Oncol. 12:820136., 2022. Jun 8. doi: 10.3389/fonc.2022.820136.
10. Larouche JF, Berger F, Chassagne-Clément C, Ffrench M, Callet-Bauchu E, Sebban C, Ghesquières H, Broussais-Guillaumot F, Salles G, Coiffier B. Lymphoma recurrence 5 years or later following diffuse large B-cell lymphoma: clinical characteristics and outcome. J Clin Oncol. 28(12)., 2010. Apr 20, old.: 2094-2100.

11. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood*. 130., 2017., old.: 1800-1808. Erratum in: *Blood*. 2018 Feb 1;131(5):587-588. doi: 10.1182/blood-2017-03-769620.
12. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 329., 1993., 987-994., old.: 987-994.
13. Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera international trial (MInT) group. *Lancet Oncol*. 7., 2006., old.: 379–391.
14. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 346., 2002., old.: 235–242.
15. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, et al. The revised International Prognostic Index (R-IP) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 109., 2007., old.: 1857-1861.
16. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IP) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*. 123., 2014., old.: 837–842.
17. Ruppert AS, Dixon JG, Salles G, et al. International prognostic indices in diffuse large B-cell lymphoma: a comparison of IPI, R-IP, and NCCN-IP. *Blood*. 135., 2020., old.: 2041–2048.
18. Kobayashi T, Kuroda J, Yokota I, et al. The Kyoto prognostic index for patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Blood Cancer J*. 6. (1):e, 2016., old.: 383.
19. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2018. Apr 12, 378(15). kötet, old.: 1396-1407. doi: 10.1056/NEJMoa1801445.
20. Rosenthal A, Younes A. High grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6: double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma. *Blood Rev*. 31., 2017., old.: 37–42.
21. Sha C, Barrans S, Cucco F, et al. Molecular high-grade B-cell lymphoma: defining a poor-risk group that requires different approaches to therapy. *J Clin Oncol*. 37., 2019., old.: 202–212.
22. Krenács, T, Bődör C, Matolcsy A. Patológiai És Molekuláris Onkodiagnosztikai Módszerek. [szerk.] Bődör C, Matolcsy A Krenács T. Budapest: Medicina Könyvkiadó, 2021.

23. Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, Chaganti RS, et al. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science*. 262, 1993., 747–750. doi: 10.1126/science.8235596.
24. Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, et al. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood*. 86., 1995., old.: 45–53.
25. Chang CC, Ye BH, Chaganti RS, Dalla-Favera R. BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(14)., 1996. Jul 9., old.: 6947-6952. doi: 10.1073/pnas.93.14.6947.
26. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 103(1)., 2004. Jan 1., old.: 275-282. doi: 10.1182/blood-2003-05-1545.
27. Takeshita M, Iwashita A, Kurihara K, et al. Histologic and immunohistologic findings and prognosis of 40 cases of gastric large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 24., 2000., old.: 1641-1649. doi: 10.1097/00000478-200012000-00008.
28. Lossos IS, Jones CD, Warnke R, et al. Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 98., 2001., old.: 945-951. doi: 10.1182/blood.v98.4.945.
29. Winter, JN, Weller, EA, Horning, SJ, et al. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood*. 107., 2006., old.: 4207–4213. doi: 10.1182/blood-2005-10-4222.
30. Horn, H, Ziepert, M, Becher, C, et al. German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 121., 2013., old.: 2253–2263. doi: 10.1182/blood-2012-06-435842.
31. Pescarmona E, De Sanctis V, Pistilli A, Pacchiarotti A, Martelli M et al. Pathogenetic and clinical implications of Bcl-6 and Bcl-2 gene configuration in nodal diffuse large B-cell lymphomas. *J Pathol*. 183(3)., 1997. Nov, old.: 281-286.
32. Jerkeman M, Aman P, Cavallin-Stahl E, Torlakovic E, Akerman M, Mitelman F, et al. Prognostic implications of BCL6 rearrangement in uniformly treated patients with diffuse large B-cell lymphoma--a Nordic Lymphoma Group study. *Int J Oncol*. 20(1)., 2020. Jan, old.: 161-165. doi: 10.3892/ijo.20.1.161.
33. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, van Krieken JH, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 92(9)., 1998. Nov 1, old.: 3152-3162.

34. Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, Lenormand B, Rossi A, Pezzella F, et al. LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood*. 83., 1994., old.: 2423–2427.
35. Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA, Davies FE, Owen RG, Haynes AP, et al. Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. May, 2002., 117(2). kötet, 322-332. doi: 10.1046/j.1365-2141.2002.03435.x.
36. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (1), 2014. Jan, old.: 49-63. doi: 10.1038/nrm3722.
37. Vega F, Medeiros LJ. Chromosomal translocations involved in non-Hodgkin lymphomas. *Arch Pathol Lab Med*. 127(9)., 2003., old.: 1148–60.
38. Schuetz JM, Johnson NA, Morin RD et al. BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 26(6)., 2012., old.: 1383-1390.
39. van Imhoff GW, Boerma EJ, van der Holt B, et al. Prognostic impact of germinal center-associated proteins and chromosomal breakpoints in poor-risk diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 24., 2006., old.: 4135-4142.
40. Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, et al. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol*. 165., 2004., old.: 159-166.
41. Vaidya, R, Witzig, TE. Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R(X)CHOP era. *Ann Oncol*. 25., 2014., old.: 2124–2133.
42. Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, et al. Prognostic significance of bcl-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood*. 88., 1996., old.: 1046-1051.
43. Sanchez E, Chacon I, Plaza MM, Munoz E, Cruz MA, Martinez B, et al. Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *J Clin Oncol*. 6., 1998., old.: 1931-1939. doi: 10.1200/JCO.1998.16.5.1931.
44. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Lavignac C et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood*. 94., 1996., old.: 265-272.
45. Copie-Bergman C, Gaulard P, Leroy K, Briere J, Baia M, Jais JP, Salles GA, Berger F, Haioun C, Tilly H, Emile JF, Banham AH, Mounier N, Gisselbrecht C, Feugier P, Coiffier B, Molina TJ. Immuno-fluorescence in situ hybridization index predicts survival in patients with

- diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: a GELA study. *J Clin Oncol.* 27., 2009., old.: 5573–5579. doi: 10.1200/JCO.2009.22.7058.
46. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, et al. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 24., 2006., old.: 961–968. doi: 10.1200/JCO.2005.03.4264.
47. Swerdlow SH. Diagnosis of ‘double hit’ diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC. 2014(1), 2014., old.: 90-99.
48. Ott et al. Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood.* 122, 2013. Dec 5., 24, old.: 3884-3891.
49. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinha P, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood.* 114(17)., 2009 Oct 22., old.: 3533-3537. doi: 10.1182/blood-2009-05-220095.
50. Copie-Bergman C, Cuilliere-Dartigues P, Baia M, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood.* 126., 2015., old.: 2466–2474.
51. Riedell PA, Smith SM. Double hit and double expressors in lymphoma: Definition and treatment. *Cancer.* 124(24), 2018. Dec 15., old.: 4622-4632.
52. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 27(20)., 2016. May 19., old.: 2375-2390. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569.
53. Aukema SM, Siebert R, Schuurung E, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood.* 117., 2011., old.: 2319-2331.
54. Kanungo A, Medeiros LJ, Abruzzo LV, Lin P. Lymphoid neoplasms associated with concurrent t(14;18) and 8q24/c-MYC translocation generally have a poor prognosis. *Mod Pathol.* 19., 2006., old.: 25-33.
55. Le Gouill S, Talmant P, Touzeau C, et al. The clinical presentation and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC rearrangement. *Haematologica.* 2007., 92. kötet, old.: 1335-1342.
56. Niitsu N, Okamoto M, Miura I, Hirano M. Clinical features and prognosis of de novo diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC translocations. *Leukemia.* 23., 2009., old.: 777-783.
57. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood.* 10., 2009., old.: 2273-2279.

58. Cucco F, Barrans S, Sha C, Clipson A, Crouch S, Dobson R, et al. Distinct genetic changes reveal evolutionary history and heterogeneous molecular grade of DLBCL with MYC/BCL2 double-hit. *Leukemia*. 34., 2020., old.: 1329–1341.
59. Chisholm KM, Bangs CD, Bacchi CE, Molina-Kirsch H, Cherry A, Natkunam Y. Expression profiles of MYC protein and MYC gene rearrangement in lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 39(3)., 2015. Mar, old.: 294-303. doi: 10.1097/PAS.0000000000000365.
60. Karube K, Campo E. MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Hematol*. 52(2), 2015. Apr, old.: 97-106. doi: 10.1053/j.seminhematol.2015.01.009.
61. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer*. 8(12)., 2008. Dec, old.: 976-990. doi: 10.1038/nrc2231.
62. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 30(28)., 2012. Oct 1., old.: 3452-3459. doi: 10.1200/JCO.2011.41.0985.
63. Lu TX, Fan L, Wang L, et al. MYC or BCL2 copy number aberration is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*. 6., 2015., old.: 18374-18388.
64. Yoon SO, Jeon YK, Paik JH, et al. MYC translocation and an increased copy number predict poor prognosis in adult diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), especially in germinal centre-like B cell (GCB) type. *Histopathology*. 53., 2008., old.: 205-217.
65. Salles G, de Jong D, Xie W, et al. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood*. 117., 2011., old.: 7070–7078.
66. He X, Chen Z, Fu T, Jin X et al. Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphoma subtypes: evidence from a systematic meta-analysis. *BMC Cancer*. 14., 2014. Mar 5., old.: 153. doi: 10.1186/1471-2407-14-153.
67. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 403(6769)., 2000. Feb 3., old.: 503-511. doi 10.1038/35000501.
68. Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 359., 2008., old.: 2313–2323.
69. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. The genetic landscape of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Hematol*. 52., 2015., old.: 67–76.
70. Gutierrez- Garcia, G. et al. Gene- expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*. 117., 2011., old.: 4836–4843.

71. Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih CJ, Walsh W, Jaffe ES, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood*. 123(8), 2014. Feb 20., old.: 1214-1217. doi: 10.1182/blood-2013-11-536433.
72. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 29(2)., 2011. Jan 10., old.: 200-207. doi: 10.1200/JCO.2010.30.0368.
73. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Kamburov A, Redd RA et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med*. 24(5)., 2018. May, old.: 679-690. doi: 10.1038/s41591-018-0016-8.
74. Lacy SE, Barrans SL, Beer PA, et al. Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: a Haematological Malignancy Research Network report. *Blood*. 135., 2020., old.: 1759–1771.
75. Kiss, L., Bártai, B., Bődör, C., & Nagy, Á. Új molekuláris klasszifikációs rendszerek diffúz nagy B-sejtes limfómában, *Hematológia–Transzfuziológia*, 54(2), 104-112. *Cancer Cell*. 37., 2020., old.: 551–568. e14.
76. Wright GW, Huang DW, Phelan JD, et al. A probabilistic classification tool for genetic subtypes of diffuse large B cell lymphoma with therapeutic implications. *Cancer Cell*. 37., 2020., old.: 551–568. e14.
77. Shimkus G, Nonaka T. Molecular classification and therapeutics in diffuse large B-cell lymphoma. *Front Mol Biosci*. kötet.
78. Reddy A, Zhang J, Davis NS, Moffitt AB, Love CL, Waldrop A, et al. Genetic and functional drivers of diffuse large B cell lymphoma. *Cell*. 171., 2017., old.: 481–494.
79. Sehn LH, Salles G. Diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 384(9)., 2021., old.: 842-858.
80. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 32(27)., 2014. Sep 20, old.: 3059-3068. doi: 10.1200/JCO.2013.54.8800.
81. Cheson BD, Ansell S, Schwartz L, et al. Refinement of the Lugano Classification lymphoma response criteria in the era of immunomodulatory therapy. *Blood*. 128., 2016., old.: 2489–2496.
82. Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L, et al. Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol*. 32., 2014., old.: 3048–3058.

83. Vercellino L, Cottreau AS, Casasnovas O, Tilly H, Feugier P, Chartier L, et al. High Total Metabolic Tumor Volume at Baseline Predicts Survival Independent of Response to Therapy. *Blood*. 135:1396–405., 2020.
84. Kostakoglu L, Chauvie S. PET-Derived Quantitative Metrics for Response and Prognosis in Lymphoma. *PET Clin*. 14, 2019., old.: 317–329.
85. Prieto JC, Vallejo Casas JA, Hatzimichael E, Fotopoulos A, Kiortsis DN, Sioka C. The Contribution of Metabolic Parameters of FDG PET/CT Prior and During Therapy of Adult Patients With Lymphomas. *Ann Nucl Med*. 34, 2020., old.: 707–717.
86. Sehn LH, Scott DW, Chhanabhai M, et al. Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol*. 29., 2011., old.: 1452–1457.
87. Lin C, Itti E, Haioun C, Petegnief Y, Luciani A, Dupuis J, Paone G, Talbot JN, Rahmouni A, Meignan M. Early 18F-FDG PET for prediction of prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma: SUV-based assessment versus visual analysis. *J Nucl Med*. 48(10), 2007. október, old.: 1626-1632.
88. Kurtz DM, Scherer F, Jin MC, et al. Circulating tumor DNA measurements as early outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 36., 2018., old.: 2845–2853.
89. Schmitz N, Zeynalova S, Nickelsen M, et al. CNS international prognostic index: a risk model for CNS relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol*. 34(26), 2016., 3150-3156.
90. Lin Z, Chen X, Liu L, Zeng H, Li Z, Xu B. The role of central nervous system (CNS) prophylaxis in preventing DLBCL patients from CNS relapse: a network meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 176., 2022., old.: 103756.
91. Petrich AM, Gandhi M, Jovanovic B, et al. Impact of induction regimen and stem cell transplantation on outcomes in double-hit lymphoma: a multicenter retrospective analysis. *Blood*. 124., 2014., old.: 2354–2361.
92. Chamuleau MED, Burggraaff CN, Nijland M, Bakunina K, Mous R, Lugtenburg PJ et al. Treatment of patients with MYC rearrangement positive large B-cell lymphoma with R-CHOP plus lenalidomide: results of a multicenter HOVON phase II trial. *Haematologica*. 105(12)., 2020. Dec 1., old.: 2805-2812.
93. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 28., 2010., old.: 4184–4190.
94. Szakács Z, Lal A, Kristensen J, Farkas N, Ritter Z, Kiss S, Alizadeh H, Balikó A. 90Y-ibritumomab Tiuxetan in B-cell Non-Hodgkin Lymphomas: Real-world Data From the United Arab Emirates. *Adv Radiat Oncol*. 7(5)., 2021. Dec 26., old.: 100882.

95. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet*. 396., 2020., old.: 839–852.
96. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 377., 2017., old.: 2531–2544.
97. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 380., 2019., old.: 45–56.
98. Sehn LH, Herrera AF, Flowers CR, et al. Polatuzumab vedotin in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 38., 2020., old.: 155–165.
99. Salles G, Duell J, González Barca E, et al. Tafasitamab plus lenalidomide in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (L-MIND): a multicentre, prospective, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 21., 2020., old.: 978–988.
100. Caimi PF, Ai W, Alderuccio JP, et al. Loncastuximab tesirine in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (LOTIS-2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 22. (6), 2021., old.: 790-800.
101. Viardot A, Goebeler ME, Hess G, et al. Phase 2 study of the bispecific T-cell engager (BiTE) antibody blinatumomab in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 127(11), 2016., old.: 1410–1416.
102. Hutchings M, Morschhauser F, Iacoboni G, et al. Glofitamab, a novel, bivalent CD20 targeting T-cell engaging bispecific antibody, induces durable complete remissions in relapsed/refractory B-cell lymphoma: a phase I trial. *J Clin Oncol*. 2023. (in press).
103. Hutchings M, Mous R, Clausen MR, et al. Subcutaneous epcoritamab induces complete responses with an encouraging safety profile across relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma subtypes, including patients with prior CAR-T therapy: updated dose escalation data. *Blood*. 136., 2020., old.: 45–56. Suppl 1 (abstract).
104. Schuster SJ, Bartlett NL, Assouline S, et al. Mosunetuzumab induces complete remissions in poor prognosis non-Hodgkin lymphoma patients, including those who are resistant to or relapsing after Chimeric Antigen Receptor T-Cell (CAR-T) therapies, and is active in treatment through multiple lines. *Blood*. 134:6, 2019.
105. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med*. 21., 2015., old.: 922–926.
106. Czuczman MS, Trněný M, Davies A, et al. A phase 2/3 multicenter, randomized, open-label study to compare the efficacy and safety of lenalidomide versus investigator’s choice in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 23., 2017., old.: 4127–4137.

107. Davids MS, Roberts AW, Seymour JF, et al. Phase I first-in-human study of venetoclax in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol.* 35., 2017., old.: 826–833.
108. Ribrag V, Morschhauser F, McKay P, et al. Interim results from an ongoing phase 2 multicenter study of tazemetostat, an EZH2 inhibitor, in patients with relapsed or refractory (R/R) diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood.* 132. Suppl 1, 2018., old.: 4196.
109. Gascoyne, RD. Diffuse large B-cell lymphoma, NOS. [szerk.] Swerdlow SH. International Agency of Research on Cancer, 2017. old.: 291-297. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.
110. Pajor G, Kajtár B, Pajor L, Alpár D. State-of-the-art FISHing: automated analysis of cytogenetic aberrations in interphase nuclei. *Cytometry A.* 81(8)., 2012. Aug, old.: 649-663. doi: 10.1002/cyto.a.22082. Epub 2012 Jun 13.
111. Pajor, L., Kun, J., Herczeg, R., Gálik, B., Ritter, Z., Baliko, A. et al. A diffúz nagy B-sejtes limfóma fenotipikus, citogenetikai és expressziós profil heterogenitása – Magyarországi multicentrikus tanulmány. *Hematológia–Transzfuziológia.* 55(4)., 2023., old.: 154-163.
112. R Core Team (2022) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.R-project.org>. [Olvasva: 2023. Február 23.]
113. Kassambara (2021) Computing, Vienna, Austria <https://www.R-project.org>. [Olvasva: 2023. Február 23.]
114. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood.* 121., 2013., old.: 4021–4031.
115. Timlin DM, O’Hare K, Walker J et al. FISH studies in DLBCL: correlations with cell of origin: the Irish experience. *J Clin Pathol.* 71., 2018., old.: 946-947.
116. Barrans SL, Carter I, Owen RG, Davies FE, Patmore RD, Haynes AP, et al. Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 99(4), 2002. Feb 15., old.: 1136-1143. doi: 10.1182/blood.v99.4.1136.
117. Chang CC, McClintock S, Cleveland RP, Trzpuć T, Vesole DH, Logan B, et al. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* Apr, 2004., 28(4).. kötet, old.: 464-470. doi: 10.1097/00000478-200404000-00005.
118. McClintock S, Perkins SL, Cleveland RP, et al. Immunohistochemical expression pattern of germinal center and activation B-cell markers correlates with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma [abstract]. *Mod Pathol.* 16:244a., 2003.

119. Colomo L, López-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martínez A, Bosch F, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 101(1)., 2003. Jan 1., old.: 78-84. doi: 10.1182/blood-2002-04-1286.
120. Linderoth J, Jerkeman M, Cavallin-Ståhl E, Kvaløy S, Torlakovic E. Nordic Lymphoma Group Study. Immunohistochemical expression of CD23 and CD40 may identify prognostically favorable subgroups of diffuse large B-cell lymphoma: a Nordic Lymphoma Group Study. *Clin Cancer Res*. 9(2)., 2003. Feb, old.: 722-728.
121. Chadburn A, Chiu A, Lee JY, Chen X, Hyjek E, Banham AH, et al. Immunophenotypic analysis of AIDS-related diffuse large B-cell lymphoma and clinical implications in patients from AIDS Malignancies Consortium clinical trials 010 and 034. *J Clin Oncol*. 27(30), 2009. Oct 20., old.: 5039-5048. doi: 10.1200/JCO.2008.20.5450.
122. Dunleavy K, Wilson WH. Role of molecular subtype in predicting outcome of AIDS-related diffuse large B-cell lymphoma. Role of molecular subtype in predicting outcome of AIDS-related diffuse large B-cell lymphoma. 28(16):e260 author reply e261-2., 2010. Jun 1. doi: 10.1200/JCO.2009.27.7087.
123. Advani P, Ngamphaiboon N, Pukiat S, Chavez J, Deeb G, Elefante A, et al. The Expression of Bcl-6 In Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) Is Associated with Improved Progression Free Survival and Overall Survival Following Front-Line Rituximab-Chemotherapy. *Blood*. 116 (21), 2010., old.: 5073. doi:10.1182/blood.v116.21.5073.5073.
124. Iqbal J, Greiner TC, Patel K, Dave BJ, Smith L, Ji J, et al. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 21(11), 2007. Nov, old.: 2332-2343. doi: 10.1038/sj.leu.2404856.
125. Shustik J, Han G, Farinha P, Johnson NA, Ben Neriah S, Connors JM, et al. Correlations between BCL6 rearrangement and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP or R-CHOP. *Haematologica*. 95(1)., 2010. Jan. doi: 10.3324/haematol.2009.007203.
126. Gao P, Li Q, Wang Z, Yan F, Lu C, Cao X. Significance of BCL6, MYC, P53 genes abnormalities for the prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 31(5)., 2014. Oct, old.: 628-631. doi: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2014.01.020.
127. Akyurek N, Uner A, Benekli M, Barista I. Prognostic significance of MYC, BCL2, and BCL6 rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus rituximab. *Cancer*. 118(17), 2012. Sep 1, old.: 4173-4183. doi: 10.1002/cncr.27396.

128. Akasaka T, Ueda C, Kurata M, Akasaka H, Yamabe H, Uchiyama T, et al. Nonimmunoglobulin (non-Ig)/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig/BCL6. *Blood*. 96(8), 2000. Oct 15., old.: 2907-2909.
129. Li S, Wang Z, Lin L, Wu Z, Yu Q, Gao F, et al. BCL6 Rearrangement Indicates Poor Prognosis in Diffuse Large B-cell Lymphoma Patients: A Meta-analysis of Cohort Studies. *Cancer*. 10(2)., 2019. Jan 1., old.: 530-538. doi: 10.7150/jca.25732.
130. Chen PM, Yang MH, Yu IT, Lin JT, Lin YC, Fan FS, et al. Low incidence of BCL-6 gene alterations for diffuse large B-cell lymphomas in Taiwan Chinese. *Cancer*. 94(10)., 2012. May 15., old.: 2635-2644. doi: 10.1002/cncr.10545.
131. Pedersen MO, Gang AO, Brown P, Pedersen M, Knudsen H, Nielsen SL, et al. Real world data on young patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP or R-CHOEP - MYC, BCL2 and BCL6 as prognostic biomarkers. *PLoS One*. 12(10):e0186983., 2017. Oct 31. doi: 10.1371/journal.pone.0186983.
132. Ye Q, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Deng L, Wang X, Manyam GC, et al. Prognostic impact of concurrent MYC and BCL6 rearrangements and expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*. 7(3), 2016. Jan 19., old.: 2401-2416. doi: 10.18632/oncotarget.6262.
133. Batlle-López A, González de Villambrosía S, Francisco M, Malatxeberria S, Sáez A, Montalban C, et al. Stratifying diffuse large B-cell lymphoma patients treated with chemoimmunotherapy: GCB/non-GCB by immunohistochemistry is still a robust and feasible marker. *Oncotarget*. 7(14)., 2016. Apr 5., old.: 18036-18049. doi: 10.18632/oncotarget.7495.
134. Niitsu N, Okamoto M, Nakamura N, Nakamine H, Aoki S, Hirano M, et al. Prognostic impact of chromosomal alteration of 3q27 on nodal B-cell lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 329 consecutive patients. *Leuk Res*. 31(9)., 2007. Sep, old.: 1191-1197. doi: 10.1016/j.leukres.2006.11.004.
135. Offit K, Lo Coco F, Louie DC, Parsa NZ, Leung D, Portlock C, Ye BH, Lista F, Filippa DA, Rosenbaum A, et al. Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 331(2)., 1994. Jul 14., old.: 74-80. doi: 10.1056/NEJM199407143310202.
136. Tang SC, Visser L, Hepperle B, Hanson J, Poppema S. Clinical significance of bcl-2-MBR gene rearrangement and protein expression in diffuse large-cell non-Hodgkin's lymphoma: an analysis of 83 cases. *Clin Oncol*. 12(1), 1994. Jan, old.: 149-154. doi: 10.1200/JCO.1994.12.1.149.
137. Zhang A, Ohshima K, Sato K, Kanda M, Suzumiya J, Shimazaki K, et al. Prognostic clinicopathologic factors, including immunologic expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Pathol Int*. 49(12)., 1999. Dec, old.: 1043-1052. doi: 10.1046/j.1440-1827.1999.00980.x.

138. Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Tai YC, Li Y, et al. Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica*. 98(2), 2013. Feb, old.: 255-263. doi: 10.3324/haematol.2012.066209.

139. Kawamoto K, Miyoshi H, Yoshida N, Nakamura N, Ohshima K, Sone H, et al. MYC translocation and/or BCL 2 protein expression are associated with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci*. 107(6), 2016. Jun, old.: 853-861. doi: 10.1111/cas.12942.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok elsősorban témavezetőmnek, Dr. Alizadeh Hussainnek, aki a kutatás tervezésétől annak megvalósításán át, az adatok értékeléséig mindenben segített, tanított, tanácsokkal látott el. Mindvégig biztatott, ösztönzött a munkám a során, és átsegített a nehézségeken.

Hálás vagyok Dr. Pajor László Professzor Úrnak, hogy részt vehettem a kutatásban, és az eredményeket feldolgozhattam. Köszönettel tartozom neki, hogy az alkalmazott módszertant általa megismerhettem.

Köszönettel tartozom, Dr. Kajtár Bélának, aki mindig rendelkezésemre állt, ha kérdésem merült fel, és a tanulmányaimhoz pedig irodalmi forrásokat biztosított.

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Szakács Zsoltnak, aki a statisztikai eredmények értékelése mellett a publikációk elkészítését segítette.

Köszönetet mondok Dr. Farkas Nelinek a statisztikai számítások elvégzéséért, valamint az adatelemzésben nyújtott támogatásáért.

Köszönöm kollégáimnak Dr. Csalódi Renátának és Dr. Sziládi Erzsébetnek, hogy támogatták a Ph. D tanulmányaimat.

Hálás vagyok a férjemnek, a szüleimnek, a férjem szüleinek, gyerekeimnek, hogy a munkám végzéséhez szükséges nyugodt otthoni légkört megteremtették számomra. Férjemnek külön köszönöm a rengeteg informatikai segítséget.

A disszertáció alapját képező publikációk

A **Balikó**, Z Szakács, B Kajtár, Z Ritter, A Gyenesei, N Farkas, L Kereskai, I Vályi-Nagy, H Alizadeh, L Pajor (2023) Clinicopathological Analysis of Diffuse Large B-cell Lymphoma Using Molecular Biomarkers: A Retrospective Analysis from 7 Hungarian Centers. *Front. Oncol.* 13:1224733. doi: 10.3389/fonc.2023.1224733 (Q1, IF: 5.738)

Szakács Z, Lal A, Kristensen J, Farkas N, Ritter Z, Kiss S, Alizadeh H, **Balikó A.** ⁹⁰Y-ibritumomab Tiuxetan in B-cell Non-Hodgkin Lymphomas: Real-world Data From the United Arab Emirates. *Adv Radiat Oncol.* 2021 Dec 26;7(5):100882. doi: 10.1016/j.adro.2021.100882 (Q1, IF: 3.08)

Ritter Z, Papp L, Zámbo K, Tóth Z, Dezső D, Veres DS, Máthé D, Budán F, Karádi É, **Balikó A**, Pajor L, Szomor Á, Schmidt E, Alizadeh H. Two-Year Event-Free Survival Prediction in DLBCL Patients Based on *In Vivo* Radiomics and Clinical Parameters. *Front Oncol.* 2022 Jun 8;12:820136. doi: 10.3389/fonc.2022.820136. (Q1, IF: 5.738)

Pajor, L., Kun, J., Herczeg, R., Gálik, B., Ritter, Z., **Baliko, A.**, Hegedűs, G., Barna, T., Czifra, J., Pálvölgyi, A., Östör, G., Babarczi, E., Ligeti, E., Kránitz, N., Bali, O., Bodor, A., Tiszlavicz, L., Pajor, G., Kajtár, B., Kereskai, L., Tornóczki, T., Alizadeh, H., Gyenesei, A., & Vályi-Nagy, I. (2023). A diffúz nagy B-sejtes limfóma fenotipikus, citogenetikai és expressziós profil heterogenitása – Magyarországi multicentrikus tanulmány, *Hematológia–Transzfuziológia*, 55(4), 154-163.

Egyéb publikáció

A. Mikó, R. Csalódi, S. Kosztolányi, Á. Nagy, Á. Szomor, O. Tóth, J. Pammer, Z. Kohl, E. Sziládi, **A. Balikó**, and H. Alizadeh, “Drug-induced thrombotic microangiopathy caused by ponatinib,” EUROPEAN JOURNAL PHARMACEUTICAL AND MEDICAL RESEARCH, vol. 6, no. 5, pp. 589–595, 2019.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Robert Ohgami,
The University of Utah, United States

REVIEWED BY

Joaquim Carreras,
Tokai University, Japan
Sebastian Fernandez-Pol,
Stanford University, United States

*CORRESPONDENCE

Hussain Alizadeh
✉ alizadeh.hussain@pte.hu

RECEIVED 18 May 2023

ACCEPTED 21 August 2023

PUBLISHED 08 September 2023

CITATION

Balikó A, Szakács Z, Kajtár B, Ritter Z,
Gyenesei A, Farkas N, Kereskai L, Vályi-
Nagy I, Alizadeh H and Pajor L (2023)
Clinicopathological analysis of diffuse large
B-cell lymphoma using molecular
biomarkers: a retrospective analysis
from 7 Hungarian centers.
Front. Oncol. 13:1224733.
doi: 10.3389/fonc.2023.1224733

COPYRIGHT

© 2023 Balikó, Szakács, Kajtár, Ritter,
Gyenesei, Farkas, Kereskai, Vályi-Nagy,
Alizadeh and Pajor. This is an open-access
article distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Clinicopathological analysis of diffuse large B-cell lymphoma using molecular biomarkers: a retrospective analysis from 7 Hungarian centers

Anett Balikó^{1,2}, Zsolt Szakács³, Béla Kajtár⁴, Zsombor Ritter⁵,
Attila Gyenesei⁶, Nelli Farkas⁷, László Kereskai⁴,
István Vályi-Nagy⁸, Hussain Alizadeh^{3*} and László Pajor⁴

¹Tolna County Balassa János Hospital, Szekszárd, Hungary, ²PhD Doctoral School – Interdisciplinary Medical Sciences (D93), Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ³First Department of Medicine, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ⁴Department of Pathology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ⁵Department of Medical Imaging, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ⁶Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, Pécs, Hungary, ⁷Institute of Bioanalysis, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ⁸South-Pest Hospital Centre – National Institute for Infectology and Haematology, Budapest, Hungary

Background: The clinical and genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) presents distinct challenges in predicting response to therapy and overall prognosis. The main objective of this study was to assess the application of the immunohistochemistry- and interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH)-based molecular markers in the diagnosis of DLBCL and its prognostic value in patients treated with rituximab-based immunochemotherapy.

Methods: This is a multicenter, retrospective study, which analyzed data from 7 Hungarian hematology centers. Eligible patients were adults, had a histologically confirmed diagnosis of DLBCL, were treated with rituximab-based immunochemotherapy in the first line, and had available clinicopathological data including International Prognostic Index (IPI). On the specimens, immunohistochemistry and FISH methods were performed. Germinal center B-cell like (GCB) and non-GCB subtypes were classified by the Hans algorithm. Outcomes included overall survival (OS), event-free survival (EFS), and EFS at 2 years (EFS24). For survival analysis, we used Kaplan-Meier curves with the log-rank test and multivariate Cox regression.

Results: A total of 247 DLBCL cases were included. Cases were positive for MYC, BCL2, BCL6, and MUM1 expression in 52.1%, 66.2%, 72.6%, and 77.8%, respectively. *BCL6* translocation, *BCL2* gene copy number (GCN) gain, *IGH::MYC* translocation, *MYC* GCN gain, *IGH::BCL2* translocation, and *BCL6* GCN gain were detected in 21.4%, 14.1%, 7.3%, 1.8%, 7.3%, and 0.9%, respectively. At a median follow-up of 52 months, 140 patients (56.7%) had disease progression or relapse. The Kaplan-Meier estimate for EFS24 was 56.2% (CI: 50.4–62.8%). In univariate analysis, only IPI and BCL6 expression were significant predictors of both OS and EFS, whereas MUM1 predicted EFS only. In multivariate analysis, the

IPI score was a significant independent negative, whereas MIB-1 and BCL6 protein expressions were significant independent positive predictors of both OS and EFS.

Conclusion: In our study, we found that only IPI, BCL6 protein expression and MIB-1 protein expression are independent predictors of survival outcomes in DLBCL. We did not find any difference in survival by GCB vs. non-GCB subtypes. These findings may improve prognostication in DLBCL and can contribute to designing further research in the area.

KEYWORDS

diffuse large B-cell lymphoma, MYC, BCL6, BCL2, IHC, FISH, prognosis

1 Introduction

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is the most common high-grade non-Hodgkin lymphoma accounting for 30–40% of B-cell non-Hodgkin lymphomas (1). DLBCL has considerable biologic, molecular, and clinical heterogeneity resulting in different responses to therapy (2). DLBCL is a potentially curable disease with an overall 60–70% chance of achieving durable complete remission (CR) with the currently used standard first-line immunochemotherapy. However, 30–40% of patients are either refractory to first-line treatment or experience relapse and eventually will die of disease progression (3). Patients achieving remission lasting for 24 months or more from the end of first-line treatment have favorable prognosis at long term (4–6). The diagnosis and subtyping of DLBCL have come far to date, from morphological assessment of tissue slide to now, where numerous ancillary tests are a prerequisite, including immunophenotyping performed by immunohistochemistry (IHC), cytogenetics, and detailed molecular testing to classify the disease based on cell of origin (COO). With the advent of novel therapeutic options, it is expected that molecular subtyping of DLBCL at diagnosis will allow prognostic stratification of patients into distinct subgroups which could provide preclinical rationale for therapeutic targeting the involved pathways and paving the application of personalized treatment. The original DLBCL molecular classification using DNA microarray-based technology was initially described by Alizadeh et al. (7). This technology allowed the analysis of transcriptional gene expression pattern, and distinguished two major COO subtypes of DLBCL: germinal center B-cell like (GCB) and activated B-cell like (ABC). This resulted in the molecular subtyping of 80–85% of all DLBCL cases. Treated with standard immunochemotherapy, the ABC subgroup had poorer 5-year survival compared to the GCB group (16% vs. 76%, respectively).

Hans (8), Choi (9), and Tally (10) are the most established algorithms that are based on IHC to assess COO with the Hans algorithm being the most commonly used in clinical practice. However, the clinical significance of COO subtyping using IHC remains controversial, and the assessment of COO by gene

expression profiling rather than IHC is better associated with the prognosis of DLBCL (11).

Translocations, gene rearrangements, and protein expression patterns including but not limited to BCL6, BCL2, and MYC have been shown to have prognostic implications.

The human proto-oncogene *BCL6* was identified from chromosomal breaks at 3q27, is expressed predominantly in germinal center B-cells (12, 13), and functions as a sequence-specific transcriptional repressor (14, 15). Mutation or translocation of *BCL6* gene has been implicated in the pathogenesis of certain subtypes of DLBCL (12). *BCL6* is frequently affected by chromosomal translocations, occurring more frequently in ABC DLBCL. There is no consensus on the effect of *BCL6* translocation on prognosis of DLBCL, especially in the rituximab era, with studies showing either favorable (16, 17), neutral (18, 19), or unfavorable outcomes (20).

The BCL2 protein is a central regulator of the mitochondrial apoptotic pathway and its gene is located on the chromosome arm 18q21 (21). The primary function of *BCL2* is to promote cell survival by inhibiting apoptosis (22–24). The *BCL2* gene is overexpressed in many cancers including DLBCL and is usually associated with drug resistance (25). In DLBCL, the ratio of BCL2-positive cases is highly variable, ranging from 20% to 80% across studies that used IHC (26, 27). Some studies showed BCL2 protein expression as a marker of poor prognosis in GCB subtype of DLBCL (26, 28), while others reported it to be a marker of poor prognosis in ABC-DLBCL, only (29).

Chromosomal translocations dysregulating *MYC* (8q24) were reported in 5–15% of GCB DLBCL cases (17), while *MYC* protein detection in 5–40% of DLBCL cases (30–32). *MYC* gene translocation was associated with a very poor outcome in DLBCL (33–36). *MYC* translocation in DLBCL is usually associated with other gene abnormalities, e.g., *BCL2* or *BCL6* rearrangements (37, 38). Some studies show that about 30% of DLBCL co-express high levels of *MYC* and *BCL2* proteins, which cases are called ‘double expressor’ DLBCL (DEL) (39).

Although substantial knowledge has accumulated about prognostication in DLBCL, a lot of questions have remained unanswered. The main objective of this study was to describe the

distribution of and to test the prognostic ability of IHC- and interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH)-based molecular markers in a Hungarian cohort of newly diagnosed DLBCL patients from the rituximab era.

2 Patients and methods

This multicenter, retrospective study was approved by the Committee of Science and Research Ethics (ETT-TUKEB) under reference number 50268-8/2017.

2.1 Study population and sample assessment

This study is reported according to the STROBE Statement (40).

A total of 342 adult patients diagnosed with DLBCL were assessed. Tissue samples were sent by 7 Hungarian Hematology centers to the central hematopathology lab in the Department of Pathology, Medical School, Clinical Centre, University of Pécs between Jan 2010 and Mar 2017. All samples were reviewed by 2 senior pathologists. The final pathology report was established according to the diagnostic criteria of the 2016 WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (37). Out of the 342, 95 cases were excluded due to incomplete clinicopathological data, so a total of 247 cases were further assessed in the study. All specimens were fixed in 10% neutral formalin and conventional paraffin embedding was performed.

IHC was carried out according to standard protocols using CD10, clone 56C6; CD20, clone L26 (Visionbiosystems Novocastra, UK); MUM1/IRF4, clone MUM1p; BCL2, clone 124; BCL6, clone PG-B6p (Dako, Denmark); MYC, clone Y69 (Abcam, UK); Ki-67, clone B56 (Hisztopatológia Kft., Hungary) specific primary antibodies as well as Envision+ System-HRP (DakoCytomation, Denmark) and Bond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems, UK) developing reagents. According to the Hans algorithm, at least 30% reactivity—either membranous or nuclear—is required for a tumor to be considered positive for a particular marker. The tumors were classified as GCB-like when exhibiting CD10+ (BCL6+/-, MUM1 +/-) or CD10-, BCL6+, MUM1- phenotype. Non-GCB/ABC like was the subtype in the case of all the other—CD10-, BCL6+, MUM1+ or CD10-, BCL6-, MUM1+—phenotypic variables (8). DEL was defined as combined BCL2 ($\geq 50\%$) and MYC ($\geq 40\%$) positivity (37).

FISH was performed using 5 μm paraffin tissue sections for *IGH::MYC*, *IGH::BCL2*, *BCL6* rearrangement and for *MYC*, *BCL2*, *BCL6* gene copy number (GCN) gain. For these, Vysis *IGH/MYC/CEP8* TC-DF, Vysis *LSI IGH/BCL2* DC-DF, and Vysis *LSI BCL6* (ABR) DC Break Apart probes (Abbott Molecular Inc., USA) were used. FISH reactions were analyzed in Zeiss Axioplan-MOT II fluorescent microscope and evaluated by means of ‘grid sampling’ and ‘color rationing’ methods (41). We have used double fusion FISH probes to detect *IGH::BCL2* and *IGH::MYC* fusions, since non-*IG BCL2* fusions are rare in DLBCL, and the prognostic

significance of non-*IG MYC* fusions is controversial. Cases with non-*IG BCL2* or *MYC* fusions showed signal patterns indicating *BCL2* or *MYC* gain in our series. A tumor was defined positive for rearrangement using *IGH/MYC*, *IGH/BCL2*, and *BCL6* probes if the fusion or the dissociated FISH signs occurred in at least 50% of the nuclei. The definition of *MYC*, *BCL2*, and *BCL6* GCN gains included the lack of the polyploidy of the relevant chromosome and/or detection of at least one extra gene copy at least in 50% of the nuclei or identifying ‘double minutes’ and/or ‘beaded lace-like’ signals and/or uncountable (homogeneous staining region or cloudy-like) signals.

2.2 Clinical assessment

Detailed clinical and laboratory data including treatment regimen and clinical outcomes (overall survival, OS; event-free survival, EFS; EFS at 24 months, EFS24) were collected from patients’ records, then, all data were reviewed by a senior hematologist. The clinical stage was evaluated by the modified Ann Arbor and Lugano classifications (42, 43). CR, partial response, progression, refractory disease, and relapse were defined according to the International Working Group response criteria for lymphoma (44). EFS was defined as the time from the end of first line treatment until the earliest occurrence of disease progression or death of any cause. EFS24 was defined as being alive and free of any disease related event 24 months from the end of therapy.

2.3 Statistical analysis

In univariate statistics, Chi² test was used to analyze the association across clinical variables. Kaplan-Meier curves with a median estimate (with 95% confidence interval, CI) and the log-rank test were used for univariate survival analysis. Multivariate Cox regression analysis was applied to identify independent prognostic factors for the outcomes (OS and EFS). The models were adjusted for gender, international prognostic index (IPI) subgroups, IHC (CD10, BCL6, MUM1, high MIB-1 >90%, MYC, and BCL2) and for FISH findings (*BCL6* translocation and *BCL2* GCN gain). In general, $P < 0.05$ value was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using R statistical software version 4.2.0 (45) and the survminer package v0.4.9 statistical software (46).

3 Results

Table 1 summarizes the clinical characteristics of the 247 patients included. The median age at the time of diagnosis was 65 years (range: 19–91 years), 65.2% of patients were >60 years, 46.6% were male, 42.9% had an elevated serum lactate dehydrogenase and 74.1% had an advanced (stage III/IV) disease. The majority (94.7%) were treated with R-CHOP or similar regimens, the most common salvage therapies were the R-ICE and R-DHAP protocols.

TABLE 1 Characteristics of patients included.

| Total no. | n | % |
|---------------------|-----|----|
| Age (years) | | |
| ≤ 60 | 86 | 35 |
| > 60 | 161 | 65 |
| Sex | | |
| Male | 115 | 47 |
| Female | 132 | 53 |
| IPI | | |
| 0–1 | 58 | 24 |
| 2 | 69 | 28 |
| 3 | 85 | 34 |
| 4–5 | 35 | 14 |
| Presentation | | |
| Nodal | 185 | 75 |
| Extranodal | 62 | 25 |
| Stage | | |
| I-II | 64 | 26 |
| III-IV | 183 | 74 |
| ECOG PS | | |
| 0–1 | 133 | 54 |
| 2–4 | 114 | 46 |
| LDH | | |
| Normal | 141 | 57 |
| Elevated | 106 | 43 |

IPI, International Prognostic Index; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; LDH, lactate dehydrogenase.

3.1 IHC and FISH distribution, and their associations

Table 2 summarizes the IHC findings, Table 3 shows FISH distribution by COO subtypes. A total of 234 and 220 patients had available IHC and FISH data, respectively.

A positive IHC staining for MYC, BCL2, BCL6, and MUM1 protein was seen in 52.1%, 66.2%, 72.6%, and 77.8%, respectively. DEL (MYC and BCL2 co-expression) accounted for 33.3% and did not occur more frequently in the non-GCB group ($p=0.112$). High proliferation index (MIB-1 antibody >90%) was detected in 26.2%. BCL6 protein expression was significantly more common among those having high proliferation activity compared to those having low proliferation activity (82.5% vs. 69.6%, respectively, with $p=0.047$). Based on the Hans algorithm, non-GCB and GCB types accounted for 63.7% (149/234 cases) and 36.3% (85/234 cases), respectively.

With FISH, MYC translocation was detected in 16 cases (7.3%), and all of them were positive for MYC protein expression. No case of MYC translocation was found with negative MYC protein

TABLE 2 Immunohistochemical staining results by cell of origin subtypes.

| | GC, n (% of total) | NGC, n (% of total) | GC + NGC, n (% of total) |
|-------------|--------------------|---------------------|--------------------------|
| MYC | | | |
| Negative | 40 (47) | 72 (48) | 112 (48) |
| Positive | 45 (53) | 77 (52) | 122 (52) |
| BCL6 | | | |
| Negative | 6 (7) | 58 (39) | 64 (27) |
| Positive | 79 (93) | 91 (61) | 170 (73) |
| MUM1 | | | |
| Negative | 50 (59) | 2 (1) | 52 (22) |
| Positive | 35 (41) | 147 (99) | 182 (78) |
| BCL2 | | | |
| Negative | 38 (45) | 41 (28) | 79 (34) |
| Positive | 47 (55) | 108 (72) | 155 (66) |
| CD10 | | | |
| Negative | 19 (22) | 149 (100) | 168 (72) |
| Positive | 66 (78) | 0 | 66 (28) |
| DEL | | | |
| Negative | 62 (73) | 94 (63) | 156 (67) |
| Positive | 23 (27) | 55 (37) | 78 (33) |

DEL, double expressor lymphoma; GC, germinal center B-cell like; NGC, non-germinal center B-cell like.

expression. MYC translocation was statistically significantly associated with MYC protein expression ($p<0.001$) and male gender ($p=0.049$) but not with COO ($p=0.086$). There were only 4 cases (1.8%) of MYC GCN gain.

BCL2 translocation was detected in 7.3%, all were in the GCB group ($p<0.001$). However, there was no significant difference in the prevalence of BCL2 protein expression by the presence of BCL2 translocation ($p=0.194$). BCL2 translocation seemed independent of gender ($p=0.213$). BCL2 GCN gain was detected in 14.1% of cases, its presence was not significantly associated with BCL2 protein expression ($p=0.068$), COO groups ($p=0.085$), and gender ($p=0.303$).

BCL6 gene rearrangement was confirmed in 21.4%, and it was significantly associated with COO (9 with GCB and 38 with non-GCB subtype; that is, 4.1% vs. 17.3%, respectively, with a p -value of 0.006). There was no significant association of BCL6 gene rearrangement with BCL6 protein expression ($p=0.315$) or gender ($p=0.693$). There were only 2 cases with BCL6 GCN gain.

There were 4 cases (1.8%) of dual MYC and BCL2 translocations (2 cases of DEL, another two had only BCL2 protein overexpression), and all were in the GCB group.

BCL2 gene alterations were more common with DEL compared to non-DEL ($p=0.003$), whereas the ratio of MYC gene alterations was similar between the groups ($p=0.999$).

TABLE 3 Interphase fluorescent *in situ* hybridization results by cell of origin subtypes.

| | GC, n (% of total) | NGC, n (% of total) | GC + NGC, n (% of total) |
|---------------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|
| <i>IGH::BCL2</i> translocation | | | |
| Negative | 64 (80) | 140 (100) | 204 (93) |
| Positive | 16 (20) | 0 | 16 (7) |
| <i>BCL2</i> GCN gain | | | |
| Negative | 73 (91) | 116 (83) | 189 (86) |
| Positive | 7 (9) | 24 (17) | 31 (14) |
| <i>IGH::MYC</i> translocation | | | |
| Negative | 71 (89) | 133 (95) | 204 (93) |
| Positive | 9 (11) | 7 (5) | 16 (7) |
| <i>MYC</i> GCN gain | | | |
| Negative | 78 (98) | 138 (99) | 216 (98) |
| Positive | 2 (2) | 2 (1) | 4 (2) |
| <i>BCL6</i> translocation | | | |
| Negative | 71 (89) | 102 (73) | 173 (79) |
| Positive | 9 (11) | 38 (27) | 47 (21) |
| <i>BCL6</i> GCN gain | | | |
| Negative | 80 (100) | 138 (99) | 218 (99) |
| Positive | 0 | 2 (1) | 2 (1) |
| DHL | | | |
| Negative | 76 (95) | 140 (100) | 216 (98) |
| Positive | 4 (5) | 0 | 4 (2) |

GC, germinal center B-cell like; NGC, non-germinal center B-cell like; GCN, gene copy number; DHL, double hit lymphoma.

3.2 Survival

At a median follow-up of 52 months (range: 0–131 months), 140 patients (56.7%) had disease progression or relapse. The overall response rate was 78.4% and the CR rate was 47.0%. The Kaplan-Meier estimate for EFS24 was 56.2% (CI: 50.4–62.8%). The 108 patients being not event-free at 24 months had a median OS of 7.1 months (CI: 6.5–8.0 months) after progression.

Table 4 summarizes the Kaplan-Meier survival estimates for all comparisons (234 and 220 patients had available IHC and FISH data, respectively). IPI and BCL6 expression were significant predictors of OS and EFS in univariate analysis (Figures 1, 2, respectively), whereas MUM1 predicted only EFS. BCL6 rearrangement, BCL2 GCN gain, IGH::MYC translocation, and IGH::BCL2 translocation did not have any prognostic impact on survival. Subgroup analysis by COO did not change the findings, nor did we find any difference in OS and EFS by COO subtype (Figure 3). Our results showed no difference in the 5-year survival in low-stage (I-II) and high-stage disease according to the COO. BCL6 rearrangement did not predict OS and EFS in the non-GCB subgroup. DEL phenotype did not predict OS or EFS. We did not find any impact of double protein expression using MYC and BCL2 on the OS in low and high-stage diseases. The rate of double-hit lymphoma in this cohort of patients was 1.8% and the median OS for these group of patients was 33.8 months.

Table 5 summarizes the findings of the multivariate analysis of 220 patients. IPI score was a significant independent negative, whereas MIB-1 and BCL6 protein expressions were significant independent positive predictors of both OS and EFS.

4 Discussion

The clinical and genetic heterogeneity of DLBCL still presents challenges in predicting response to treatment and prognosis. The

TABLE 4 Kaplan Meier estimates and log-rank tests for overall survival and event-free survival.

| | Overall survival | | | Event-free survival | | |
|--------------------|-------------------------------|-----------|---------------------------|-------------------------------|-----------|---------------------------|
| | Median survival time (months) | 95% CI | p-value for log rank test | Median survival time (months) | 95% CI | p-value for log rank test |
| Gender | | | | | | |
| Male | 44 | 29.1–98.8 | 0.99 | 42 | 24–n.a. | 0.65 |
| Female | 48 | 36.5–79 | | 39 | 18.7–n.a. | |
| IPI | | | | | | |
| IPI 0–1 | n.a. | n.a. | <0.0001* | n.a. | n.a.–n.a. | <0.0001* |
| IPI 2 | 60 | 39.6–n.a. | | n.a. | 35–n.a. | |
| IPI 3–5 | 18 | 14–29 | | 10 | 4–20.2 | |
| COO subtype | | | | | | |

(Continued)

TABLE 4 Continued

| | Overall survival | | | Event-free survival | | |
|----------------------------------|-------------------------------|-----------|---------------------------|-------------------------------|-----------|---------------------------|
| | Median survival time (months) | 95% CI | p-value for log rank test | Median survival time (months) | 95% CI | p-value for log rank test |
| GC | 55.9 | 43.8–n.a. | 0.34 | n.a. | 30–n.a. | 0.16 |
| NGC | 36.8 | 26–66 | | 33.7 | 15–n.a. | |
| CD10 expression | | | | | | |
| Negative | 39.8 | 32–77 | 0.49 | 37.5 | 20–n.a. | 0.35 |
| Positive | 53 | 40–n.a. | | n.a. | 22–n.a. | |
| BCL6 expression | | | | | | |
| Negative | 23 | 12.3–40 | 0.0007* | 13 | 0–35 | 0.002* |
| Positive | 60.5 | 44–113 | | n.a. | 38–n.a. | |
| MUM1 expression | | | | | | |
| Negative | 82 | 50–n.a. | 0.054 | n.a. | 56–n.a. | 0.009* |
| Positive | 36.5 | 26–55.9 | | 31 | 17–95 | |
| Double expressor lymphoma | | | | | | |
| Negative | 48.1 | 36.5–84 | 0.4 | 44 | 26.3–n.a. | 0.46 |
| Positive | 38.5 | 16–102 | | 38 | 8–n.a. | |
| MIB-1 index | | | | | | |
| ≤ 90% | 40 | 29–60.5 | 0.071 | 30 | 16–95 | 0.072 |
| > 90% | 77 | 32.7–n.a. | | n.a. | 36–n.a. | |
| MYC expression | | | | | | |
| Negative | 44 | 32.7–77 | 0.8 | 37.5 | 21.2–n.a. | 0.9 |
| Positive | 50 | 32–102 | | 48 | 20–n.a. | |
| BCL2 expression | | | | | | |
| Negative | 60.5 | 32.7–n.a. | 0.26 | 56 | 24–n.a. | 0.46 |
| Positive | 42 | 32–63 | | 38 | 20–n.a. | |
| BCL6 translocation | | | | | | |
| Negative | 42.9 | 32–79 | 0.66 | 39 | 22–n.a. | 0.37 |
| Positive | 29.1 | 15–n.a. | | 17 | 7–n.a. | |
| BCL2 GCN gain | | | | | | |
| Negative | 44 | 35–79.1 | 0.97 | 39 | 27–n.a. | 0.54 |
| Positive | 32 | 23.1–n.a. | | 18 | 9–n.a. | |

CI, confidence interval; IPI, International Prognostic Index; COO, cell of origin; GC, germinal center B-cell like; NGC, non-germinal center B-cell like; GCN, gene copy number; n.a: median survival time not reached or data are insufficient for calculation. Asterisks indicate statistical significance.

2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms made it mandatory to classify the molecular subgroups of DLBCL into GCB and ABC subtypes (37) and this remains unchanged in the WHO 5th edition published in 2023 (38). However, 10–15% of DLBCL cases cannot be categorized into one of the two COO groups and are termed unclassified DLBCL using gene expression studies. In the current study, we used IHC and FISH techniques on samples from DLBCL patients to classify

rituximab-treated patients in many ways including by COO. Then, we interpreted survival data in this context.

In our cohort of patients, the COO phenotype failed to predict prognosis, which is surprising knowing that some studies have demonstrated significantly better survival for the GCB group (47, 48). However, the prognostic value of COO remains controversial, and other authors did not report any differences in overall prognosis based on COO, in line with our observations (49–51). Table 6.

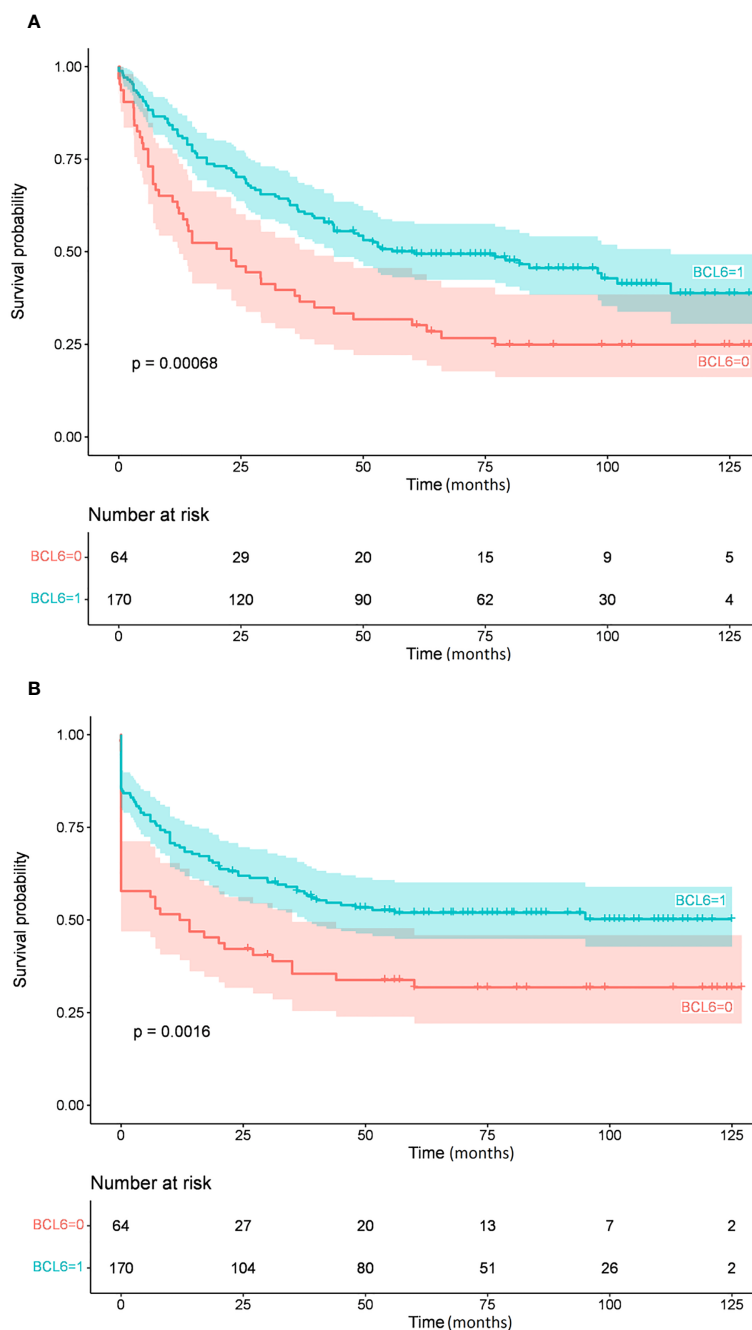


FIGURE 1
Overall survival (A) and event-free survival (B) by BCL6 protein expression.

summarizes the COO distribution and survival data of DLBCL patients according to the immunophenotyping results reported in our study and other published reports. The controversy of the literature may be explained by many factors including but not restricted to the retrospective nature of the studies with a mixed pool of patients receiving various treatment regimens, in addition to a relatively short follow-up period (52).

Factors that were independently associated with EFS in the multivariate analysis were IPI, high MIB-1 (>90%), and BCL6 expression. According to our results, BCL6 protein overexpression carries a positive prognostic effect on OS and EFS.

BCL6 protein expression is considered as a hallmark of GC origin in DLBCL and it is associated with favorable outcome reported by some studies, consistent with our results (8, 19, 53–56). However, our findings demonstrated no significant association between BCL6 protein expression and *BCL6* translocation. In our study, the frequency of *BCL6* gene rearrangement was 21.4% and most of the cases were stratified into the non-GCB group according to the Hans algorithm. The association between the *BCL6* gene alteration and non-GCB phenotype was confirmed by other studies as well (17, 20, 57, 58). In our study, *BCL6* rearrangement had no prognostic impact on OS or EFS. Other studies yielded conflicting

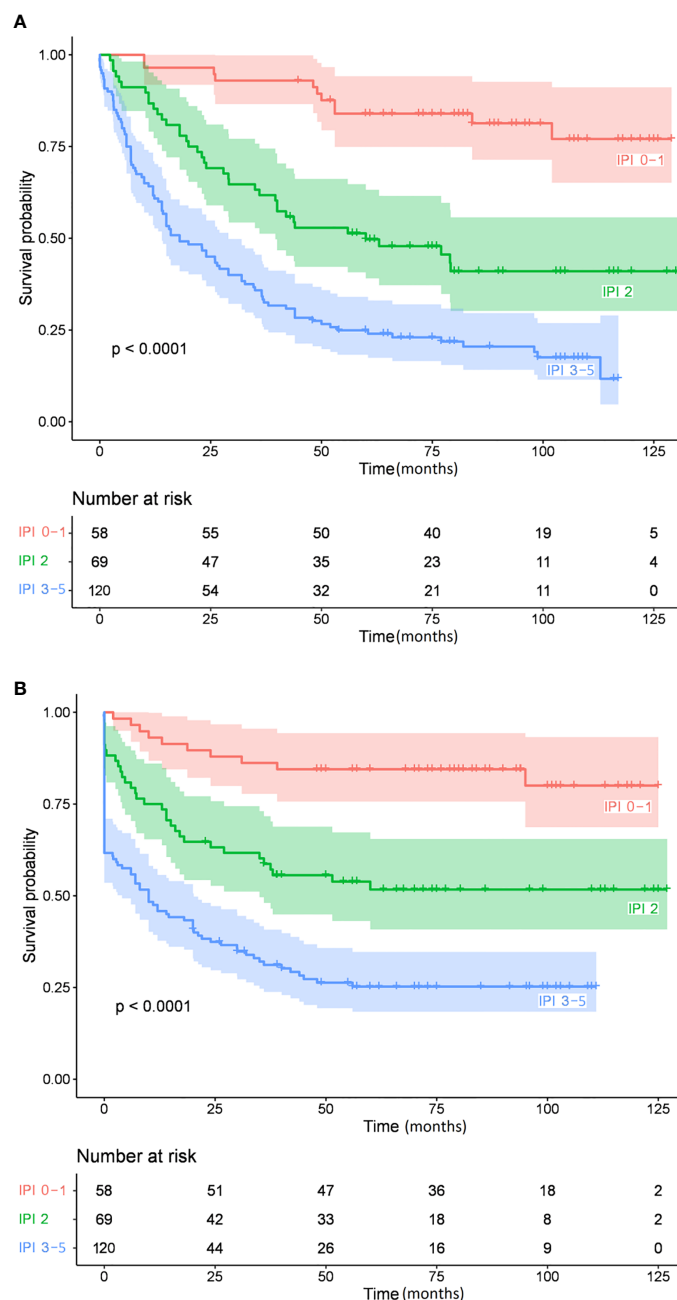


FIGURE 2
Overall survival (A) and event-free survival (B) by the International Prognostic Index.

results showing that *BCL6* rearrangement was associated with a worse outcome (20, 59–63), reporting no significant associations at all (64–67), or implying an association with favorable outcomes (68, 69).

BCL2, *MUM1*, and *MYC* protein expressions did not emerge as independent prognostic variables in multivariate analysis. Unlike the high proliferation index (>90%) detected by MIB-1 antibody, which proved to be an independent predictor of good prognosis regarding OS and EFS. We did not find any significant difference in OS and EFS of DEL cases compared to the non-DEL cases.

Our finding suggesting no impact of *BCL2* expression on the prognosis of patients with DLBCL is in line with the results of some previous publications (8, 70–73). However, other researchers have observed adverse outcomes with *BCL2* protein overexpression (17, 26, 27, 74). In addition, in our study, there was no significant association between *BCL2* protein expression and *BCL2* gene aberrations.

Finally, even in the rituximab era, there are still significant differences in OS and EFS across the IPI groups.

Our study has several strengths and limitations. The major strength of our work includes the size and coverage of the study

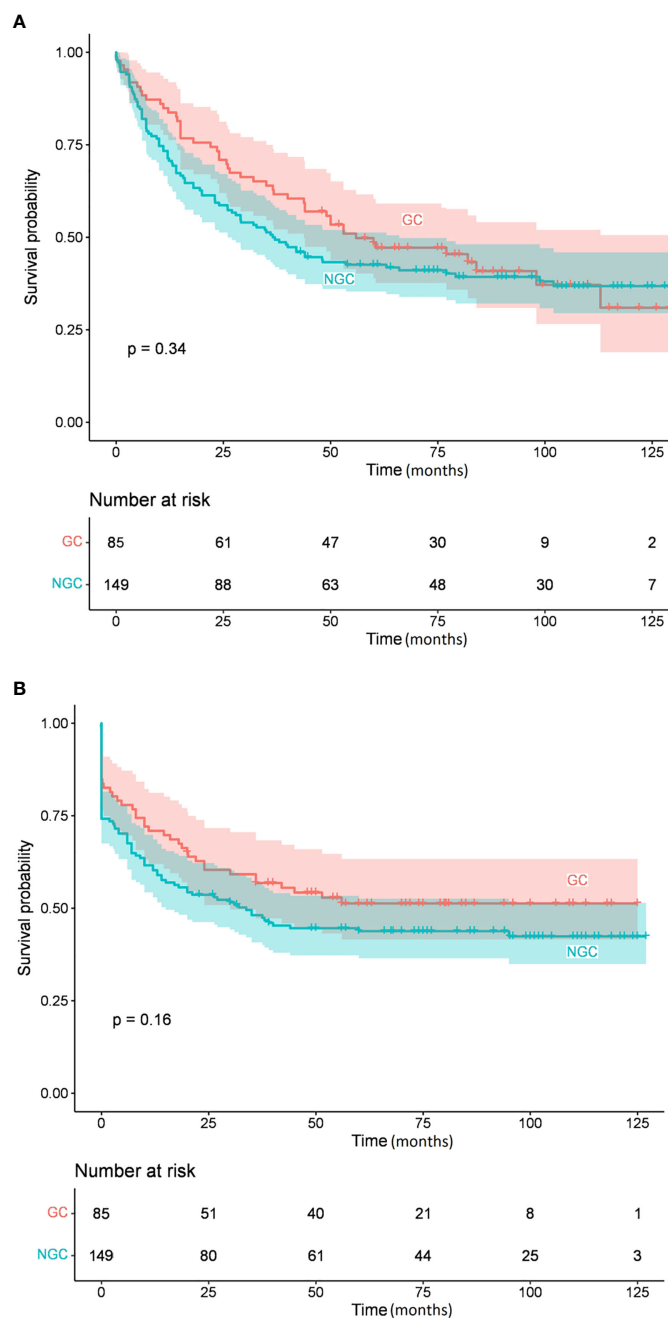


FIGURE 3
Overall survival (A) and event-free survival (B) by cell of origin subgroups.

population (247 DLBCL cases from 7 Hungarian centers), allowing a detailed and representative survival analysis. The major limitation of our work is the study's retrospective design, which, as reflected by the number of excluded patients, resulted in lack of a full dataset in some analyses.

5 Conclusion

Successful integration of predictive and prognostic tools in DLBCL trials requires combination of clinical and molecular

factors. Our study provides additional support to previously reported publications that DLBCL is characterized by heterogeneous molecular features and clinical outcomes. Based on our findings, only the IPI, BCL6 expression by IHC, and high (>90%) MIB-1 expression and not the other markers analyzed (CD10, BCL2, MUM1, MYC positivity, and gender) are independent predictors of OS and EFS in DLBCL. We did not find any difference in survival by GCB vs. non-GCB subtypes. These findings may improve prognostication in DLBCL and can contribute to designing further research in the area. However, considering the limitations of our study, these findings should be validated in prospective series.

TABLE 5 Multivariate Cox regression analysis for overall survival and event-free survival.

| | Overall survival | | | Event-free survival | | |
|---------------------------|------------------|--------------|---------|---------------------|--------------|---------|
| | HR | CI | P-value | HR | CI | P-value |
| Gender | 0.723 | 0.501–1.106 | 0.094 | 0.817 | 0.551–1.212 | 0.315 |
| IPI | | | | | | |
| IPI 1 | ref. | | | ref. | | |
| IPI 2 | 4.732 | 1.952–11.474 | <0.001* | 3.698 | 1.502–9.106 | 0.004* |
| IPI 3–5 | 10.451 | 4.515–24.193 | <0.001* | 8.600 | 3.702–19.976 | <0.001* |
| CD10 expression | 1.581 | 0.975–2.566 | 0.063 | 1.626 | 0.975–2.713 | 0.063 |
| BCL6 expression | 0.649 | 0.425–0.990 | 0.045* | 0.623 | 0.398–0.976 | 0.039* |
| MUM1 expression | 1.194 | 0.694–2.053 | 0.523 | 1.454 | 0.789–2.679 | 0.230 |
| MIB-1>90% | 0.581 | 0.364–0.927 | 0.023* | 0.597 | 0.367–0.971 | 0.038* |
| MYC expression | 1.071 | 0.724–1.585 | 0.732 | 1.141 | 0.758–1.719 | 0.528 |
| BCL2 expression | 0.993 | 0.656–1.503 | 0.973 | 0.952 | 0.6183–1.466 | 0.824 |
| BCL6 translocation | 0.967 | 0.617–1.514 | 0.883 | 1.057 | 0.667–1.676 | 0.813 |
| BCL2 GCN gain | 0.984 | 0.589–1.643 | 0.950 | 1.105 | 0.649–1.882 | 0.713 |

For molecular markers, the reference group is always the 'negative' group. Asterisks indicate statistical significance. IPI, International Prognostic Index; ref, reference; GCN, gene copy number.

TABLE 6 Distribution and survival data of DLBCL patients included in different studies according to immunophenotype.

| Study group | n (%) | Survival data | P-value |
|-----------------------------|----------|---------------------------|---------|
| Our study | | 5-year OS (%) | |
| GC | 85 (36) | 48.5 | NS |
| NGC | 149 (64) | 42.6 | |
| Hans et al. (8) | | 5-year OS (%) | |
| GC | 64 (42) | 76 | <0.001* |
| NGC | 88 (58) | 34 | |
| Barrans et al. (47) | | 5-year OS (%) | |
| GC | 59 (35) | 68 | 0.02* |
| NGC | 110 (65) | 58 | |
| Chang et al. (48) | | Median OS (months) | |
| GC | 15 (39) | not reached | <0.08* |
| Activated GC | 12 (32) | 15–26 | |
| NGC | 11 (29) | 38–40 | |
| Colomo et al. (49) | | 5-year OS (%) | |
| CD10+GC | 24 (21) | 40 | NS |
| CD10-GC | 30 (26) | 54 | |
| NGC | 60 (53) | 42 | |
| Chadburn et al. (51) | | 1-year OS (%) | |
| GC | 33 (59) | 70 | NS |
| NGC | 23 (41) | 75 | |

GC, germinal center B-cell like; NGC, non-germinal center B-cell like; OS, overall survival; NS, not significant. Asterisks indicate statistical significance.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by The Committee of Science and Research Ethics (ETT-TUKEB) under reference number 50268-8/2017. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

HA, IV-N, BA, and LP designed the research; NF and ZS analyzed data; HA, BA, and ZS drafted the manuscript; HA, LP, BA, IV-N, ZR, AG, BK, LK and ZS reviewed and approved the final version of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

The research was supported by the NVKP_16-1-2016-0005 project of National Research and Development Office, Hungary as

References

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. (2008). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon, France: IARC.
2. Sujobert P, Salles G, Bachy E. Molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma: what is clinically relevant? *Hematol Oncol Clin North Am* (2016) 30(6):1163–77. doi: 10.1016/j.hoc.2016.07.001
3. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruvilla J, Westin J, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood* (2017) 130(16):1800–8. doi: 10.1182/blood-2017-03-769620
4. Maurer MJ, Ghesquières H, Jais JP, Witzig TE, Haioun C, Thompson CA, et al. Event-free survival at 24 months is a robust end point for disease-related outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *J Clin Oncol* (2014) 32(10):1066–73. doi: 10.1200/JCO.2013.51.5866
5. Jakobsen LH, Bøgsted M, Brown PN, Arboe B, Jørgensen J, Larsen TS, et al. Minimal loss of lifetime for patients with diffuse large B-cell lymphoma in remission and event free 24 months after treatment: A danish population-based study. *J Clin Oncol* (2017) 35(7):778–84. doi: 10.1200/JCO.2016.70.0765
6. Ritter Z, Papp L, Zámbo K, Tóth Z, Dezső D, Veres DS, et al. Two-year event-free survival prediction in DLBCL patients based on *in vivo* radiomics and clinical parameters. *Front Oncol* (2022) 12:820136. doi: 10.3389/fonc.2022.820136
7. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* (2000) 403(6769):503–11. doi: 10.1038/35000501
8. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* (2004) 103(1):275–82. doi: 10.1182/blood-2003-05-1545
9. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into

well as the EFOP-3.6.1-16-2016-0004 and the MTA PAB Clinicopathology WG.

Acknowledgments

The authors thank the patients, all primary treating physicians, nursing and laboratory staff members who participated in this multicenter trial for their excellent cooperation.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res* (2009) 15(17):5494–502. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0113

10. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol* (2011) 29(2):200–7. doi: 10.1200/JCO.2010.30.0368

11. Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih CJ, Walsh W, Jaffe ES, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood* (2014) 123(8):1214–7. doi: 10.1182/blood-2013-11-536433

12. Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, Chaganti RS, et al. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* (1993) 262:747–50. doi: 10.1126/science.8235596

13. Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, et al. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* (1995) 86:45–53. doi: 10.1182/blood.V86.1.45.bloodjournal86145

14. Chang CC, Ye BH, Chaganti RS, Dalla-Favera R. BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1996) 93(14):6947–52. doi: 10.1073/pnas.93.14.6947

15. Cattoretti G, Pasqualucci L, Ballon G, Tam W, Nandula SV, Shen Q, et al. Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell* (2005) 7(5):445–55. doi: 10.1016/j.ccr.2005.03.037

16. Jerkeman M, Aman P, Cavallin-Stahl E, Torlakovic E, Akerman M, Mitelman F, et al. Prognostic implications of BCL6 rearrangement in uniformly treated patients with diffuse large B-cell lymphoma—a Nordic Lymphoma Group study. *Int J Oncol* (2002) 20(1):161–5. doi: 10.3892/ijo.20.1.161

17. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, van Krieken JH, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* (1998) 92(9):3152–62. doi: 10.1182/blood.V92.9.3152

18. Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, Lenormand B, Rossi A, Pezzella F, et al. LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood* (1994) 83:2423–7. doi: 10.1182/blood.V83.9.2423.2423
19. Winter JN, Weller EA, Horning SJ, Krajewska M, Variakojis D, Habermann TM, et al. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood* (2006) 107:4207–13. doi: 10.1182/blood-2005-10-4222
20. Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA, Davies FE, Owen RG, Haynes AP, et al. Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* (2002) 117(2):322–32. doi: 10.1046/j.1365-2141.2002.03435.x
21. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2014) 15(1):49–63. doi: 10.1038/nrm3722
22. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* (1988) 335(6189):440–2. doi: 10.1038/335440a0
23. Letai AG. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat Rev Canc* (2008) 8(2):121–32. doi: 10.1038/nrc2297
24. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* (1985) 228(4706):1440–3. doi: 10.1126/science.3874430
25. Delbridge AR, Grabow S, Strasser A, Vaux DL. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Canc* (2016) 16(2):99–109. doi: 10.1038/nrc.2015.17
26. Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Tai YC, Li Y, et al. Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica* (2013) 98(2):255–63. doi: 10.3324/haematol.2012.066209
27. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TF, Bernd HW, Feller AC, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* (2013) 121(12):2253–63. doi: 10.1182/blood-2012-06-435842
28. Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, Johnson NA, Vose JM, Greiner TC, et al. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res* (2011) 17(24):7785–95. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0267
29. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, et al. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* (2006) 24(6):961–8. doi: 10.1200/JCO.2005.03.4264
30. Chisholm KM, Bangs CD, Bacchi CE, Molina-Kirsch H, Cherry A, Natkunam Y. Expression profiles of MYC protein and MYC gene rearrangement in lymphomas. *Am J Surg Pathol* (2015) 39(3):294–303. doi: 10.1097/PAS.0000000000000365
31. Karube K, Campo E. MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Hematol* (2015) 52(2):97–106. doi: 10.1053/j.seminhematol.2015.01.009
32. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Canc* (2008) 8(12):976–90. doi: 10.1038/nrc2231
33. Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Canc* (2002) 2(10):764–76. doi: 10.1038/nrc904
34. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinha P, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood* (2009) 114(17):3533–7. doi: 10.1182/blood-2009-05-220095
35. Barrans S, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol* (2010) 28(20):3360–5. doi: 10.1200/JCO.2009.26.3947
36. Zhang HW, Chen ZW, Li SH, Bai W, Cheng NL, Wang JF. Clinical significance and prognosis of MYC translocation in diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* (2011) 29(4):185–9. doi: 10.1002/hon.991
37. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* (2016) 127(20):2375–90. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569
38. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBO, Berti E, et al. The 5th edition of the world health organization classification of haematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms. *Leukemia* (2022) 36(7):1720–48. doi: 10.1038/s41375-022-01620-2
39. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* (2012) 30(28):3452–9. doi: 10.1200/JCO.2011.41.0985
40. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. The Strengthening of Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol*. (2008) 61(4):344–9. doi: 10.1016/j.jclinepi.2007.11.008
41. Pajor G, Kajtár B, Pajor L, Alpár D. State-of-the-art FISHing: automated analysis of cytogenetic aberrations in interphase nuclei. *Cytomet A*. (2012) 81(8):649–63. doi: 10.1002/cyto.a.22082
42. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol* (1989) 7(11):1630–6. doi: 10.1200/JCO.1989.7.11.1630
43. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol* (2014) 32(27):3059–68. doi: 10.1200/JCO.2013.54.8800
44. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et al. Revised response criteria for Malignant lymphoma. *J Clin Oncol* (2007) 25(5):579–86. doi: 10.1200/JCO.2006.09.2403
45. R Core Team. (2022). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <https://www.R-project.org> [Accessed February 6, 2023].
46. Kassambara. (2021). *Computing*. Vienna, Austria Available at: <https://www.R-project.org/> [Accessed February 6, 2023].
47. Barrans SL, Carter I, Owen RG, Davies FE, Patmore RD, Haynes AP, et al. Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* (2002) 99(4):1136–43. doi: 10.1182/blood.v99.4.1136
48. Chang CC, McClintock S, Cleveland RP, Trzypuc T, Vesole DH, Logan B, et al. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* (2004) 28(4):464–70. doi: 10.1097/00000478-200404000-00005
49. Colomo L, López-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martínez A, Bosch F, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* (2003) 101(1):78–84. doi: 10.1182/blood-2002-04-1286
50. Lindererth J, Jerkeman M, Cavallin-Ståhl E, Kvaløy S, Torlakovic E. Nordic Lymphoma Group Study. Immunohistochemical expression of CD23 and CD40 may identify prognostically favorable subgroups of diffuse large B-cell lymphoma: a Nordic Lymphoma Group Study. *Clin Cancer Res* (2003) 9(2):722–8.
51. Chadburn A, Chiu A, Lee JY, Chen X, Hyjek E, Banham AH, et al. Immunophenotypic analysis of AIDS-related diffuse large B-cell lymphoma and clinical implications in patients from AIDS Malignancies Consortium clinical trials 010 and 034. *J Clin Oncol* (2009) 27(30):5039–48. doi: 10.1200/JCO.2008.20.5450
52. Dunleavy K, Wilson WH. Role of molecular subtype in predicting outcome of AIDS-related diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* (2010) 28(16):e260. doi: 10.1200/JCO.2009.27.7087
53. Takeshita M, Iwashita A, Kurihara K, Ikejiri K, Higashi H, Udo T, et al. Histologic and immunohistologic findings and prognosis of 40 cases of gastric large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* (2000) 24(12):1641–9. doi: 10.1097/00000478-200012000-00008
54. Lossos IS, Jones CD, Warnke R, Natkunam Y, Kaizer H, Zehnder JL, et al. Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* (2001) 98(4):945–51. doi: 10.1182/blood.v98.4.945
55. Advani P, Ngamphaiboon N, Pukiat S, Chavez J, Deeb G, Elefante A, et al. The expression of bcl-6 in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is associated with improved progression free survival and overall survival following front-line rituximab-chemotherapy. *Blood* (2010) 116(21):5073. doi: 10.1182/blood.v116.21.5073.5073
56. Iqbal J, Greiner TC, Patel K, Dave BJ, Smith L, Ji J, et al. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* (2007) 21(11):2332–43. doi: 10.1038/sj.leu.2404856
57. Copie-Bergman C, Gaulard P, Leroy K, Briere J, Baia M, Jais JP, et al. Immunofluorescence *in situ* hybridization index predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: a GELA study. *J Clin Oncol* (2009) 27(33):5573–9. doi: 10.1200/JCO.2009.22.7058
58. Shustik J, Han G, Farinha P, Johnson NA, Ben Neriah S, Connors JM, et al. Correlations between BCL6 rearrangement and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP or R-CHOP. *Haematologica* (2010) 95(1):96–101. doi: 10.3324/haematol.2009.007203
59. Gao P, Li Q, Wang Z, Yan F, Lu C, Cao X. [Significance of BCL6, MYC, P53 genes abnormalities for the prognosis of diffuse large B-cell lymphoma]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. (2014) 31(5):628–31. doi: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2014.01.020
60. Akyurek N, Uner A, Benekli M, Barista I. Prognostic significance of MYC, BCL2, and BCL6 rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus rituximab. *Cancer* (2012) 118(17):4173–83. doi: 10.1002/cncr.27396
61. Akasaka T, Ueda C, Kurata M, Akasaka H, Yamabe H, Uchiyama T, et al. Nonimmunoglobulin (non-Ig)/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig/BCL6. *Blood* (2000) 96(8):2907–9. doi: 10.1182/blood.V96.8.2907

62. Liang X, Wang J, Bai W, Sun R. Expression of CD68, cyclin D1 and rearrangement of bcl-6 gene are adverse prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. (2015) 44(8):559–64. Chinese.
63. Li S, Wang Z, Lin L, Wu Z, Yu Q, Gao F, et al. BCL6 rearrangement indicates poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients: A meta-analysis of cohort studies. *J Canc* (2019) 10(2):530–8. doi: 10.7150/jca.25732
64. Chen PM, Yang MH, Yu IT, Lin JT, Lin YC, Fan FS, et al. Low incidence of BCL-6 gene alterations for diffuse large B-cell lymphomas in Taiwan Chinese. *Cancer* (2002) 94(10):2635–44. doi: 10.1002/cncr.10545
65. Pedersen MO, Gang AO, Brown P, Pedersen M, Knudsen H, Nielsen SL, et al. Real world data on young patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP or R-CHOEP - MYC, BCL2 and BCL6 as prognostic biomarkers. *PLoS One* (2017) 12(10):e0186983. doi: 10.1371/journal.pone.0186983
66. Ye Q, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Deng L, Wang X, Manyam GC, et al. Prognostic impact of concurrent MYC and BCL6 rearrangements and expression in *de novo* diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* (2016) 7(3):2401–16. doi: 10.18632/oncotarget.6262
67. Battle-López A, González de Villambrosía S, Francisco M, Malatxeberria S, Sáez A, Montalban C, et al. Stratifying diffuse large B-cell lymphoma patients treated with chemioimmunotherapy: GCB/non-GCB by immunohistochemistry is still a robust and feasible marker. *Oncotarget* (2016) 7(14):18036–49. doi: 10.18632/oncotarget.7495
68. Niitsu N, Okamoto M, Nakamura N, Nakamine H, Aoki S, Hirano M, et al. Prognostic impact of chromosomal alteration of 3q27 on nodal B-cell lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 329 consecutive patients. *Leuk Res* (2007) 31(9):1191–7. doi: 10.1016/j.leukres.2006.11.004
69. Offit K, Lo Coco F, Louie DC, Parsa NZ, Leung D, Portlock C, et al. Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med* (1994) 331(2):74–80. doi: 10.1056/NEJM199407143310202
70. Tang SC, Visser L, Hepperle B, Hanson J, Poppema S. Clinical significance of bcl-2-MBR gene rearrangement and protein expression in diffuse large-cell non-Hodgkin's lymphoma: an analysis of 83 cases. *J Clin Oncol* (1994) 12(1):149–54. doi: 10.1200/JCO.1994.12.1.149
71. Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Vaughan Hudson B, Burke M, Clarke P, et al. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* (1996) 88(3):1046–51. doi: 10.1182/blood.V88.3.1046.1046
72. Sanchez E, Chacon I, Plaza MM, Munoz E, Cruz MA, Martinez B, et al. Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *J Clin Oncol* (1998) 16(5):1931–9. doi: 10.1200/JCO.1998.16.5.1931
73. Zhang A, Ohshima K, Sato K, Kanda M, Suzumiya J, Shimazaki K, et al. Prognostic clinicopathologic factors, including immunologic expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Pathol Int* (1999) 49(12):1043–52. doi: 10.1046/j.1440-1827.1999.00980.x
74. Kawamoto K, Miyoshi H, Yoshida N, Nakamura N, Ohshima K, Sone H, et al. MYC translocation and/or BCL 2 protein expression are associated with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci* (2016) 107(6):853–61. doi: 10.1111/cas.12942

Scientific Article

⁹⁰Y-ibritumomab Tiuxetan in B-cell Non-Hodgkin Lymphomas: Real-world Data From the United Arab Emirates



Zsolt Szakács, MD, PhD,^a Amar Lal, MD,^b Jorgen Kristensen, MD, PhD,^c Nelli Farkas, PhD,^{d,e} Zsombor Ritter, MD,^f Szabolcs Kiss, MD,^{d,g} Hussain Alizadeh, MD, PhD,^{a,1,*} and Anett Balikó, MD^{h,1}

^aDivision of Hematology, First Department of Medicine, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary; ^bTawam Hospital (in affiliation with Johns Hopkins Medicine), Al Ain, United Arab Emirates; ^cSheikh Khalifa Medical City, Al Tibbiya, Abu Dhabi, United Arab Emirates; ^dInstitute for Translational Medicine, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary; ^eInstitute of Bioanalysis, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary; ^fDivision of Nuclear Medicine, Department of Medical Imaging, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary; ^gDoctoral School of Clinical Medicine, University of Szeged, Szeged, Hungary; ^hTolna County Balassa János Hospital (in affiliation with Medical School, University of Pécs), Szekszárd, Hungary

Received July 7, 2021; accepted December 15, 2021

Abstract

Purpose: B-cell non-Hodgkin lymphomas (NHLs) are significant contributors to cancer-related mortality. In this single-arm, retrospective cohort study, we aimed to examine the outcomes of a radioimmunotherapeutic modality, ⁹⁰Y-labeled ibritumomab tiuxetan (⁹⁰YIT) in B-cell NHLs.

Methods and Materials: We conducted this study based on data from the United Arab Emirates lymphoma registry. All patients with NHL subjected to ⁹⁰YIT were eligible for inclusion. The country of research lacked a national autologous stem cell transplantation (ASCT) center, but many ASCT-eligible patients received ⁹⁰YIT. We investigated overall survival (OS) and event-free survival (EFS), as well as safety outcomes.

Results: Between 2004 and 2008, 54 of 111 patients with B-cell NHL received radioimmunotherapy. The therapy was applied as first-line treatment in 18 cases (33.3%) and second- or later-line treatment in 36 cases (66.7%). All patients were evaluable for response. The first-line group consisted mainly of follicular lymphoma cases, and 3 of 18 patients died (16.7%) during the follow-up (range, 22-67 months). Median OS was not reached. No progression occurred after treatment (median EFS, 36.5 months [Q₁-Q₃ range, 30.5-44 months]). The second- or later-line group consisted mainly of diffuse large B-cell lymphoma cases, and 3 of 36 patients died (8.3%) during the follow-up (range, 4-68 months). Median OS was not reached. One case of progression was registered (median EFS: 33 months [Q₁-Q₃ range, 30.5-44 months]). ⁹⁰YIT had acceptable short- and long-term safety profiles.

Conclusions: The findings suggest that patients with NHL may benefit from ⁹⁰YIT as salvage treatment if ASCT is not available; however, this should be validated in randomized studies.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of American Society for Radiation Oncology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Sources of support: This work had no specific funding.

Disclosures: none.

Data sharing statement: All data are available within the supplementary material.

*Corresponding author: Hussain Alizadeh, MD, PhD; E-mail: alizadeh.hussain@pte.hu

¹ H.A. and A.B. contributed equally to this work.

Introduction

Lymphoma encompasses an array of heterogeneous neoplasms that originate in lymphoid tissues, but may arise in almost any tissue. The 2016 classification of the

<https://doi.org/10.1016/j.adro.2021.100882>

2452-1094/© 2021 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of American Society for Radiation Oncology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

World Health Organization distinguishes, among others, mature B-cell neoplasms,¹ which account for the vast majority of non-Hodgkin lymphomas (NHLs).² Based on data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results program, the age-adjusted incidence of NHL was 18.6 per 100,000 persons with a death rate of 5.3 per 100,000 persons in the United States in 2017, and NHLs were estimated to be responsible for 4.3% of all cancer cases and 3.3% of cancer-related deaths in 2020. Although the 5-year survival has prolonged to 72.7% (2010–2016), one-third of patients are diagnosed at an advanced stage (<https://seer.cancer.gov/>).³

Among NHLs, diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and follicular lymphoma (FL) are the 2 most common subtypes, representing approximately 30% and 20% of cases, respectively.² In the native Arab population, data from the United Arab Emirates lymphoma registry showed that 59% and 7% of cases were DLBCL and FL, respectively.⁴ In the United States, DLBCL has an expected 5-year survival rate of 63.8%, and the rate of FL is 89.0% (<https://seer.cancer.gov/>).

In B-cell NHLs, conventional chemotherapy combined with rituximab (a monoclonal antibody targeting cluster of differentiation 20 [CD20] molecules on the cell surface), radiation therapy, high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation (ASCT), and other target therapies offer a wide range of therapeutic options.^{2,5} Despite the inherent sensitivity of most NHLs to initial chemoimmunotherapy, a high percentage of cases eventually relapse and patients die of their disease.⁶ In many cases, radioimmunotherapy (RIT) is a promising therapeutic option. The most commonly used ⁹⁰Y-labeled ibritumomab tiuxetan (⁹⁰YIT) consists of an anti-CD20 murine monoclonal antibody conjugated with a radioactive isotope (⁹⁰yttrium) purely emitting beta particle (2.293 MeV; 2.6 days isotope half-life). The molecule specifically binds to CD20 positive cells, expressed in 98% to 99% of B-cell NHLs,⁷ minimizing the drug's uptake on normal tissues.⁸

In 2002, the results of a randomized controlled trial (RCT) were released, showing that ⁹⁰YIT proved to be superior over rituximab regarding overall response rate and complete response in relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed CD20 positive NHLs.⁹ That year, ⁹⁰YIT became the first RIT modality approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in the United States.¹⁰ According to the drug label, ⁹⁰YIT is indicated “for the treatment of relapsed or refractory, low-grade, or follicular B-cell NHLs” and “for the treatment of previously untreated follicular NHL in patients who achieve a partial or complete response to first-line chemotherapy.”¹¹ Since then, RCTs have proven that ⁹⁰YIT is effective as consolidation after induction of remission^{12,13} and as pre-treatment before ASCT in patients with NHLs.¹⁴

The current guidelines of the European Society for Medical Oncology (ESMO) do not mention RIT as a

therapeutic option for DLBCL¹⁵ and marginal zone lymphoma,¹⁶ and do not recommend RIT as stand-alone therapy for induction (stage IIIB). The guidelines do propose RIT as a potential therapeutic option in patients after multiple relapses in the elderly (>65 years) in mantle cell lymphoma.¹⁷ In FL, ESMO preserves RIT mainly for selected, advanced (stage III–IV) cases. As a first-line therapy, RIT can be given for induction in low-risk FL if conventional chemotherapy is contraindicated (stage IIIC), and may be considered for consolidation as an alternative for rituximab (stage IIB). In relapsing/progressing FL, RIT may be an option for patients with comorbidities who are not eligible for chemotherapy (stage IVB).¹⁸

In this study, we aimed to examine the efficacy and safety of ⁹⁰YIT in a unique hospital setting using data from the United Arab Emirates lymphoma registry, where the indication of RIT was far broader than that approved by the FDA or the ESMO guidelines.

Methods and Materials

The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki (last amended in Fortaleza, Brazil, 2013).

Study design and data sources

This study is a single-arm, retrospective cohort study of data on consecutive patients from regional hospitals in the United Arab Emirates lymphoma registry. Patients diagnosed between 2004 and 2008 were identified based on International Classification of Diseases 10th Revision codes in the United Arab Emirates registry.

Population and exposure

All patients with CD20 positive, B-cell NHLs were screened to identify those who received ⁹⁰YIT. In all cases, the diagnoses were made based on histopathology test results from lymph node or other tissue biopsy samples. All histologic samples were reported by 2 hematopathologists (cosigned), and all diagnoses were based on the 3rd (2001) and 4th (2008) editions of the World Health Organization Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues.^{19,20} Staging was performed per the Ann-Arbor classification.²¹

The indications of ⁹⁰YIT were far broader than those approved by the FDA, because the country of research lacks a national center for ASCT (available only at remote centers). At the same time, most of our patients were expatriates with difficult financial conditions. Considering these facts, the United Arab Emirates provided full support and all ⁹⁰YIT expenses were generously sponsored.

RIT-eligible patients included patients with early-stage (I-II), nonbulky, indolent B-cell NHL in whom limited field radiation therapy or rituximab monotherapy was planned (most patients refused external beam radiation therapy); patients who had relapsed FL after rituximab-containing systemic chemoimmunotherapy or had a transformation from FL to an aggressive B-cell NHL (with nonbulky disease and absence of significant bone marrow involvement); and patients with primary DLBCL who relapsed after induction treatment with rituximab-based chemoimmunotherapy and those whose disease relapsed in extranodal sites with less than 25% involvement of bone marrow.

Assessment of remission status before treatments was based on the Cheson (1999)²² and revised Cheson criteria (2007).²³ First, ⁹⁰YIT-treated patients were preloaded with unlabeled rituximab as an infusion of 250 mg/m² on days 1 and 8. Then, on day 8, a therapeutic dose (14.8 MBq/kg; 45 patients) or reduced dose (11.1 MBq/kg; 9 patients, because of advanced age, hypocellular bone marrow, >3 lines of previous chemotherapy, and poor performance status) of ⁹⁰YIT was administered as an intravenous push over 10 minutes. The dose was given at least 4 weeks after the last treatment taken by each patient.

Outcomes

We analyzed overall survival (OS; calculated from the time of diagnosis) and event-free survival (EFS; calculated from time of ⁹⁰YIT treatment). Response to treatment was assessed according to the Cheson criteria (2007),²³ and determined based on all available clinical (physical examination, vital signs, laboratory test results, quality of life assessment, and Eastern Cooperative Oncology Group score) and radiology follow-ups. The evaluation of ⁹⁰YIT's efficacy was done by computed tomography scan every 3 months for the first 2 years, then every 6 months until present, unless there was clinical indication for earlier imaging study. Ancillary imaging (magnetic resonance imaging or positron emission tomography) was performed based on clinical indication. A rebiopsy was performed in all cases of relapse or progression. Safety outcomes included hematologic toxicity and secondary neoplasms.

Patients were followed up with regularly at the outpatient clinic while residing in the United Arab Emirates or, if returned to their home countries, contacted by email or phone.

Statistical analysis

We calculated proportions (% of total) for categorical variables, and central tendencies with the measure of dispersion (median with 25%-75% quartiles [Q₁-Q₃]) after

the assessment of the distribution with Q–Q plots for continuous variables. We constructed a Kaplan-Meier curve for the OS of patients receiving RIT in second or later lines. All calculations were carried out with R statistical language (version 4.1.1), and the “survminer” and “survival” packages were used to generate the Kaplan-Meier curve.

Results

Characteristics of patients included

A total of 111 patients with NHL were identified, of which 54 (48.6%) received ⁹⁰YIT. Of these cases, 18 patients (33.3%) received RIT as first-line, and the other 36 patients (66.7%) received RIT as second- or later-line therapy. The characteristics of the patients are summarized in Table 1. In the ⁹⁰YIT group, 27 patients (50.0%) had stage IV disease, only 4 patients had stage I, and 10 and 13 patients were classified as having stage II and III disease, respectively. The average number of previous treatment regimens before RIT was 3 (range, 1-5). After induction, 24 cases (44.4%) were in complete remission, and the rest were in partial remission.

Effectiveness

All patients had data that were evaluable for response (Table 1, Table E1). In patients who received RIT as first-line therapy, the length of follow-up ranged between 22 and 67 months from the time of diagnosis. Altogether, 3 of 18 patients died (16.7%), and the median OS was not reached. No progression occurred after RIT treatment during follow-up (median EFS, 36.5 months [Q₁-Q₃, 30.5-44 months]).

In patients who received RIT as second- or later-line therapy, the length of follow-up ranged between 4 and 68 months from the time of diagnosis. Altogether, 3 of 36 patients died (8.3%), and the median OS was not reached (Fig. 1). One case did not respond to treatment at all, and the patient died 7 days later. There was no case of progression otherwise (median EFS, 33 months [Q₁-Q₃, 30.5-44 months]).

Safety

Grade 3 to 4 hematologic toxicities occurred in 7 patients (13.0% of total; all after 14.8 MBq/kg dose of ⁹⁰YIT), and all were reversible with supportive therapies. Six patients (11.1% of total) had prolonged severe thrombocytopenia (platelet count <10 G/L). These patients received 1 to 5 sessions of platelet transfusions with an

Table 1 Characteristics of patients who received ⁹⁰Y-labeled ibritumomab tiuxetan treatment

| | First-line treatment (n = 18) | Second- or later-line treatment (n = 36) |
|--|-------------------------------|--|
| Age at time of diagnosis, mo, median (Q1-Q3) | 45.5 (43.3-59.8) | 53.5 (45.8-62.8) |
| Male, n (% of total) | 10 (55.6) | 23 (63.9) |
| Diagnostic period, y | | |
| 2004-2006 | 16 (88.9) | 26 (72.2) |
| 2007-2008 | 12 (11.1) | 10 (27.8) |
| Ethnicity, n (% of total) | | |
| African-Arab | 17 (94.4) | 29 (80.6) |
| Asian | 1 (5.6) | 7 (19.4) |
| Disease type, n | | |
| Diffuse large B-cell lymphoma | 3* | 32 [†] |
| Mantle cell lymphoma | 1* | 0 |
| Follicular lymphoma | 14 | 0 |
| Marginal zone lymphoma | 0 | 4 |
| Time between diagnosis and progression to first-line treatment, mo, median (Q1-Q3) | 15 (13-18) | 15 (14-18) |
| Eastern Cooperative Oncology Group performance status score, n (%) | | |
| 0 | 0 (0.0) | 3 (8.3) |
| 1 | 5 (27.8) | 12 (33.3) |
| 2 | 11 (61.1) | 18 (50.0) |
| 3 | 2 (11.1) | 3 (8.3) |
| 4 | 0 (0.0) | 0 (0.0) |

* One case had central nervous system involvement.
[†] Two cases had central nervous system involvement.

average of 2 units of pooled platelet transfusion per session. None of these cases had clinically significant bleeding. Two of these 7 cases also received a packed red blood cell transfusion on a single occasion. One serious adverse event occurred when a patient developed febrile neutropenia. We did not identify any secondary neoplasms or transformation to aggressive disease in our cohort of patients, except for 1 patient with DLBCL developing acute myeloid leukemia, which resulted in a fatal outcome 22 months after ⁹⁰YIT treatment.

Discussion

This study aimed to examine the outcomes of patients with B-cell NHL who were treated with ⁹⁰YIT. The unique setting of our study is ensured by the facts that ASCT was not available at our center, many patients could not afford to move to remote centers for ASCT treatment, ⁹⁰YIT-eligible patients were offered treatment in the first line, and ⁹⁰YIT treatment was well-funded and available for all eligible patients. Consequently, the indication of ⁹⁰YIT was far broader than that described in the drug's labels, and

extended the application of this treatment modality beyond the guidelines. In our study population comprised of indolent and aggressive B-cell NHL cases, patients treated with ⁹⁰YIT showed good EFS, both in first and later lines, and the safety profile of the therapy was acceptable.

The efficacy of RIT has been investigated by many studies in the rituximab era.²⁴ As first-line monotherapy, ⁹⁰YIT was proven effective in a phase 2 trial in FL (overall response rate: 87% in patients age >50 years with stage II-IV disease),²⁵ as well as in bulky, advanced FL.²⁶ According to recent, long-term, follow-up data from the international RIT Network, patients receiving ⁹⁰YIT in first line had a higher 8-year OS and progression-free survival (PFS) compared with those treated with the drug after relapse (78.1 vs 54.5% and 53.6 vs 29.6%, respectively).²⁷ In refractory or relapsing FL cases, ⁹⁰YIT proved to be effective in the long term (≥5 years of follow-up; mean estimated OS, 82.3 months) with an acceptable health-related quality of life.²⁸

In our study, the length of follow-up was a median 3 years for the ⁹⁰YIT group (median OS and EFS were not reached), but no FL cases treated with ⁹⁰YIT relapsed during follow-up. In this regard, PFS may be more informative

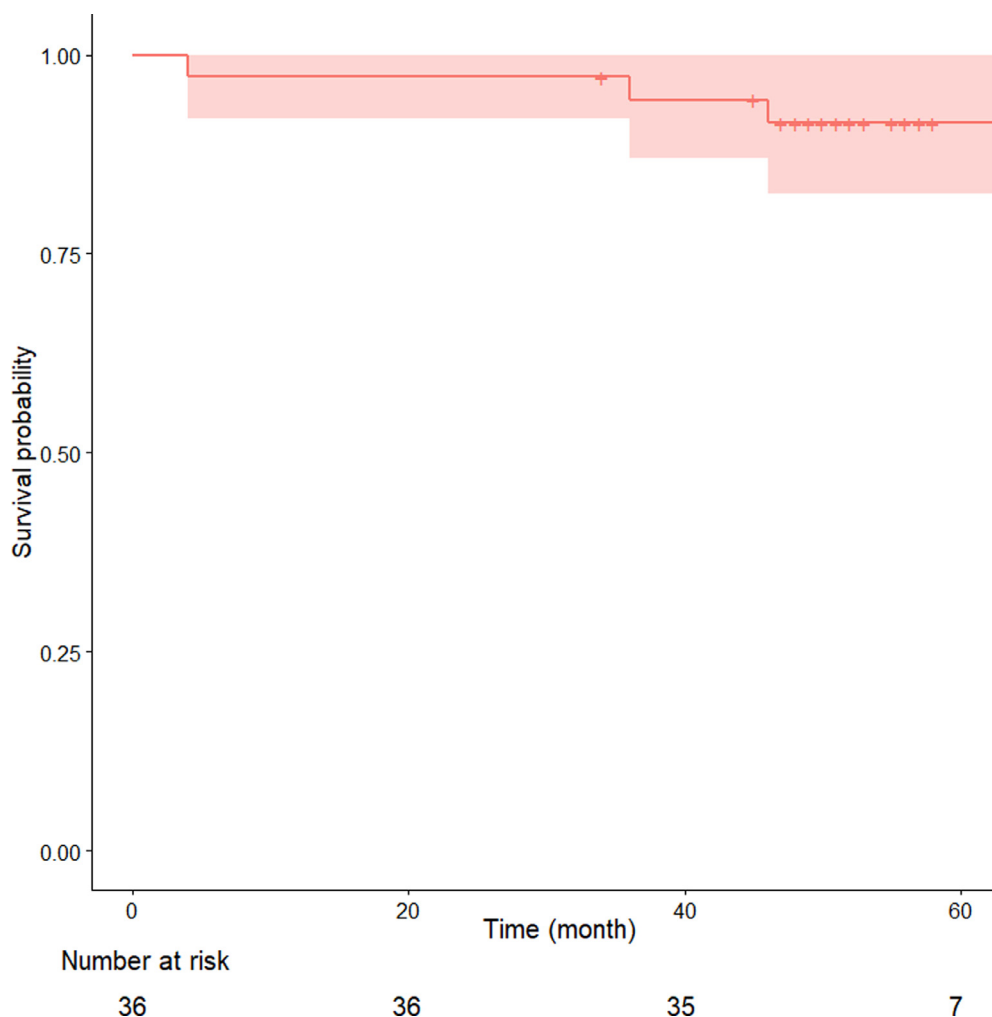


Fig. 1 Overall survival of relapsing patients treated with ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan. Crosses indicate censoring, the red area refers to 95% confidence interval.

about the efficacy of the treatment than OS due to the crossover and sequential treatments after relapse.²⁹ Our results on efficacy of the treatment are comparable with those observed in the literature. Of note, we did not use the treatment in bulky cases (per the drug's label), and most patients refused external beam radiation therapy. Besides, the proportion of patients receiving ^{90}YIT in first line (33%) was higher than that observed in the literature (19%),²⁷ which is probably the consequence of our unique setting (easy-to-access RIT vs difficult-to-access ASCT; Fig. 1).

In DLBCL, ^{90}YIT proved to be effective as first-line treatment after R-CHOP in patients age >60 years (estimated 2-year PFS: 75%),³⁰ short term in high-risk elderly patients (estimated 2-year PFS: 85%),³¹ as well as long term (estimated 7-year PFS and OS: 36.1% and 38.9%, respectively).³² These studies included exclusively (or dominantly) ASCT-ineligible DLBCL cases. In our study of patients treated with ^{90}YIT both in the first and later lines, OS and EFS were comparable with those reported in the literature.

Although effective, ^{90}YIT treatment has an acceptable short-term safety profile.³³ The most informative controlled study is a phase 3 RCT comparing ^{90}YIT to no treatment as consolidation therapy in 409 FL cases. In this study, grade 3 or 4 nonhematologic toxicities affected only 5.4% of the treated cases (of which infections accounted for 1%) compared with 5.9% in the no-treatment arm.¹³ In general, thrombocytopenia (<25-50 G/L) is expected to develop 4 to 6 weeks after treatment, but a less apparent decline in hemoglobin level (15%-25% compared with baseline) is expected a few weeks later.^{25,30,31}

Another minor concern is the deteriorating quality of life with ^{90}YIT ²⁸; however, in another study, treated elderly patients with NHL (in an FL-dominant population) scored similarly for global health and social functioning compared with that in the healthy population.³⁴ Long-term follow-up data of ^{90}YIT -treated cases are scarce. In the report of the RIT Network (285 FL cases), secondary neoplasms developed in 12.5% (22 solid and 13 hematologic neoplasms, most commonly acute myeloid

leukemia and myelodysplastic syndrome), and histologic transformation occurred in 5.7% of cases with a median follow-up of 8.2 years.²⁷ In our study, the treatment's short-term safety profile was similar to that reported earlier, with 13.0% of cases developing grade 3 or 4 hematologic toxicity of which none urged therapy cessation. Although we had 1 case of acute myeloid leukemia, the follow-up length did not allow us to draw firm conclusions about long-term safety (carcinogenic effects of radiation may manifest 5–10 years later than exposure).

Our study has several strengths and limitations. The main strength of our study is its unique setting. Many ASCT-eligible patients were treated with ⁹⁰YIT due to the unavailability and unaffordability of ASCT. Our study's major limitation is the single-arm design and retrospective nature, with their inherent limitations (vulnerability to selection and information bias). Besides, the median length of follow-up was shorter than that required to analyze the treatment's long-term safety. Finally, we did not investigate the cost effectiveness of ⁹⁰YIT.³⁵

Conclusions

Our results suggest that patients with B-cell NHL treated with ⁹⁰YIT experience satisfactory OS and EFS with acceptable safety profile. Based on this, patients with B-cell NHL, and particularly those with DLBCL, may benefit from ⁹⁰YIT as adjunctive therapy if ASCT is not available. However, due to our study's limitations, these findings should be used for hypothesis-generating purpose for RCTs validating the associations.

Acknowledgments

The authors acknowledge Khaled Qawasmeh of the Department of Nursing, Tawam Hospital (Johns Hopkins Medicine affiliate) for his technical help with data collection.

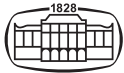
Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at <https://doi.org/10.1016/j.adro.2021.100882>.

References

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127:2375–2390.
2. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*. 2012;380:848–857.
3. Cummins KD, Gill S. Anti-CD123 chimeric antigen receptor T-cells (CART): An evolving treatment strategy for hematologic malignancies, and a potential ace-in-the-hole against antigen-negative relapse. Review. *Leuk Lymphoma*. 2018;59:1539–1553.
4. Castella A, Joshi S, Raaschou T, Mason N. Pattern of malignant lymphoma in the United Arab Emirates—A histopathologic and immunologic study in 208 native patients. *Acta Oncol*. 2001;40:660–664.
5. Cerny T, Borisch B, Introna M, Johnson P, Rose AL. Mechanism of action of rituximab. *Anticancer Drugs*. 2002;13(suppl 2):S3–S10.
6. Ansell SM. Non-Hodgkin lymphoma: Diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2015;90:1152–1163.
7. Katchi T, Liu D. Diagnosis and treatment of CD20 negative B cell lymphomas. *Biomark Res*. 2017;5:5.
8. Illidge TM. Radioimmunotherapy of lymphoma: A treatment approach ahead of its time or past its sell-by date? 2010;28:2944–2946.
9. Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F, et al. Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2002;20:2453–2463.
10. Grillo-López AJ. Zevalin: The first radioimmunotherapy approved for the treatment of lymphoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2002;2:485–493.
11. Werner Sunderland M, Peggs KS. Successful translation and future prospects of TALEN editing for leukemia patients. Editorial. *Exp Opin Biol Ther*. 2018;18:725–726.
12. Morschhauser F, Radford J, Van Hoof A, et al. ⁹⁰Yttrium-ibritumomab tiuxetan consolidation of first remission in advanced-stage follicular non-Hodgkin lymphoma: Updated results after a median follow-up of 7.3 years from the international, randomized, phase III first-line indolent trial. *J Clin Oncol*. 2013;31:1977–1983.
13. Morschhauser F, Radford J, Van Hoof A, et al. Phase III trial of consolidation therapy with yttrium-90-ibritumomab tiuxetan compared with no additional therapy after first remission in advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2008;26:5156–5164.
14. Shimoni A, Avivi I, Rowe JM, et al. A randomized study comparing yttrium-90 ibritumomab tiuxetan (Zevalin) and high-dose BEAM chemotherapy versus BEAM alone as the conditioning regimen before autologous stem cell transplantation in patients with aggressive lymphoma. *Cancer*. 2012;118:4706–4714.
15. Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. 2015;26(suppl 5):v116–v125.
16. Zucca E, Arcaini L, Buske C, et al. Marginal zone lymphomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. 2020;31:17–29.
17. Dreyling M, Campo E, Hermine O, et al. Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28(suppl 4):iv62–iv71.
18. Dreyling M, Ghielmini M, Rule S, et al. Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2021;32:298–308.
19. Jaffe E. *World Health Organization Classification of tumours: Pathology & genetics: Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2001.
20. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2008.
21. Rosenberg SA, Boiron M, DeVita Jr VT, et al. Report of the Committee on Hodgkin's disease staging procedures. *Cancer Res*. 1971;31:1862–1863.
22. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol*. 1999;17:1244.

23. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25:579–586.
24. Shimoni A, Zwas ST. Radioimmunotherapy and autologous stem-cell transplantation in the treatment of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Sem Nucl Med*. 2016;46:119–125.
25. Scholz CW, Pinto A, Linkesch W, et al. (90)Yttrium-ibritumomab-tiuxetan as first-line treatment for follicular lymphoma: 30 months of follow-up data from an international multicenter phase II clinical trial. *J Clin Oncol*. 2013;31:308–313.
26. Ibatci A, Pica GM, Nati S, et al. Safety and efficacy of (90) yttrium-ibritumomab-tiuxetan for untreated follicular lymphoma patients. An Italian cooperative study. *Br J Haematol*. 2014;164:710–716.
27. Hohloch K, Windemuth-Kieselbach C, Kolz J, et al. Radioimmunotherapy (RIT) for follicular lymphoma achieves long term lymphoma control in first line and at relapse: 8-year follow-up data of 281 patients from the international RIT-registry. *Br J Haematol*. 2019;184:949–956.
28. Andrade-Campos MM, Montes-Limón AE, Soro-Alcubierre G, et al. Long-term efficacy of (90)Y ibritumomab tiuxetan therapy in follicular non-Hodgkin lymphoma and health-related quality of life. *Ann Hematol*. 2014;93:1985–1992.
29. U.S. Food and Drug administration. Clinical trial endpoints for the approval of cancer drugs and biologics: Guidance for industry. Available at: <https://www.fda.gov/media/71195/download>. Accessed January 22, 2021.
30. Zinzani PL, Tani M, Fanti S, et al. A phase II trial of CHOP chemotherapy followed by yttrium 90 ibritumomab tiuxetan (Zevalin) for previously untreated elderly diffuse large B-cell lymphoma patients. *Ann Oncol*. 2008;19:769–773.
31. Zinzani PL, Rossi G, Franceschetti S, et al. Phase II trial of short-course R-CHOP followed by ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan in previously untreated high-risk elderly diffuse large B-cell lymphoma patients. *Clin Cancer Res*. 2010;16:3998–4004.
32. Stefoni V, Casadei B, Bottelli C, et al. Short-course R-CHOP followed by (90)Y-ibritumomab tiuxetan in previously untreated high-risk elderly diffuse large B-cell lymphoma patients: 7-year long-term results. *Blood Cancer J*. 2016;6:e425.
33. Knox SJ, Goris ML, Trisler K, et al. Yttrium-90-labeled anti-CD20 monoclonal antibody therapy of recurrent B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 1996;2:457–470.
34. Andrade-Campos MM, Montes-Limón AE, Soro-Alcubierre G, et al. Patients older than 65 years with non-Hodgkin lymphoma are suitable for treatment with (90)Yttrium-ibritumomab tiuxetan: A single-institution experience. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15:464–471.
35. Chen Q, Ayer T, Nastoupil LJ, Rose AC, Flowers CR. Comparing the cost-effectiveness of rituximab maintenance and radioimmunotherapy consolidation versus observation following first-line therapy in patients with follicular lymphoma. *Value Health*. 2015;18:189–197.



AKADÉMIAI KIADÓ

A diffúz nagy B-sejtes limfóma fenotipikus, citogenetikai és expressziós profil heterogenitása – Magyarországi multicentrikus tanulmány

Hematológia-
Transzfuziológia

55 (2022) 4, 154–163

DOI:

10.1556/2068.2023.00157

© 2023 Szerző(k)

Pajor László^{1*}, Kun József², Herczeg Róbert², Gálik Bence², Ritter Zsombor³, Baliko Anett⁴, Hegedűs Géza^{†5}, Barna Tibor⁶, Czifra János⁷, Pálvölgyi Anna⁸, Östör Gabriella⁹, Babarcsi Edit¹⁰, Ligeti Erika¹¹, Kránitz Noémi¹², Bali Ottilia¹³, Bodor Anita¹⁴, Tiszlavicz László¹⁵, Pajor Gábor¹, Kajtár Béla¹, Kereskai László¹, Tornóczki Tamás¹, Alizadeh Hussain¹⁶, Gyenesei Attila² és Vályi-Nagy István¹⁰

¹ Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Pathológiai Intézet, Pécs, Magyarország

² Pécsi Tudományegyetem, Szentágotthai János Kutatóközpont, Bioinformatikai Kutatócsoport, Pécs, Magyarország

³ Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Orvosi Képzőközpont, Pécs, Magyarország

⁴ Tolna Megyei Balassa János Kórház, Hematológiai Osztály, Szekszárd, Magyarország

⁵ Somogy Megyei Kaposi Mór Oktató Kórház, Patológiai Osztály, Kaposvár, Magyarország

⁶ BAZ Megyei Központi Kórház és Egyetemi Oktatókórház, II. Pathológiai Osztály, Semmelweis Tagkórház, Miskolc, Magyarország

⁷ Tolna Megyei Balassa János Kórház, Pathológiai Osztály, Szekszárd, Magyarország

⁸ Siófok Kórház Rendelőintézet, Patológia, Siófok, Magyarország

⁹ Szent Pantaleon Kórház-Rendelőintézet, Kórbonctani és Kórszövettani Osztály, Dunaújváros, Magyarország

¹⁰ Dél-pesti Centrumkórház, Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Budapest, Magyarország

¹¹ Csolnoky Ferenc Kórház, Patológiai Osztály, Veszprém, Magyarország

¹² Petz Aladár Egyetemi Oktató Kórház, Pathológiai Osztály, Győr, Magyarország

¹³ Kanizsai Dorottya Kórház, Pathológiai Osztály, Nagykanizsa, Magyarország

¹⁴ Békés Megyei Központi Kórház, Pathológiai Osztály, Békéscsaba, Magyarország

¹⁵ Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Patológiai Intézet, Szeged, Magyarország

¹⁶ Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, I. sz. Belgyógyászati Klinika, Hematológia, Pécs, Magyarország

Beérkezett: 2022. november 18. – Átdolgozott kézirat érkezett: 2023. január 17. – Elfogadva: 2023. január 18.

A diffúz nagy B-sejtes limfóma 5 éves általános túlélése a mai kezelések mellett 60–70%, melynek hátterében a betegség komplex heterogenitása állhat.

Célkitűzés: Magyarországi multicentrikus tanulmányban a betegség fenotipikus, citogenetikai, genomexpressziós profil- és geográfiai heterogenitásának vizsgálata. **Módszer:** A 276 formol-paraffinos betegmintát Hans' algoritmus és dupla protein expresszor státusz alapján klasszifikáltuk. A *IGH::MYC*, *IGH::BCL2*, *BCL6* gén átrendeződéseket, valamint a *MYC*, *BCL2* és *BCL6* gének nyerését interfázis citogenetikával vizsgáltuk. Az RNA-seq-alapú génexpressziós profilvizsgálat 173 formol-paraffinos mintán volt elvégezhető. **Eredmények:** A Hans' fenotípus alapján 103 (37,3%) germinális centrum B-sejt-szerű és 173 (62,7%) nem germinális B-sejt-szerű limfómát azonosítottunk, mely besorolás 82,6%-os megegyezést mutatott a genomexpressziós profilstratifikációval. Tripla aberrációt mutató limfóma nem fordult elő. Izolált *IGH::MYC* átrendeződés, valamint *MYC*, *BCL2*, *BCL6* géntöbbség mindkét Hans' csoportban jelen volt. Az *IGH::BCL2* átrendeződés izoláltan vagy kombinációban, szignifikánsan és kizárólag a germinális centrum B-sejt-szerű csoportban volt azonosítható, míg a *BCL6* átrendeződés szignifikáns halmozódást mutatott a nem germinális centrum B-sejt-szerű Hans' csoportban. A dupla

*Levelezési cím/Corr. address:
Prof. dr. Pajor László, 7624 Pécs,
Szigeti út 12.;
Tel.: +36/72/536-280.
E-mail: pajor.laszlo@pte.hu

 AKJournals

protein expresszor fenotípus pozitív prediktív értéke mindkét Hans' csoport molekuláris alcsoportjaira alacsony, a 0,04–0,19, illetve a 0,12–0,30, tartományba esett, míg negatív prediktív értéke mindkét főcsoport összes releváns molekuláris alcsoportjában 1,00-nek felelt meg. *Következtetések:* A *IGH::MYC* átrendeződés nem Hans' csoport specifikus genotípus. Az *IGH::BCL2* átrendeződés germinális centrum, a *BCL6* átrendeződés pedig a nem germinális centrum B-sejt-szerű limfóma fémjele. A dupla protein expresszor negatív fenotípus mellett *IGH::MYC* és/vagy *IGH::BCL2* átrendeződés nem fordult elő.

KULCSSZAVAK

DLBCL, immunfenotípus, citogenetika, expressziós profil

Phenotypic, cytogenetic and expression profile heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. A Hungarian multicentric study

Heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma might explain the current 60–70% five year overall survival.

Objectives: To reveal the phenotypic, cytogenetic, genome expression profile and geographic heterogeneity of this disease in Hungary. *Methods:* Formol-paraffine tissue samples of 276 patients were stratified according to the Hans' algorithm and double protein expressor status. *IGH::MYC*, *IGH::BCL2*, *BCL6* rearrangements and gain of *MYC*, *BCL2*, *BCL6* genes were determined by interphase cytogenetics. RNA-seq based expression profiling was accomplished in 173 samples. *Results:* Hans' phenotype identified 103 (37.3%) germinal center and 173 (62.7%) non-germinal center B-cell like lymphoma, which classification corresponded in 82.6% to the genome expression profile stratification. Triple-hit lymphoma did not occur. The *IGH::MYC* rearrangement alone or excess of *MYC*, *BCL2* and *BCL6* genes existed in both Hans' groups. The *IGH::BCL2* rearrangement, alone or combined, was significantly related to germinal center B-cell like lymphoma, whereas the *BCL6* rearrangement associated significantly to the other Hans' group. The positive predictive values of double protein expressor phenotype were low in all molecular subgroups of both Hans' groups, falling into the range of 0.04–0.19 and 0.12–0.30, respectively, whereas the negative predictive values of it corresponded to 1.00 in all relevant molecular subgroups of the two Hans' groups. *Conclusions:* *IGH::MYC* rearrangement is not a Hans' group specific genotype. *IGH::BCL2* is a hallmark of the germinal center, whereas *BCL6* rearrangement is that of the non-germinal center lymphomas. The double protein expressor negative phenotype is equally exclusive for both *IGH::MYC* and *IGH::BCL2* rearrangements.

KEYWORDS

DLBCL, immunophenotype, cytogenetics, expression profiling

BEVEZETÉS

A leggyakoribb non-Hodgkin limfóma, a CD20 pozitív, de morfológiailag heterogén és különböző klinikai lefolyást mutató diffúz nagy B-sejtes limfóma (DLBCL) a klasszikus, Lymphochip-alapú génextpressziós profil (GEP) vizsgálatok szerint legalább kettő, molekulárisan eltérő és prognosztikailag különböző betegségnek felelt meg [1]. A germinális centrum B-sejt (GCB), valamint az aktivált B-sejt (ABC)-szerű molekuláris szubtípusok létezését egy független, oligonukleotid génchip platform (Affimetrix, Santa Clara, CA) is megerősítette, és kiegészítette egy harmadik, nem osztályozható, a GCB, illetve az ABC típusú GEP mintázattól eltérő expressziós profilt mutató, de rossz prognózisú DLBCL altípussal [2, 3]. A DLBCL sejteredetének ('cell-of-origin', COO) megállapítására az immunhisztológiailag (IH) meghatározott proteinexpressziós algoritmusok is bevezetésre kerültek, melyet a GEP-alapú sejteredet-meghatározás széles körű rendelkezésre állásának hiánya miatt a WHO-2016 limfómaklasszifikáció is elfogadott [4]. Ezek közül a legelőször bevezetett és legszélesebb körben alkalmazott, a CD10, BCL6 és a MUM1 proteinek expresszióját immunhisztológiával vizsgáló Hans' algoritmus sem tudja elkülöníteni a GEP-pel nem osztályozható csoportot, és a DLBCL

betegséget GCB-szerű és nem GCB/ABC-szerű, az előbbi javára szignifikánsan jobb klinikai lefolyást mutató csoportokba sorolja [5]. A DLBCL betegség citogenetikai heterogenitására vonatkozó növekvő ismeretanyag egy új entitás elfogadásához vezetett a WHO-2016 limfómaklasszifikációban: MYC és BCL2 és/vagy BCL6 átrendeződést (R) mutató magas malignitású B-sejtes limfóma (HGBL), melyet ezen molekuláris sajátságok miatt tripla aberrációt ('triple hit', TH) vagy dupla aberrációt ('double hit', DH) mutató limfómának neveztek el [6].

A nagy nemzetközi tanulmányokban jelentkező ellentmondások, például az izolált MYC-R, az ebben részt vevő partnereinek, a MYC-R melletti más átrendeződések, ezen genetikai aberrációk különböző kombinációinak, továbbá a MYC, BCL2 és BCL6 gének kópiaszám-eltéréseinek (CNA) prognosztikai szerepe nem kerültek minden vonatkozásban feloldásra. Ez magyarázza a jelenleg is intenzív, a prognózis prediktív genetikai aberrációk, mutációk, kópiaszám-eltérések vagy génfüziók feltárására irányuló kutatásokat, melyek célja a DLBCL individualis medicina típusú kezelésének megalapozása [7–20].

Multicentrikus tanulmányunkban egy reprezentatívnak vélt DLBCL betegcsoport sejteredet (COO), *IGH::MYC*, *IGH::BCL2* és *BCL6* gén átrendeződés (R), illetve kópiaszám-növekedés



(CNA), valamint génexpressziós profil (GEP) szerinti vizsgálatát végeztük el annak érdekében, hogy a DLBCL ezen paraméterei geográfiai jellegzetességeit feltárjuk.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatokat a PTE Klinikai Központ Pathológiai Intézetének konzíliumi anyagán végeztük, melyből 344, legalább 5 éves követéssel rendelkező mintát választottunk ki. Ebből mind a 7 immunhisztológiai, valamint a 4 genetikai lókuszt reprezentáló 3 iFISH-vizsgálat értékelhető eredményt 276 esetben adott. Ez a pathológiai minta (paraffinos blokk) kollekción 12 egészségügyi intézmény pathológiai osztályáról származott, melyek az affiliációban szereplő székhely szerint a következők, zárójelben a részvételi esetszámmal: Békéscsaba (6), Dunaújváros (16), DPC-OHII Budapest (30), Győr (4), Miskolc (55), Nagykanizsa (3), PTE Pécs (30), Siófok (15), Kaposvár (88), Szekszárd (14), SZTE Szeged (8), Veszprém (7). E kohorszban az FFPE blokkokból extrahált RNS és az azt követő transzkriptom új generációs szekvenálás (NGS) alapján 173 mintában volt genomexpressziós profil (GEP) vizsgálat elvégezhető.

Hisztológiai-immunhisztológiai vizsgálatok: A paraffinos blokkokból újra elvégeztük a teljes pathológiai feldolgozást, komplettáltuk az IH-profilozást, diagnóziskorrekción miatt egyetlen esetet sem kellett kizárni. Az IH-vizsgálatokhoz CD10, CD20 (Visionbiosystems Novocastra, UK), MUM1, BCL2, BCL6 (Dako, Dánia), MYC (Abcam, UK), Ki-67 (Hisztopatológia Kft., Magyarország) specifikus primér antitesteket, valamint Envision+ System-HRP (DakoCytomation, Dánia) és Bond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems, UK) előhívó reagenseket alkalmaztunk. A Hans' algoritmus szerint legalább 30%-os pozitivitás esetén tekinthető pozitívnak a tumor egy bizonyos markerre. Az algoritmus szerint GCB-szerű csoportbesorolást kap a tumor, ha CD10+ (BCL6+/-, MUM1+/-) vagy CD10-, BCL6+, MUM1- fenotípust mutat. Nem GCB/ABC-szerű a besorolás minden egyéb - CD10-, BCL6+, MUM1+ vagy CD10-, BCL6-, MUM1+ fenotípus esetén [5]. Dupla protein expresszor (DPE) besorolást kapott a tumor kombinált BCL2 ($\geq 50\%$) és MYC ($\geq 40\%$) immunhisztológiai pozitivitás esetén [6].

Interfázis fluoreszcens in situ hibridizáció (iFISH): A paraffinos blokkok 5 μm -es metszetein a mintákat iFISH-eljárással - a szonda kit gyártó előírásait követve - teszteltük MYC::IGH, IGH::BCL2, BCL6 átrendeződésre (R), valamint MYC (8q24), BCL2 (18q21) és BCL6 (3q27) nyerésre/amplifikációra (G/A). Ehhez Vysis IGH/MYC/CEP8 TC-DF, Vysis LSI IGH/BCL2 DC-DF és Vysis LSI BCL6 (ABR) DC Break Apart szondakészleteket (Abbott Molecular Inc., USA) használtunk fel. Az iFISH-reakciókat a gyártó előírásai szerint, Zeiss Axioplan-MOT II fluoreszcens mikroszkópban 'grid sampling' és 'color rationing' módszerekkel értékeltük ki [21]. Átrendeződés (R) pozitívnak tekintettük a tumort IGH/MYC, IGH/BCL2, illetve BCL6 szonda esetén, ha a fúziós, illetve a disszociált iFISH jeleket a sejtmagok legalább 50%-a hordozta. A nyerés/amplifikáció (G/A) definíciója MYC, BCL2 és BCL6 esetében magában foglalta a releváns

kromoszóma poliploiditásának hiányát és/vagy a sejtmagok legalább 50%-ban legalább 1 kópia géntöbblet kimutathatóságát, valamint dupla parányok ['double minutes'] és/vagy gyöngyfüzérszerű ['beaded lace-like'] jelek és/vagy megszámlálhatatlan (homogén festődésű régió - 'HSR' vagy felhőszerű - 'cloudy-like') szignálok jelenlétét.

RNS-könyvtár-készítés és szekvenálás: A paraffinos blokkok 10 μm -es metszeteiből RNeasy FFPE isol kit (Qiagen, Németország) alkalmazásával történt az RNS-izolálás, majd NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific, USA) készülékkel a mennyiség és a tisztasági fok meghatározása. Az RNS-könyvtárak készítését QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina (Lexogen, Ausztria) segítségével végeztük. Mintánként 100 ng total RNS reverz transzkripciója valósult meg egyszálú komplementer DNS-re (cDNS) oligodT primerekkel, majd az RNS eltávolításra került. Ezt követően a második cDNS-szálat szintetizáltuk random primerek segítségével, majd a termékeket tisztítottuk mágneses gyöngyökkel. Végül a könyvtárakat amplifikáltuk, és vonalkód-szekvenciával (barcode) láttuk el PCR alkalmazásával. Az elkészült könyvtárakban TapeStation 4200 (Agilent) készülékkel ellenőriztük adapter dimer PCR műtermékek képződését. A QuantSeq könyvtárakat Illumina NextSeq550 készülékkel szekvenáltuk 75 bp single-end leolvasási módban.

Bioinformatika - statisztika: A leolvasott szekvenciákat a *Homo sapiens* referencia genomra illesztettük (*GRCh37 Ensembl*) a STAR v2.5.3a programmal [22]. Ezután a fehérjekódoló génekre illesztett readok számát meghatároztuk a HTSeq programcsomaggal (v0.11.1) [22]. A gén count adatokat normalizáltuk az M-értékek trimmelt átlaga (TMM) módszerrel az edgeR R/Bioconductor programcsomagokkal (v3.28, R v3.6.0, Bioconductor v3.9) [23]. A statisztikai próbákhoz az adatokat logtranszformáltuk a voom megközelítéssel a limma programcsomaggal [24, 25]. A normalizált gén count adatokat transzkriptum per millió (TPM) formában reprezentáltuk. A limma csomag segítségével összehasonlítottuk a csoportokat lineáris modell alkalmazásával, amellyel fold change és módosított p-értékeket, majd Benjamini-Hochberg-módszerrel a False Discovery Rate (FDR) megközelítéssel illesztett p-értékeket számoltunk. A differenciáltan kifejezett gének TPM-értékeit hierarchikus klaszterelemzéssel, Pearson-korreláció és átlagos kapcsolttság (average linkage) módszerrel vizsgáltuk és hőtérképpel vizualizáltuk a *heatmap* R csomaggal (v1.0.12). A Wan-Hui és mtsai (2020) által meghatározott, a DLBCL-sejteredet (cell-of-origin, COO) csoportosítással szignifikánsan összefüggő 32 gén közül a mintáinkban kimutatott transzkriptttal rendelkező 28 gén TPM-értékei alapján hierarchikus klaszterelemzést és hőtérképen történő vizualizációt alkalmaztunk a fenti módon [26].

Chi-négyzet-tesztet alkalmaztunk a különböző fenotípus sejtparaméterek megoszlásának vizsgálatára. Ehhez az R stats csomagból a *chiq.test* függvényt (R Core Team, 2021) használtuk fel. A pozitív és negatív prediktív értéket (PPÉ, NPÉ) a különböző geno- és fenotípus-csoportok vs. DPE státusz kontingenciatablázataiból nyert valódi pozitív (VP), álpozitív (ÁP), valódi negatív (VN),



álnegatív (ÁN) értékek alapján, a VP/VP+ÁP és VN/VN+ÁN képletek alapján számoltuk.

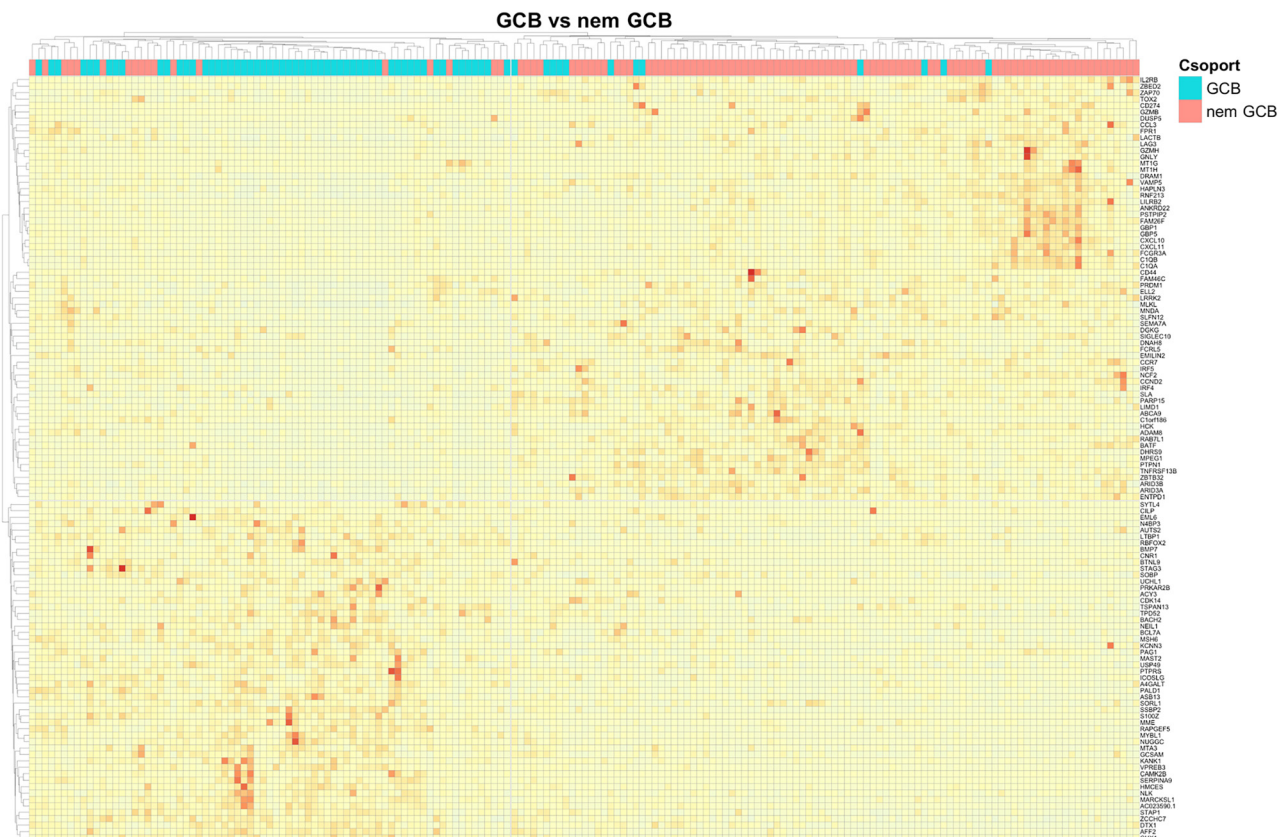
EREDMÉNYEK

A teljes immunhisztológiai és iFISH-panellel értékelhető eredményt adó, összesen 276 DLBCL-tumormintát vizsgálhattunk. A sejteredet (COO) vonatkozásában, a Hans' immunhisztológiai algoritmus alapján, a 276 tumorból 103 (37,3%) GCB-sejt-szerű, míg 173 (62,7%) nem GCB-sejt-szerű DLBCL altípusba sorolódott. A GEP-vizsgálat során azonosított differenciáltan expresszált gének a GCB vs. nem GCB Hans' DLBCL-csoportokat magas hatékonysággal különítették el. A Hans algoritmus, valamint a GEP-vizsgálat alapján azonos csoport besorolást nyert az összes eset 82,6%-a (1. ábra). Az ábra jobb felső zónájában, a döntően Hans' nem GCB fenotípusú esetek között alcsoportosodást, azaz GEP-heterogenitást mutat a hőtérkép. A GEP-vizsgálat ugyanakkor, szignifikáns heterogenitást tárt fel az egyaránt Hans' GCB besorolásba tartozó, 6/103 (5,8%) illetve a 22/103 (21,3%) gyakoriságot képviselő CD10+/MUM1+ vs BCL6+ csoportok között (2. ábra).

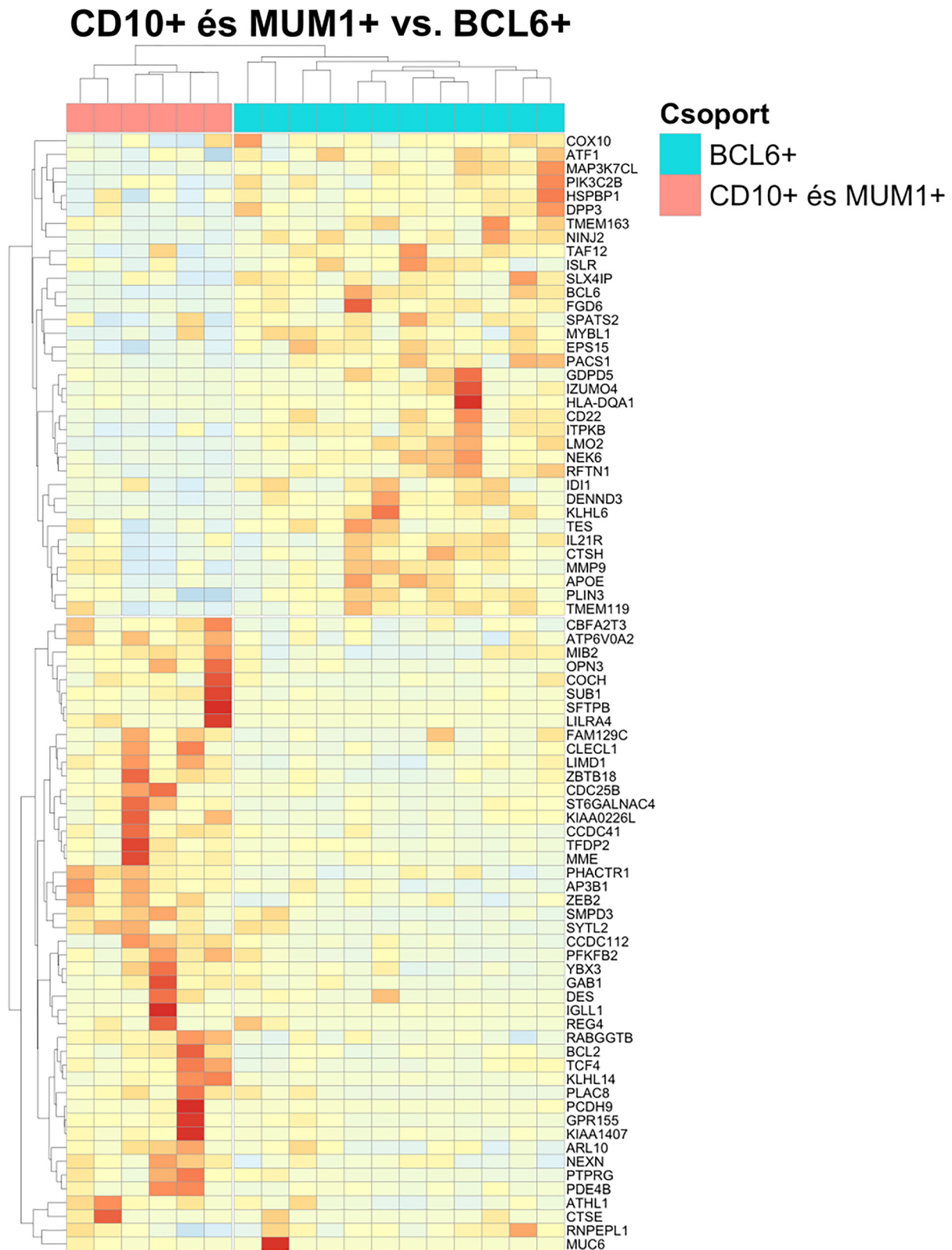
Az *IGH::MYC*, *IGH::BCL2* fúzió illetve *BCL6* törés típusú átrendeződések (R) incidenciája a teljes vizsgált DLBCL-kohorszban 16/276 (5,8%), 20/276 (7,2%), illetve 46/276 (16,7%) értékeknek felelt meg (1. táblázat). A *MYC* gén

amplifikációja 7/276 (2,5%) gyakorisággal fordult elő, melyet az átlagos 2,55x allélarány (kb. 3 géndózis többlet) jellemzett. A *BCL2* amplifikáció ugyanezen adatai: 37/276 (13,4%), átlagosan 1,95 allélarány (kb. 2 gén dózis többlet). A *BCL6* amplifikációja csak 0,7%-ban (2/276) volt észlelhető, 4,05–4,22 fúziós jel/mag arány (kb. 2x gén dózis többlet) és gyöngyfüzérű amplifikáció mellett. Az amplifikáció értékelésénél nem vettük figyelembe a megszámlálhatatlan, homogén festődési régió ('HSR'), valamint felhőszerű ('cloudy like') iFISH-jeleket tartalmazó magokat. A *MYC* és a *BCL2* gén vonatkozásában egyaránt 2–2/276 (0,7–0,7%) gyakorisággal fordultak elő ilyen iFISH-jelenségek a DLBCL-kohorszban (3. ábra).

Az izolált *IGH::MYC* aberráció 6/103 (5,8%), illetve 6/173 (3,5%) arányban fordult elő a GCB, valamint a nem GCB csoportban, és nem mutatott szignifikánsan eltérő halmazódást a Hans' főcsoportokban. Tripla aberrációt (TH) vagy *IGH::MYC/BCL6* átrendeződés típusú dupla aberrációt (DH-2) hordozó limfóma egyik Hans' csoportban sem fordult elő. Az izolált *BCL6-R* típusú aberráció a nem GCB csoportban volt gyakoribb (33/173, 19,0%), és ezzel a fenotípussal szignifikáns összefüggést mutatott ($P = 0,013$). Az *IGH::BCL2* átrendeződés izoláltan és más aberrációval kombinációban 20/103 (19,4%) illetve 0/173 (0%) gyakorisággal fordult elő a GCB, valamint a nem GCB csoportban. Így szignifikáns halmazódást mutatott izoláltan ($P = 0$), kombinációban *IGH::MYC* átrendeződéssel (DH-1; $P = 0,018$), *BCL6*



1. ábra. Az expressziós profil alapján létrehozott hőtérképen meghatározott 2 csoport 82,6% átfedést mutatott a Hans' algoritmus szerint definiált GCB, valamint nem GCB besorolással



2. ábra. Az egyaránt a Hans' GCB csoportba tartozó CD10+, MUM1+ ■, valamint BCL6+ ■ fenotípusú csoport szignifikáns GEP-heterogenitást mutatott

töréssel ($P = 0,008$) vagy minden *IGH::BCL2* átrendeződést mutató DLBCL-re nézve ($P = 0,001$), a GCB fenotípusú limfómákban, miközben ez a genetikai konstelláció egyáltalán nem fordult elő a nem GCB fenotípusú tumorokban. Ugyanakkor a *BCL2* gént érintő aberrációk mindegyike nyeres/amplifikáció (G/A) típusú volt a nem GCB-sejt-szerű daganatokban. Ennek ellenére a *MYC*, *BCL2*, illetve *BCL6* gének kópiaszám eltéréseinek gyakorisága nem mutatott szignifikáns asszociációt egyik Hans' csoporttal sem (4. ábra).

A DPE+ státusz előfordulása magas volt a GCB (83,4%) és a nem GCB (88,4%) csoportban egyaránt és gyakorisága nem mutatott szignifikáns eltérést a két Hans' csoportban.

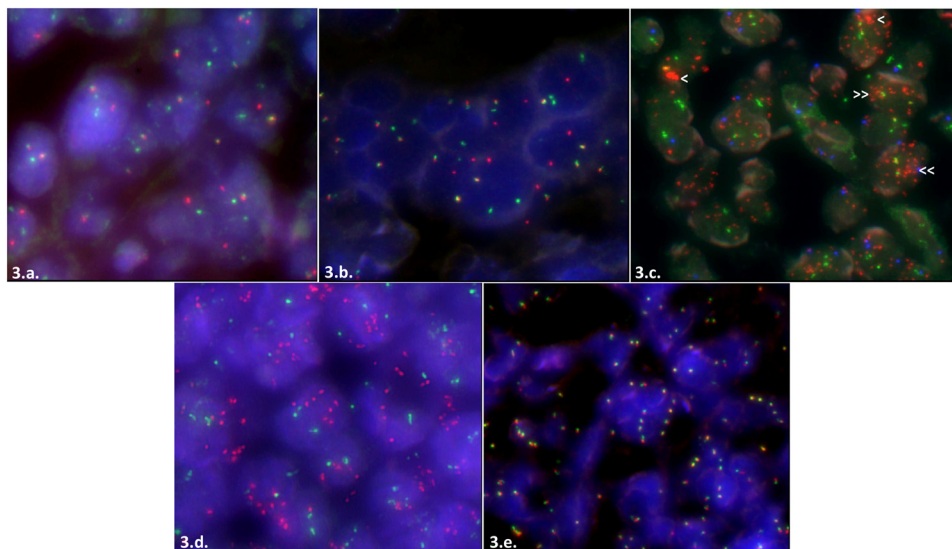
1. táblázat. A *IGH::MYC*, *IGH::BCL2* és *BCL6* génátrendeződések (R), a *MYC*, *BCL2* és *BCL6* gének nyeresének/amplifikációjának (G/A), valamint a megszámlálhatatlan iFISH jelek lókuszszerű gyakorisága a teljes vizsgált DLBCL-kohorszban (HSR – homogén festődésű régió)

| | Átrendeződés (R) | Géntöbblet – iFISH jel | |
|------------------|------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| | | Nyeres/ Amplifikáció (G/A) | Megszámlálhatatlan HSR/Felhőszerű |
| <i>IGH::MYC</i> | 16/276 (5,8%) | - | - |
| <i>MYC</i> | - | 7/276 (2,5%) | 2/276 (0,7%) |
| <i>IGH::BCL2</i> | 20/276 (7,2%) | - | - |
| <i>BCL2</i> | - | 37/276 (13,4%) | 2/276 (0,7%) |
| <i>BCL6</i> | 46/276 (16,7%) | - | - |
| <i>BCL6</i> | - | 2/276 (0,7%) | - |

A DPE+ fenotípus szignifikáns asszociációt nem mutatott a nem GCB csoportban a csak izoláltan előforduló *MYC*-R+ és a *BCL6*-R+ alcsoportokkal, ugyanez vonatkozik a GCB csoportban a *MYC*-R típusú aberrációt, illetve a *BCL2* átrendeződést izoláltan vagy kombinációban hordozó alcsoportokra is. A DPE+ fenotípus csak a GCB csoportban és csak a *MYC* vagy *BCL2* átrendeződést izoláltan vagy bármilyen kombinációban hordozó molekuláris alcsoportra bizonyult szignifikánsan gyakoribbnak ($P = 0,02$). A DPE fenotípus pozitív prediktív értéke (PPV) a nem GCB csoport fenti 2 molekuláris alcsoportjára: 0,04–0,19. Ugyanezen érték a GCB csoport 3 molekuláris alcsoportjára a 0,12–0,30 tartományba esett (2. táblázat). A DPE fenotípus negatív prediktív értéke (NPV) a két Hans csoport összesen öt molekuláris alcsoportjából 4-ben 1,00-nek bizonyult, egyedül a nem GCB – *BCL6*-R+ alcsoportban volt alacsonyabb, 0,85.

MEGBESZÉLÉS

A leggyakoribb limfóma, a CD20+ nagy B-sejtes limfóma, a non-Hodgkin limfómák 30–40%-át teszi ki a különböző földrajzi térségekben. Ennek 80–85%-a diffúz növekedési mintázatot mutat, ezért diffúz nagy B-sejtes limfómának (DLBCL-nek) nevezik. További és ritkább, összességében 15–20%-ot kitevő, nagy B-sejtekből felépülő limfómák is léteznek, melyeket egyedi klinikopathológiai sajátosságai miatt a vizsgálatunk alatt érvényes (WHO-HAEM4R) valamint a jelenlegi (WHO-HAEM5) osztályozás is más elnevezések alatt határoz meg [6, 20, 27]. Jelen tanulmányunk tárgyát az előbbi, DLBCL csoportba tartozó betegségek



3. ábra. Típusos iFISH jel mintázatok génátrendeződés, valamint géntöbblet (nyeres/amplifikáció) esetén. **a** *MYC* piros (P) jel, *IGH* zöld (Z) jel, *IGH::MYC* átrendeződés – kolokalizált/sárga fúziós (F) jel; **b** *BCL6* telomerikus 3q27 régió P jel, centromerikus 3q27 régió Z jel, intakt *BCL6* gén – kolokalizált szignálok, *BCL6* gén törés – önálló Z/P jelek; **c** *MYC* (P), *IGH* (Z), CEP8-Aqua (A), ~9-szeres P/Z, illetve P/A arány (kb. 16 *MYC* géntöbblet), < homogénen festődő régió – HSR, << felhőszerű iFISH jelölődés; **d** *BCL2* P jel, *IGH* Z jel, ~3,5-szörös P/Z amplifikáció (~5 *BCL2* géntöbblet), **e** ~4-szeres P-Z kolokalizált jel/mag (~6-szörös *BCL6* géntöbblet), telomerikus 3q27 régió Z jel, centromerikus 3q27 régió P jel; **d** és **e** gyöngyfűszerű iFISH jel mintázat – intrakromoszómális gén sokszorozódás; **a** – **e** 63x olaj immerzió

A CD10, BCL6, MUM1 immunhisztokémiai reaktivitás és a Hans' algoritmus alapján a limfómák közel 1/3-a (37,3%-a) nyert GCB-sejt-szerű, míg közel 2/3-a (62,7%) nem GCB-sejt-szerű besorolást. Ez a Hans' osztályozás alapján publikált adatokban észlelt GCB típusú limfómák gyakorisági tartományának alsó határa körüli GCB típusú DLBCL arányt és jelentős nem GCB-sejt-szerű limfóma túlsúlyt mutat az általunk vizsgált beteganyagban [7, 15, 28]. A Hans' fenotípus stratifikáció ebben a tanulmányban megbízhatónak tartható, mivel a GEP vizsgálat során azonosított, differenciáltan expresszált gének, valamint a Hans' klasszifikáció alapján a DLBCL esetek 82,6%-ban azonos besorolást nyertek. Továbbá a vizsgált kohorsz Hans' osztályozása és a közelmúltban publikált, 32 génes klasszifikáló alapján végzett GEP csoport analízisünk jó korrelációt, 81,0%-ban megegyező besorolást mutatott [26]. A fenti Hans' és GEP klasszifikáció közötti eltéréseket magyarázhatja az az ismert tény, hogy a DLBCL esetek 15–20%-ot kitevő, GEP alapján nem osztályozható csoportját immunhisztológiai profil alapján sem lehet felismerni [6]. Ezt példázza az az eredményünk is, miszerint a GEP-analízis heterogenitást is mutatott mind a Hans' GCB, mind a nem GCB csoportban egyaránt. A klinikai adatok birtokában tervezzük annak vizsgálatát, hogy a homogén fenotípus-csoportokban észlelt GEP-heterogenitás képvisel-e prognosztikai heterogenitást.

DLBCL-ben az *IGH::MYC*, *IGH::BCL2* fúzió, illetve a *BCL6* törés típusú átrendeződések (R) incidenciája – a nemzetközi adatok alapján – tág határok között, a 4–24%, 3–30%, illetve a 14–30% tartományban mozog [8, 9, 12–15, 28–31]. Ezen aberrációk incidenciái jelen kohorszban ezen tartományok alsó zónájába esnek. Feltűnő, hogy a nemzetközi adatok alapján a 0,5–10%, 0,5–1,5%, illetve 0–3% incidenciatartományt mutató DH-1, DH-2, illetve TH limfóma közül e vizsgálatban csak a DH-1, *MYC*-R és *BCL2*-R genotípusú limfóma mutatható ki 1,4% arányban, míg a másik kettő nem fordul elő. Ezt geográfiai különbségeken kívül nehéz lenne mással magyarázni. Nem valószínűsíthető, hogy az eredményeket befolyásolta az, hogy a *MYC*-R aberrációt az *IGH::MYC* specifikus dupla fúziós (DF) iFISH-szondával vizsgáltuk, mivel az összes *MYC* átrendeződésnek csak kb. 10%-ában szerepelnek partnerként az immunoglobulin könnyűláncok (*MYC/IGL*), a DF iFISH-szonda szenzitivitása az 'elválo' (BA) szondánál 5–10%-kal magasabb, továbbá a 40–50%-ot kitevő, nem IG génnel történő átrendeződés (*MYC*-R-nemIG) vizsgálata – ismeretlen hatása miatt – jelenleg nem elvárt [8, 9, 12, 16].

Az izolált *MYC*-R nem szignifikáns megoszlása a GCB vs. nem GCB főcsoportok között arra utalhat, hogy ez az aberráció önmagában nem tehető felelőssé a két főcsoport közötti, irodalmilag dokumentált, prognosztikai különbségért [10, 12]. Az izolált vagy kombinált *BCL2*-R GCB limfómákhoz, a *BCL6*-R nem GCB limfómákhoz mutatott szignifikáns asszociációja ezen aberrációk független, prognózist befolyásoló szerepére utalhatnak. Az a tény, hogy a *MYC*, *BCL2* és *BCL6* gének kópiaszámeltéréseinek egyikénél sem lehetett szignifikáns halmozódást kimutatni a Hans' főcsoportok között, ezen genetikai eltérések prognózist nem

befolyásoló hatását vélelmezhetik. E témakörben a kópiaszámeltérések prognosztikai hatására vonatkozó, ellentmondásos publikációk sora ismert, beleértve a nagyon ritka magas grádusú amplifikáció ('megszámlálhatatlan iFISH szignál' típusú aberráció) jelentőségét, egyáltalán a kópiaszám-küszöbérték meghatározásának hiányát [12, 18, 28].

A DLBCL-ben prognosztikus genetikai eltérések, transzlokációk, amplifikációk, vizsgálata iFISH-eljárással történik. Ez azonban drága, időt, szakértő humán erőforrást és laboratóriumi technikát igénylő eljárás. Ezért felmerül, hogy előzetes szűréssel lehet-e csökkenteni az iFISH-sel vizsgálandó DLBCL szövetminták arányát, a pozitív minták vesztese nélkül. Jelen tanulmányban a prognosztikus dupla protein expresszor (DPE, *MYC* és *BCL2*) klasszifikáló erejét vizsgáltuk. A DPE+ fenotípus azonban a sejteredet szerinti Hans' főcsoportokkal, ezek molekuláris alcsoportjai között – döntő többségben – nem mutatott szignifikáns összefüggést. Alacsony szenzitivitása és specifitása miatt a pozitív prediktív értéke (PPV) olyan alacsony – kevesebb mint 0,30 – zónába esik, mely hatékony, legalább 95%-os konfidenciájú előszűrő alkalmazását nem teszi lehetővé. A DPE negatív prediktív értéke (NPV) viszont a két Hans' főcsoport összesen 6 molekuláris alcsoportjából 5-ben, belefoglalva a legfontosabb *MYC*-R, *BCL2*-R aberrációkat és kombinációikat, 1,00, azaz a DPE negatív fenotípus 100%-os megbízhatósággal előszűri a prognosztikus genetikai aberrációra negatív, iFISH-eljárással nem vizsgálandó, DLBCL mintákat. Ez az eredményünk nagyfokban megegyezik három másik tanulmányban a DPE-, illetve a *MYC* protein- fenotípus negatív prediktív értékére vonatkozó észleletekkel, annak ellenére, hogy az ezekben észlelt 34–41%-os DPE-pozitivitásnál tanulmányunkban jelentősen magasabb ezen fenotípus gyakorisága [13–15].

Vizsgálataink alapján nyert főbb következtetéseink:

1. Az izolált *IGH::MYC* a DLBCL Hans' főcsoportokra nem specifikus genotípus.
2. Az *IGH::BCL2*, izoláltan vagy kombinációban, GCB-szerű limfóma asszociált esemény.
3. A *BCL6*-R a nem GCB-szerű Hans' limfóma csoport molekuláris fémjele.
4. A *MYC*, *BCL2*, *BCL6* kópiaszám eltérések (nyerés, illetve amplifikáció) mindkét Hans' DLBCL csoportban előfordulnak.
5. A DPE-fenotípus 100%-os konfidenciával kizárja az *IGH::MYC*, valamint az *IGH::BCL2* és ezek kombinációit hordozó DLBCL genotípusokat.

Nyilatkozat: A közlemény más folyóiratban korábban nem jelent meg, és máshová nem került beküldésre. A levelező szerző elolvasta a szerzői útmutatót.

Anyagi támogatás/köszönetnyilvánítás: A kutatást az NVKP_16-1-2016-0005, az NRDI Hivatal, Magyarország TKP alap, az EFOP-3.6.1-16-2016-0004, TKP 2020/2020-4.1.1., GINOP-2.3.4-15-2020-00010, GINOP-2.3.1-20-2020-00001, BECOMING 2019-1-HU01-KA203-061251, a KA-2019-32, az ELIXIR Magyarország és az MTA PAB Klinikopathológiai Munkabizottsága támogatta.



Etikai Bizottsági engedély – Helsinki Deklaráció: PTE KK RIKEB, ETT TUKEB szakhatósági hozzájárulás alapján kiadott EGYÉI 50268-8/2017 sz. engedély. A dolgozat nem sérti a Helsinki Deklaráció (1975, revízió 2008) előírásait.

Szerzői munkamegosztás: VNI, PL, AH, GyA tervezte a projektet, KJ, HR, GB végezte a GEP és a bioinformatikai vizsgálatokat, RZs, BaA, AH analizálta a klinikai adatokat, HG, BT, CzJ, PA, ÖG, BE, LE, KN, BO, BoA, TL végezte a primer patológiai diagnosztikát, PL, KL végezte a patológiai konziliumi diagnosztikát, PL, PG értékelte az iFISH-vizsgálatokat, PL, GyA írta a kéziratot, KB, TT publikációs konzulensként működött közre. Valamennyi szerző olvasta és jóváhagyta a kéziratot.

Érdekeltségek: A szerzőknek nincsenek érdekeltségeik.

RÖVIDÍTÉSEK

| | |
|-------|--|
| ABC | aktivált B-sejt |
| ÁN | álnegatív |
| ÁP | álpozitív |
| COO | 'cell-of-origin', sejteredet, |
| CNA | 'copy number alteration', kópiaszám-változás |
| DH | 'double hit', dupla aberráció |
| DLBCL | diffúz nagy B-sejtes limfóma |
| DPE | dupla protein expresszor |
| FFPE | formalinban fixált paraffinba ágyazott |
| F | fúzió |
| G/A | gain/amplification, nyeres/amplifikáció |
| GEP | génexpressziós profil |
| GCB | germinális centrum B-sejt |
| HGBL | magas malignitású B-sejtes limfóma |
| HSR | homogén festődésű régió |
| iFISH | interfázis fluoreszcens in situ hibridizáció |
| IH | immunhisztológia |
| NGS | új generációs szekvenálás |
| NPV | negatív prediktív érték |
| PPV | pozitív prediktív érték |
| R | génátrendezés |
| TH | 'triple hit', tripla aberráció |
| TPM | transzkriptum per millió |
| VN | valódi negatív |
| VP | valódi pozitív |

IRODALOM

- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503–11.
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 1937–47.
- Wright G, Tan B[†], Rosenwald A[†], et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 9991–6.
- Meyer PN, Fu K, Greiner TC, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with Rituximab. *J Clin Oncol* 2011; 29: 200–7.
- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103: 275–82.
- Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma, NOS. In: Swerdlow SH, editor. WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. France: International Agency of Research on Cancer; 2017, pp. 291–7.
- Barrans S, Crouch S, Smith A, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of Rituximab. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3360–5.
- Pedersen MØ[†], Gang AO[†], Pulsen TS, et al. MYC translocation partner gene determines survival of patients with large B-cell lymphoma with MYC- or double-hit MYC/BCL2 translocations. *Eur J Haematol* 2013; 92: 42–8.
- Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood* 2015; 126: 2466–74.
- Ye Q, Xu-Monette ZY, Tzankov A, et al. Prognostic impact of concurrent MYC and BCL6 rearrangements and expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 2015; 7: 2401–16.
- Sesques P, Johnson NA. Approach to the diagnosis and treatment of high-grade B-cell lymphomas with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements. *Blood* 2017; 129: 280–8.
- Li S, Young KH, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology* 2018; 50: 74–87.
- Scott DW, King RL, Staiger A, et al. High-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with diffuse large B-cell lymphoma morphology. *Blood* 2018; 131: 2060–4.
- Copie-Bergman C. Double-hit DLBCL: should we limit FISH testing? *Blood* 2018; 131: 1997–8.
- Timlin DM, O'Hare K, Walker J, et al. FISH studies in DLBCL: correlations with cell of origin: the Irish experience. *J Clin Pathol* 2018; 71: 946–7.
- McPhail ED, Maurer MJ, Macon WR, et al. Inferior survival in high-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements is not associated with MYC/IG gene rearrangements. *Haematologica* 2018; 103: 1899–907.
- Ennishi D, Jiang A, Boyle M, et al. Double-hit gene expressions signatura defines a distinct subgroup of germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2019; 37: 190–201.
- Pophali PA, Marinelli LM, Ketterling RP, et al. High level MYC amplification in B-cell lymphomas: is it a marker of aggressive disease? *Blood Cancer J* 2020; 10: 5. <https://doi.org/10.1038/s41408-019-0271-z>.
- Wright GW, Huang DW, Phelan JD, et al. A probabilistic classification tool for genetic subtypes of diffuse large B-cell lymphoma with therapeutic implications. *Cancer Cell* 2020; 37: 551–68.
- Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36: 1720–48.



- [21] Pajor G, Kajtár B, Pajor L, et al. State-of-the-art FISHing: automated analysis of cytogenetic aberrations in interphase nuclei. *Cytometry A* 2012; 81A: 649–63.
- [22] Liao Y, Smyth GK, Shi W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res* 2019; 47: e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz114>.
- [23] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 2010; 26: 139–40.
- [24] Law CW, Chen Y, Shi W, et al. voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol* 2014; 15: R29. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29>.
- [25] Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>.
- [26] Yan WH, Jiang XN, Wang WG, et al. Cell-of-Origin subtyping of diffuse large B-cell lymphoma by using a qPCR-based gene expression assay on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Front Oncol* 2020; 10: 803. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00803>.
- [27] Campo E. Pathology and classification of aggressive mature B-cell lymphomas. *Hematol Oncol* 2017; 35: 80–3.
- [28] Yoon SO, Jeon YK, Paik JH, et al. MYC translocation and an increased copy number predict poor prognosis in adult diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), especially in germinal centre-like B cell (GCB) type. *Histopathology* 2008; 53: 205–17.
- [29] Oberman EC, Csató M, Dirnhofer S, et al. Aberrations of the MYC gene in unselected cases of diffuse large B-cell lymphoma are rare and unpredictable by morphological or immunohistochemical assessment. *J Clin Pathol* 2009; 62: 754–6.
- [30] Barran Sh, Crouch S, Smith A, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of Rituximab. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3360–5.
- [31] Zhang YX, Wang H, Ren C, et al. Correlation between C-MYC, BCL-2 and BCL-6 protein expression and gene translocation as biomarkers in diagnosis and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Front Pharmacol* 2019; 9: 1–11.



Two-Year Event-Free Survival Prediction in DLBCL Patients Based on *In Vivo* Radiomics and Clinical Parameters

Zsombor Ritter^{1*}, László Papp², Katalin Zámbo¹, Zoltán Tóth³, Dániel Dezső¹, Dániel Sándor Veres⁴, Domokos Máthé^{4,5}, Ferenc Budán^{6,7}, Éva Karádi⁸, Anett Balikó⁹, László Pajor¹⁰, Árpád Szomor¹¹, Erzsébet Schmidt¹ and Hussain Alizadeh¹¹

¹ Department of Medical Imaging, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ² Medical University of Vienna, Center for Medical Physics and Biomedical Engineering, Vienna, Austria, ³ University of Kaposvár, PET Medicopus Nonprofit Ltd., Kaposvár, Hungary, ⁴ Department of Biophysics and Radiation Biology, Faculty of Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary, ⁵ In Vivo Imaging Advanced Core Facility, Hungarian Centre of Excellence for Molecular Medicine, Budapest, Hungary, ⁶ Institute of Transdisciplinary Discoveries, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ⁷ Institute of Physiology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ⁸ Department of Hematology, University of Kaposvár, Kaposvár, Hungary, ⁹ County Hospital Tolna, János Balassa Hospital, Szekszárd, Hungary, ¹⁰ Department of Pathology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, ¹¹ 1st Department of Internal Medicine, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary

OPEN ACCESS

Edited by:

Marta Sonia González Pérez,
University Clinical Hospital of Santiago,
Spain

Reviewed by:

Lijun Lu,
Southern Medical University, China
Francesco Mattana,
European Institute of Oncology (IEO),
Italy

*Correspondence:

Zsombor Ritter
ritterzsombor@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Hematologic Malignancies,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 22 November 2021

Accepted: 18 May 2022

Published: 08 June 2022

Citation:

Ritter Z, Papp L, Zámbo K, Tóth Z,
Dezső D, Veres DS, Máthé D,
Budán F, Karádi É, Balikó A, Pajor L,
Szomor Á, Schmidt E and Alizadeh H
(2022) Two-Year Event-Free Survival
Prediction in DLBCL Patients Based
on *In Vivo* Radiomics and
Clinical Parameters.
Front. Oncol. 12:820136.
doi: 10.3389/fonc.2022.820136

Purpose: For the identification of high-risk patients in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), we investigated the prognostic significance of *in vivo* radiomics derived from baseline [¹⁸F]FDG PET/CT and clinical parameters.

Methods: Pre-treatment [¹⁸F]FDG PET/CT scans of 85 patients diagnosed with DLBCL were assessed. The scans were carried out in two clinical centers. Two-year event-free survival (EFS) was defined. After delineation of lymphoma lesions, conventional PET parameters and *in vivo* radiomics were extracted. For 2-year EFS prognosis assessment, the Center 1 dataset was utilized as the training set and underwent automated machine learning analysis. The dataset of Center 2 was utilized as an independent test set to validate the established predictive model built by the dataset of Center 1.

Results: The automated machine learning analysis of the Center 1 dataset revealed that the most important features for building 2-year EFS are as follows: max diameter, neighbor gray tone difference matrix (NGTDM) busyness, total lesion glycolysis, total metabolic tumor volume, and NGTDM coarseness. The predictive model built on the Center 1 dataset yielded 79% sensitivity, 83% specificity, 69% positive predictive value, 89% negative predictive value, and 0.85 AUC by evaluating the Center 2 dataset.

Conclusion: Based on our dual-center retrospective analysis, predicting 2-year EFS built on imaging features is feasible by utilizing high-performance automated machine learning.

Keywords: DLBCL, radiomics, [¹⁸F]FDG PET/CT, automated machine learning, tumor imaging

INTRODUCTION

Non-Hodgkin lymphoma (NHL) is globally the most common hematological malignancy, accounting for nearly 3% of cancer diagnoses and deaths (1). The NHLs are a diverse group of malignancies, about 80% of which are of B-cell origin (B-NHL) in the Western hemisphere. The most common histologic subtype in adults worldwide is diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), comprising about 30%–40% of NHLs diagnosed each year (2, 3). DLBCL comprises a heterogeneous group of diseases with different biology, clinical presentations, and response to treatment (4, 5). DLBCL is potentially curable with standard treatment in 50%–60% of cases. About 25%–30% of patients are resistant to standard chemo-immunotherapy; therefore, other therapeutic approaches are utilized, namely, 20% of patients are treated with salvage therapy including high-dose therapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation (4, 6, 7).

Advances on the understanding of the genetic landscape and molecular features of DLBCL have identified high-risk groups with poor response to chemo-immunotherapy. There is an unmet clinical need to identify these high-risk patients as early as possible in order to apply targeted and more intensive therapy on individualized basis, as the majority of refractory or relapsed patients will eventually die from their disease. The initial evaluation of DLBCL patients is aimed at determining the stage of the disease and assessing for end-organ damage either by the disease and/or preexisting comorbid conditions. The workup in a patient with suspected lymphoma usually starts with comprehensive chemistry panel including complete blood counts with differentials, hemostasis parameters, renal function, hepatic function, lactate dehydrogenase enzyme (LDH), beta-2-microglobulin (B2M), hepatitis B and C, Epstein–Barr Virus (EBV), and human immunodeficiency viral serology. Lymph node biopsy is required to establish a definitive diagnosis of lymphoma; this should be an excisional biopsy rather than a needle biopsy, because nodal architecture is often difficult to assess when small amounts of tissue are used (8–10).

After the histologic confirmation of DLBCL, imaging study is requested to assess the extent and stage of disease. The preferred imaging modality is functional imaging with 2-deoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose [^{18}F](FDG) positron emission tomography/x-ray computed tomography (PET/CT) (hereinafter referred to as [^{18}F](FDG) PET/CT). This modality is the mostly used at baseline, prior to the start of treatment and for monitoring the efficacy of therapy (11–13).

Taking into consideration that about 20%–25% of patients are primarily resistant to the current 1st-line treatment with rituximab-based chemo-immunotherapy (14), identifying the high-risk group that does not respond has very high priority. One of these modalities could be the use of conventional and textural parameters derived from the baseline [^{18}F](FDG) PET/CT. Methods to individualize treatment choices are being increasingly employed in different clinical trials, yielding favorable correlations with improved response rates (5, 15). Studies in the field of cancer imaging research have been actively engaged with radiomics in combination with machine

learning (16). However, radiomics has been reported to be sensitive to various factors such as individual biology, acquisition protocols, choice of delineation, binning and resolution, as well as calculation methods, which challenge prior studies to repeat (17). Nevertheless, standardization proposals such as the Imaging Biomarker Standardization Initiative (IBSI) (18) support the endeavor to report findings in a repeatable way.

In DLBCL patients, disease characteristics and outcomes vary widely, pointing to the importance of patient's classification through identification of sensitive prognostic features especially prior to the start of therapy. For this purpose, we have tried to elucidate the prognostic significance of metabolic heterogeneity (19). We have highlighted metabolically active tumor volume and standardized uptake value (SUV)-based parameters such as SUV-max, SUV-min, total metabolic tumor volume (TMTV), and total lesion glycolysis (TLG) and compared their applicability with other radiomic parameters as well as clinical and pathological data.

We hypothesize that 2-year event-free survival (EFS) prediction models built on these features are feasible by utilizing automated machine learning in a multi-center environment. Hence, the objectives of this study were (a) to collect a dual-center dataset including conventional PET, radiomics, and clinical parameters of DLBCL patients; (b) to build a 2-year EFS prediction model by using one center data; and (c) to validate the established model by an independent dataset coming from another center.

MATERIALS AND METHODS

Patient's Data

The baseline pretreatment [^{18}F](FDG) PET/CT scans of 85 patients diagnosed with DLBCL performed in the period between January 2014 and December 2019 were assessed. The [^{18}F](FDG) PET/CT scans were carried out in two centers: at University of Pécs, Department of Medical Imaging—Center 1 including 41 patients, and at University of Kaposvár, Hungary—Center 2 including 44 patients. The median age of patients in this study population was 59 years (range: 23–81 years) with 48.20% ($n = 41$) of patients older than 60. In this cohort, 40 (47%) patients were male, and 45 (53%) were female. The patients with incomplete medical records and those who received non-standard treatments were excluded from the final analysis. The Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status >2 was reported in 27 (31.80%) cases (in 2 cases, the ECOG status was unknown) with ECOG status unknown in 2 patients. All patients were treated with standard R-CHOP-21 treatment regimen for at least 4 full cycles. The patients were classified to germinal center B-cell-like (GCB) or activated B-cell (non-GCB) type using the Hans algorithm (20). The data regarding the cell of origin (COO) (based on the Hans algorithm) were available in 82 patients; 29 (37.60%) were GCB and 53 (62.40%) were non-GCB. The clinical stage was evaluated by the modified Ann Arbor and Lugano classification.

The pathological and clinical data and the Revised International Prognostic Index (R-IPI) were also determined before the initiation of the therapy (R-IPI: 0: 8, 1: 15, 2: 23, 3: 27, 4: 12 patients).

EFS was defined as the time from registration date to disease relapse, progression, or death related to the lymphoma. Complete response (CR), partial response (PR), progression (PD), refractory disease, and relapse were defined according to the International Working Group response criteria for lymphoma (11, 21).

[¹⁸F]FDG PET/CT Studies

Pretreatment whole-body [¹⁸F]FDG PET/CT scans were performed using a Mediso AnyScan 16 PET/CT scanner in 41 patients (Center 1) and a Siemens Biograph Truepoint 64 PET/CT scanner in 44 patients (Center 2). All patients in the study were subjected to full history and complete clinical examination including the clinical stage of the disease. The patients were instructed to fast for 6 h before the scan. Blood glucose level was ensured to be below <8 mmol/L in all patients before the injection of radiotracer. Intravenous (i.v.) injection of [¹⁸F]FDG through an i.v. line with a dose of 3–4 MBq/kg was administered. After tracer injection, the patient was asked to stay for at least 60 min in a dark room covered by warm blankets. No speaking, chewing, or reading was allowed.

During a PET-CT examination in Center 1, we execute a low-dose CT scan first with the following parameters: x-ray tube voltage: 120 kVp (depending on the patient's size, 140 kVp is used in bariatric patients), x-ray tube current: 24–26 mAs (also depending on the patient's size, a higher tube current can be applied in bariatric patients), pitch: 1.5, and slice thickness: 2.5 mm. In order to achieve attenuation correction and accurate body mapping, the CT series has to cover the whole PET range of patients from skull to mid-thighs. After this step, the PET acquisition follows the CT series without delay. We have applied the 3D acquisition method for PET data collection with a 3 min frame time. Usually, between 7 and 10 bed positions can cover a general scan range, by axial FOV: 15.12 cm (longitudinal FOV in the patient's z-axis). According to the manufacturer's recommendations, the PET images were iteratively reconstructed using the Tera-Tomo™ 3D image reconstruction algorithm in a 167 × 167 × 234 matrix, which resulted in an isotropic voxel size of 4 mm.

In the Center 2 PET-CT examination, we execute a low-dose CT scan first with the following parameters: x-ray tube voltage: 120 kVp (depending on the patient's size, 140 kVp is used in bariatric patients), x-ray tube current: reference effective mAs: 60 using CareDose, pitch: 1.5, and slice thickness: 5 mm. In order to achieve attenuation correction and accurate body mapping, the CT series shall cover the whole PET range of patients from skull to mid-thighs. After this step, the PET acquisition follows the CT series without delay. We apply 3D mode acquisition for PET data collection with 3 min frame time. Usually, between 7 and 9 bed positions can cover a general scan range, by axial FOV: 16.2 cm (longitudinal FOV in the patient's z-axis). PET images were iteratively reconstructed using the 2D OSEM (3i8s, 5 mm

Gaussian filtering) image reconstruction algorithm in a 168 × 168 matrix.

Delineation and Feature Extraction

Lymphoma lesions were detected by InterView FUSION ver. 3.10 (Mediso Medical Imaging Systems Ltd., Budapest, Hungary) clinical evaluation software. The average SUV-max value of the liver (3.5–5.5) served as a reference threshold for the semi-automated algorithm (22). This approach was selected to minimize the effects of patient-specific radiotracer distributions (23). The average of three randomly placed volumes of interest (VOIs) from the unaffected liver regions was used. After the execution of the algorithm with the selected parameters from the automatically segmented regions, the non-affected regions, such as regions with physiological activity (urine in kidneys or in the bladder, or brain activity) or radiotracer accumulations, which are not related to the lymphoma (such as bowel uptake caused by metformin intake), were manually excluded. TLG, TMTV, and SUV-max were automatically calculated across all delineated lesions. Furthermore, SUV-peak values were segmented from the VOI with the highest activity. For further radiomic feature extraction, the largest VOI was selected in each patient. From each of these VOIs, IBSI radiomic features including intensity, histogram, morphological, neighborhood gray-tone difference matrix (NGTDM), gray-level co-occurrence matrix (GLCM), gray-level run length matrix (GLRLM), and gray-level size zone matrix (GLSZM) features were extracted. For the IBSI-conform reporting details of the radiomic analysis, see **Supplementary Table 1**.

Reference Standard

During the follow up, 2-year EFS was chosen as a clinically relevant cutoff point (24). Based on this criterion, patients were selected into two groups. In Group 0, the patients had no events during the 2-year follow up, and in group 1, the patients had primary refractory disease or relapsed during the 2-year period.

Statistical Analysis

A chi-square test was used for the assessment of binary variables via SPSS (SPSS statistical software 27). First, data from both centers were evaluated together based on 2-year EFS. A significant association was sought between the two groups, defined above and the following clinical data: sex, stage, R-IPI, and COO. Data were also separated by the two centers, where the [¹⁸F]FDG PET/CT scans were performed. A significant relationship was sought between the two centers and the two clinical outcomes, stages, R-IPI values, and COO. The test results were considered statistically significant if the *p*-value was under 0.05.

Automated Machine Learning Analysis and Biomarker Identification

The Center 1 dataset was utilized as a training set, given that it had more balanced remission–progression subgroups compared to Center 2 (**Table 2**). The dataset underwent automated machine learning analysis from the Dedicaid AutoML

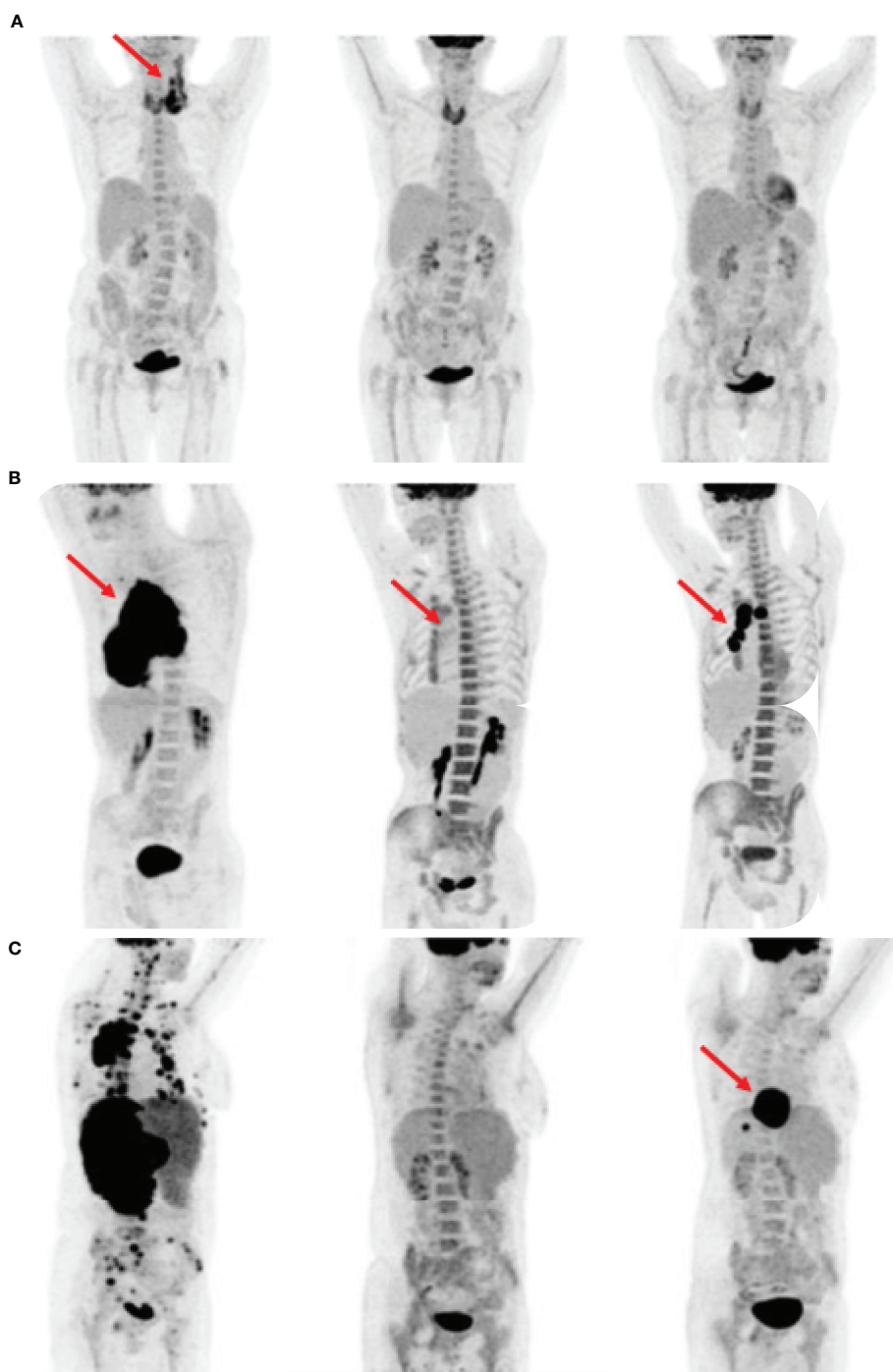


FIGURE 1 | Comparison of clinical outcomes based on maximum intensity projection (MIP) images in three patients (A–C). By each patient, the first image shows primary staging, the second shows interim PET scan, and the third shows post-treatment restaging scan. The red arrows indicate FDG avid lymphoma foci. (A) Patient in complete remission to treatment. The increased FDG uptake in all three images was a sign of thyroiditis. (B) Patient without complete remission during and after the therapy. The interim scan showed Deauville score 4. (C) Patient had an interim scan with Deauville score 3 but relapsed after the treatment.

Research package (Dedicaid GmbH, Vienna, Austria). This step included automated data preprocessing for redundancy reduction, class imbalance reduction, as well as feature engineering, ranking, and selection (25). The data were split

into 100-fold *via* random subsampling (26), and mixed ensemble learning was applied in each fold to generate a model predicting the final 2-year EFS. For quality control, the AutoML approach also performed a single-center cross-validation across the 100-

TABLE 1 | Comparison of clinical outcome of the patients and their clinical data.

| Variables | No Progression or Remission | Progression within 24 months | p-value |
|----------------------|-----------------------------|------------------------------|---------|
| Sex, n = 85 | (n = 55) | (n = 30) | 0.611 |
| Male (n, %) | 28 (32.9%) | 17 (20%) | |
| Female (n, %) | 27 (31.8%) | 13 (15.3%) | |
| ECOG, n = 83 | (n = 55) | (n = 28) | 0.113 |
| 0 (n, %) | 16 (19.3%) | 6 (7.2%) | |
| 1 (n, %) | 26 (31.3%) | 8 (9.6%) | |
| 2 (n, %) | 11 (13.3%) | 12 (14.5%) | |
| 3 (n, %) | 2 (2.4%) | 2 (2.4%) | |
| Stage, n = 85 | (n = 55) | (n = 30) | 0.017 |
| 1 (n, %) | 10 (11.8%) | 0 | |
| 2 (n, %) | 17 (20%) | 5 (5.9%) | |
| 3 (n, %) | 9 (10.6%) | 8 (9.4%) | |
| 4 (n, %) | 19 (22.6%) | 17 (20%) | |
| R-IPi, n = 85 | (n = 55) | (n = 30) | 0.015 |
| 0 (n, %) | 7 (8.2%) | 1 (1.2%) | |
| 1 (n, %) | 29 (34.1%) | 9 (10.6%) | |
| 2 (n, %) | 19 (22.6%) | 20 (23.5%) | |
| COO, n = 82 | (n = 53) | (n = 29) | 0.018 |
| GC (n, %) | 27 (32.9%) | 7 (8.5%) | |
| N-GC (n, %) | 26 (31.7%) | 22 (26.8%) | |

Chi-square test was performed in order to find the association between the outcome and the specified clinical status of the patients suffering from DLBCL.

fold of Center 1. Lastly, the final feature ranking was generated by averaging the 100-fold feature importance and normalizing them to the sum of 1.0. Features higher than half of the highest feature rank were considered high-ranking and were analyzed for imaging biomarker identifications.

For details of the automated machine learning process, including all methodological steps and their parameters, see the Supplemental Material.

Independent Validation of the Prediction Model

The dataset of Center 2 was utilized as an independent test set to validate the established predictive model built by the dataset of Center 1. Confusion matrix analytics were utilized to calculate

the number of true-positive, true-negative, false-positive, and false-negative prediction occurrences of each Center 2 case. Sensitivity, specificity, positive predictive value, accuracy, and area under the receiver operator characteristic (ROC) curve (AUC) were calculated across the validation cases.

RESULTS

Patient Data

At the end of the standard induction therapy, 55 patients achieved complete metabolic remission. During the 2-year follow-up, 14 patients had primary refractory disease, 14 patients relapsed within 12 months, and 2 patients had

TABLE 2 | Comparison of patients regarding to the two clinical centers where the FDG PET/CT examinations were performed.

| Variables | Center 1 (Pécs) (n = 41) | Center 2 (Kaposvár) (n = 44) | p-value |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------|
| Clinical outcome, n = 85 | | | 0.487 |
| No Progression or Remission (n, %) | 25 (29.4%) | 30 (35.3%) | |
| Progression within 24 months (n, %) | 16 (18.8%) | 14 (16.5%) | |
| Lymphoma stage, n = 85 | | | 0.877 |
| 1 (n, %) | 6 (7%) | 4 (4.7%) | |
| 2 (n, %) | 11 (12.9%) | 11 (12.9%) | |
| 3 (n, %) | 10 (11.8%) | 7 (8.2%) | |
| 4 (n, %) | 14 (16.5%) | 22 (25.9%) | |
| R-IPi, n = 85 | | | 0.988 |
| 0 (n, %) | 4 (4.7%) | 4 (4.7%) | |
| 1 (n, %) | 18 (21.2%) | 20 (23.5%) | |
| 2 (n, %) | 19 (22.6%) | 20 (23.5%) | |
| COO, n = 82 | (n = 41) | (n = 41) | 0.654 |
| GC (n, %) | 18 (22%) | 16 (19.5%) | |
| N-GC (n, %) | 23 (28%) | 25 (30.5%) | |

relapsed within 24 months. In summary, after the end of therapy, 30 patients had detectable metabolically active tumor tissue and relapsed within 24 months (**Figure 1**).

Statistical Analysis

Using the data of the chi-square test, a significant association between COO, R-IPI, or stages and the specified groups was identified. There were significantly more patients in group 1 with non-GCB subtype, who had higher R-IPI values and stages. There was no significant difference between the sexes and between the groups. The clinicopathological features of patients are described in **Table 1**. In addition, patients were divided on the basis of the center where the [^{18}F]FDG PET/CT scan was performed. No association between the two above-specified clinical outcomes (based on 2-year EFS), R-IPI, stages, or COO and the center where the examinations were performed was identified (**Table 2**).

Automated Machine Learning Analysis and Biomarker Identification

Automated machine learning yielded 66% sensitivity, 77% specificity, 78% positive predictive value, 70% negative predictive value, 71% accuracy, and 0.74 AUC single-center cross-validation performance in Center 1.

Feature ranking revealed that the most important features for building 2-year EFS prediction are as follows: max diameter (9%), NGTDM busyness (9%), TLG (8%), TMTV (8%), and NGTDM coarseness (5%). The distributions of these parameters are plotted on violin plots (**Figure 2**).

Independent Validation of Prediction Model

The predictive model built on the Center 1 dataset yielded 79% sensitivity, 83% specificity, 69% positive predictive value, 89%

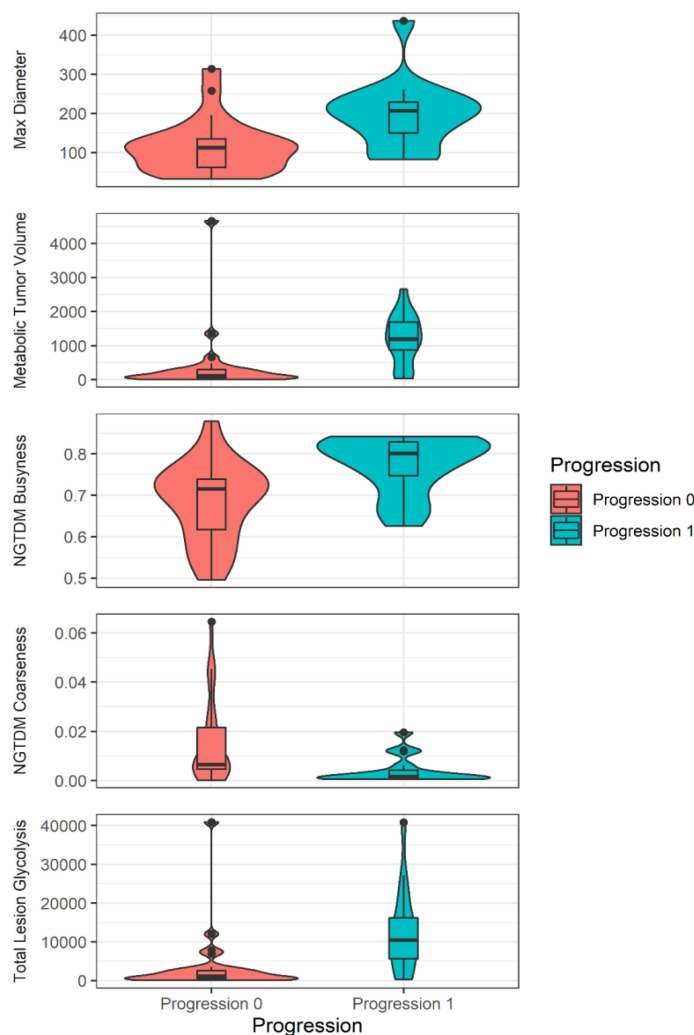


FIGURE 2 | The violin plot (R: A Language and Environment for Statistical Computing, version 4.04., using package ggplot2, version 3.3.3) shows the values of the prominent features to predict 2-year event-free survival.

negative predictive value, 82% accuracy, and 0.85 AUC by evaluating the Center 2 dataset. See **Figure 3** for the ROC curve of the independent validation performance over Center 2 cases. See **Figure 4** for the Kaplan–Meier curve of the machine learning prediction vs. EFS over samples of Center 2.

refractory or relapsed patients will eventually die from the disease. Based on available data, about 40% of patients either will be resistant to the initial line of therapy or will relapse after the initial response. The majority of these patients cannot be salvaged by high-dose chemotherapy followed by ASCT and eventually will succumb to their disease. A better understanding of the pathogenesis of disease could help us understand the unique characteristics and the course of different subtypes of disease. Tremendous progress has been made over the past 20 years to identify the subtypes of DLBCL based on the COO, which carry significant impact on the prognosis of patients. In 2000, Alizadeh et al. (28) performed gene expression profiling with cDNA microarrays to explore the molecular heterogeneity in DLBCL. They described at least two distinct groups within

DISCUSSION

DLBCL is a heterogeneous disease at many levels with diverse genetic features and variable clinical outcomes (2, 7, 27). Although DLBCL is potentially curable with standard treatment, there is an urgent need for new therapies since most

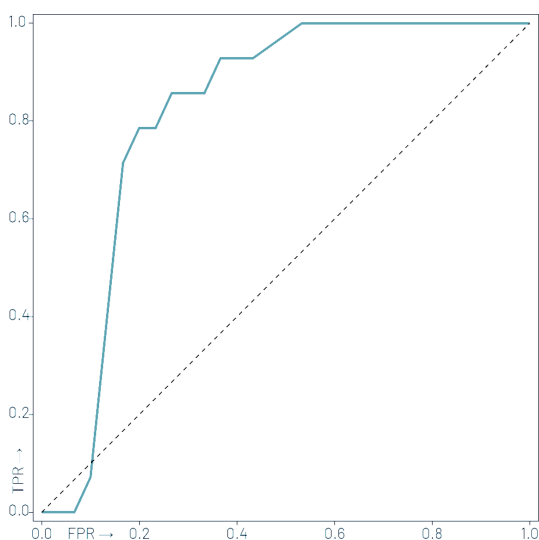


FIGURE 3 | Receiver operator characteristic (ROC) curve of the independent validation performance of the machine learning model trained over Center 1 cases to predict 2-year event-free survival over Center 2 cases with an area under the ROC (AUC) of 0.85.

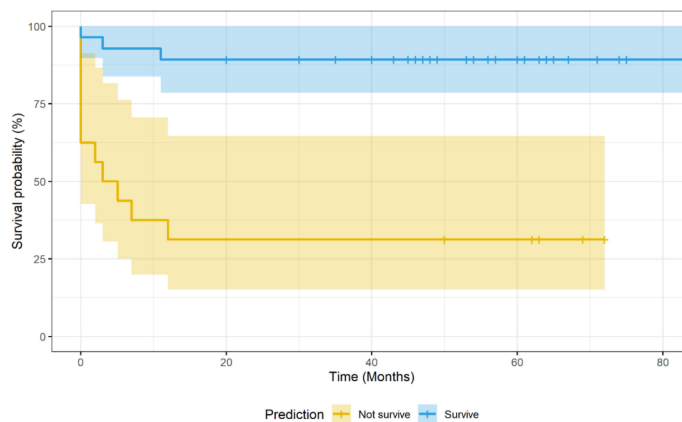


FIGURE 4 | Kaplan–Meier curve of the machine learning (ML) model prediction vs. 2-year event-free survival in Center 2 cases. The ML model was trained with Center 1 cases.

DLBCL: the GCB group and the activated B-cell-like (ABC) or non-GCB group. This method has been widely recognized as the first COO-based classification of DLBCL. In several randomized clinical trials following the establishment of COO classification by Alizadeh et al., DLBCL patients with the ABC subtype showed significantly poorer outcome compared with those with the GCB subtype, even when immune chemotherapy was used. In recent years, COO classification has been not only established as a prognostic factor but also used to target therapies for DLBCL patients. The World Health Organization (WHO) Classification for Lymphoid Malignancies requires the determination of COO for every newly diagnosed DLBCL case. In recent years, next-generation sequencing provides the possibility of more accurate classification of DLBCL. New DLBCL subgroups have been identified based on detailed molecular analysis, which may provide a more accurate prognosis prediction and pave the way for personalized target therapy (5, 7, 29).

In connection with these recent advances in the molecular classification of lymphoma, several international trials have examined whether pretreatment baseline PET or interim PET imaging can separate poor-responder patients requiring intensification of therapy from good responders to the standard treatment (30–33).

The prognostic classification of DLBCL patients was originally based on immunohistochemical and molecular genetic differences and laboratory and anamnestic data. In addition to these parameters, the results of [^{18}F]FDG PET/CT have a strong and crucial prognostic significance. For the prognosis, the current evaluation of lymphoma and therapeutic efficacy in patients relies on Deauville scoring, using hepatic [^{18}F]FDG uptake and mediastinal blood pool as reference value (11, 34).

To optimize therapy for outcomes, many recently published papers propose that in addition to the Deauville scoring and delta SUV-max, other semi-quantitative metabolic functional parameters from pretreatment functional imaging studies could be used including TMTV and TLG, which have been mostly studied in DLBCL (35–37).

In addition to these parameters, it would be important to measure tumor heterogeneity in lymphoma, which may also lead to a better prediction of prognosis. [^{18}F]FDG PET/CT is one of these non-invasive methods that examine the intratumor metabolic heterogeneity at a macroscopic scale (19, 38). Many studies in different tumor types predicted additional prognostic outcomes from textural parameters describing tumor heterogeneity (39). Tumor heterogeneity in PET can be examined generally with the analysis of the histogram or the spatial arrangement of voxel intensities extracted by computational postprocessing techniques (40). These parameters have been intensively studied in DLBCL and in other tumor types and seem to be also useful to select high-risk patients, but no definitive clinical metric proposal has been formed yet (41–46).

We aimed to investigate the potential prognostic significance of metabolic heterogeneity descriptors derived from primary PET and compare their diagnostic value with conventional

PET metrics, such as TMTV, TLG, and SUV-max, and clinical data using multicenter automated machine learning analysis. We hypothesized that we could identify and predict poor-responder patients, who may require additional molecular investigations, classification, and personalized, molecularly targeted treatment. For this, we retrospectively assessed the [^{18}F]FDG PET scans of 85 patients, which were performed in 2 clinical centers. The predictive model built on data from the first center resulted in 79% sensitivity, 83% specificity, 69% positive predictive value, 89% negative predictive value, 82% accuracy, and an AUC of 0.85 on the second center dataset. Thus, based on clinical and imaging parameters determined before starting treatment, we were able to predict with high accuracy which patients would progress or relapse within 2 years of diagnosis. It is also important to point out that the cross-validation performance was better than within Center 1 performance, which implies high robustness and generalizability of the build model. It is important to emphasize that the independent validation performance was higher utilizing Center 2 than the within-Center 1 cross-validation performance. This has multiple reasons: On the one hand, Center 1 was further split into subsets to conduct the cross-validation, which also decreases predictability due to lower number of training subsets. On the other hand, the 100-fold Monte Carlo cross-validation scheme performs splitting randomly, which may result in training-validation subsets being less similar than the similarity of Center 1 and Center 2 that represent reality, instead of a simulated distribution.

Our analysis determined prominent features to predict 2-year EFS. Based on the applied feature ranking, three volume-based biomarkers (TMTV, TLG, and max diameter of the largest VOI) and two metabolic heterogeneity descriptors (NGTDM busyness and coarseness) had the highest diagnostic significance. Volume-based parameters refer to the extent of the lymphoma. The prognostic value of semi-quantitative metrics such as TMTV and TLG in lymphoma as well as in other tumor types has already been demonstrated (35–37). In our study, the max diameter of the largest lymphoma foci appears to be a better prognosis predictor than TMTV (see **Supplementary Material: Feature importance**). While these features may be redundant, their overall importance compared to each other may be different per cohort. Therefore, future investigations shall focus on identifying which of these two features are clinically relevant. While clinical parameters were included in our ML model building process, feature ranking did not select them as relevant for predicting 2-year survival, compared to imaging features. As such, the highest-ranking clinical feature was R-IPI with a ranking of 12 and with a relative importance of 2.53%. This implies that 2-year survival can be predicted with imaging features, which may act as surrogates of, albeit being superior to clinical parameters.

According to the IBSI “Textures with large changes in grey levels between neighboring voxels are said to be busy” (40). If the busyness is high, the neighboring uptake change is sudden and not smooth. The violin plot shows that group 1 with poor prognosis has higher busyness values. This may be explained by the fact that lymphoma cells are embedded in a necrotic,

sometimes hypoxic, periphery, which may be a key point of the ineffectiveness of therapy, also because the chemotherapeutic agent may experience difficulty penetrating these regions. Furthermore, gray-level differences in coarse textures are generally small due to large-scale patterns. Summing differences gives an indication of the level of the spatial rate of change in intensity. This means that high coarseness is associated with larger regions in the lesions, while low coarseness indicates that the texture subregions are smaller. The violin plot shows that group 1 with poor prognosis has lower coarseness values. Coarseness can be associated with cell diversities within the volume regarding their different FDG uptake, which can be due to less proliferative tumor cells, or an inhomogeneous tumor mass with necrosis and hypoxic area.

In a study predicting 2-year EFS in DLBCL, low gray-level emphasis provides better prognosis prediction than TMTV, or coarseness and busyness (41), which we assume is due to population differences. Therefore, to determine the real importance of these features, prospective studies with more patients shall be performed.

In other—mostly solid—tumor types, coarseness was highlighted in predicting the outcome of locally advanced rectum cancer (45). In another study, both coarseness and busyness proved to be more predictive than other SUV-based parameters in non-small cell lung cancer (47).

Among SUV-based metrics, SUV-max is the most used parameter in routine diagnostics. With SUV-max, indolent and aggressive lymphomas could be well-differentiated, and this metric is also correlated with tumor histology (proliferation rate) and blood levels of enzymes, for example, KI-67 status and LDH (48). Several research groups have already demonstrated the diagnostic value of SUV-max in lymphoma during primer staging; in one of them, SUV-max proved to be more prognostic than TMTV or TLG (49). However, in our study, these parameters were less important features than others. We hypothesized that the SUV measurements are more influenced by the instrumentations and environmental factors than volume-based and textural parameters.

In addition to PET parameters, clinical parameters are also crucial in the prediction of prognosis, and this fact was confirmed by our statistical approach even if these parameters had lower ranks than some PET parameters. Using chi-square test results, we found a significant relationship between the DLBCL subtype groups and clinical and pathological parameters such as R-IPI and COO. Patients with non-GCB or higher R-IPI values have a significantly worse 2-year prognosis as reported in many previous studies. The prognostic value and diagnostic significance of COO and R-IPI have been known for a very long time (4, 28). The COO can be easily determined in all patients, mainly according to the Hans algorithm, and its combination with TMTV has been suggested by some studies (50). R-IPI proved to be more prognostic than TMTV in another study (51). However, most of the studies use one or a maximum of two metrics for prognosis assessment (50, 52). In contrast, machine learning-built prediction models have the potential to deliver more in-depth associations among clinical and PET data (53–55).

This study had limitations. First, we analyzed only the largest VOI in each patient with radiomics. Nevertheless, prior studies routinely analyzed the largest VOIs in DLBCL patients and yielded promising results (41, 44). In addition, radiomic analysis is generally discouraged to be performed in small lesions. Second, our patient counts were relatively low in both Center 1 and Center 2 cohorts. Nevertheless, they were from different camera systems, which allowed us to perform an independent validation scheme of our predictive model.

With our dual-center study, we could demonstrate that predicting 2-year progression-free survival in DLBCL patients is feasible with high-precision building on imaging and clinical parameters. This is in line with prior studies that utilize holistic datasets to build so-called holomics prediction models with machine learning (16, 25, 56). Given that our model yielded a balanced sensitivity and specificity, it could be a viable option to personalize the patient's treatment. In the era of personalized medicine, with more detailed and specialized molecular diagnostics—especially in DLBCL—this could help clinicians to manage their patients more adequately and effectively.

CONCLUSION

Based on our dual-center retrospective analysis, predicting 2-year EFS built on imaging features is feasible by utilizing high-performance automated machine learning. Subsequent DLBCL studies shall further evaluate the identified imaging biomarkers and their predictive performance in other clinical settings.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the appropriate local institutional research ethics committee and the Hungarian National Institute of Pharmacy and Nutrition under permission number 6536 – University of Pécs 2017 and OGYÉI/50268-8/2017. Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: ZR, KZ, and HA. Methodology: LPapp and DM. Software: LPapp. Formal analysis: FB and ES. Investigation: DD and ZR. Resources: DM and ES. Data curation: ZT, LPaj, AB, ÉK, and ÁS. Writing—original draft preparation: ZR and HA. Writing—review and editing: LPapp, HA, KZ, and ES. Visualization: DM and DV. Supervision: HA, KZ, and LPapp. Project administration: ES and ZR. Funding acquisition: HA,

DM, and KZ. All authors commented on previous versions of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

FUNDING

The research was supported by the Hungarian Government's higher Education Institutional Excellence Program project 20765-3/2018/FEKUTSTRAT. Research leading to these results has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No. 739593. HCEMM was supported by EU Program: H2020-EU.4.a. This work was also partly funded by a grant from the Hungarian National Research, Development and Innovation Office (Thematic Excellence Program, TKP-BIOImaging, financed under the 2020-4.1.1-TKP2020 funding scheme).

REFERENCES

1. Thandra KC, Barsouk A, Saginala K, Padala SA, Rawla P. Epidemiology of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Med Sci (Basel)* (2021) 9:1–9. doi: 10.3390/medsci9010005
2. Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* (2013) 87:146–71. doi: 10.1016/j.critrevonc.2012.12.009
3. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 Revision of the World Health Organization Classification of Lymphoid Neoplasms. *Blood* (2016) 127:2375–90. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569
4. Li S, Young KH, Medeiros LJ. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Pathology* (2018) 50:74–87. doi: 10.1016/j.pathol.2017.09.006
5. Abramson JS. Hitting Back at Lymphoma: How do Modern Diagnostics Identify High-Risk Diffuse Large B-Cell Lymphoma Subsets and Alter Treatment? *Cancer* (2019) 125:3111–20. doi: 10.1002/cncr.32145
6. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Genetics of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood* (2018) 131:2307–19. doi: 10.1182/blood-2017-11-764332
7. Liu Y, Barta SK. Diffuse Large B-Cell Lymphoma: 2019 Update on Diagnosis, Risk Stratification, and Treatment. *Am J Hematol* (2019) 94:604–16. doi: 10.1002/ajh.25460
8. Kubuschok B, Held G, Pfreundschuh M. Management of Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL). *Cancer Treat Res* (2015) 165:271–88. doi: 10.1007/978-3-319-13150-4_11
9. Caimi PF, Hill BT, Hsi ED, Smith MR. Clinical Approach to Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Blood Rev* (2016) 30:477–91. doi: 10.1016/j.blre.2016.06.003
10. Chaganti S, Illidge T, Barrington S, McKay P, Linton K, Cwynarski K, et al. Guidelines for the Management of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Br J Haematol* (2016) 174:43–56. doi: 10.1111/bjh.14136
11. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *J Clin Oncol* (2014) 32:3059–68. doi: 10.1200/JCO.2013.54.8800
12. El-Galaly TC, Villa D, Gormsen LC, Baech J, Lo A, Cheah CY. FDG-PET/CT in the Management of Lymphomas: Current Status and Future Directions. *J Intern Med* (2018) 284:358–76. doi: 10.1111/joim.12813
13. Voltin CA, Mettler J, Grosse J, Dietlein M, Baues C, Schmitz C, et al. FDG-PET Imaging for Hodgkin and Diffuse Large B-Cell Lymphoma—An Updated Overview. *Cancers (Basel)* (2020) 12:1–15. doi: 10.3390/cancers12030601
14. Gisselbrecht C, Van Den Neste E. How I Manage Patients With Relapsed/Refractory Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Br J Haematol* (2018) 182:633–43. doi: 10.1111/bjh.15412
15. Thieblemont C, Bernard S, Meignan M, Molina T. Optimizing Initial Therapy in DLBCL. *Best Pract Res Clin Haematol* (2018) 31:199–208. doi: 10.1016/j.beha.2018.08.001

ACKNOWLEDGMENTS

We particularly thank Kristóf Méhes (RapidMiner Ltd., Budapest, Hungary), Nelli Farkas (University of Pécs, Medical School, Institute of Bioanalysis, Pécs, Hungary), Béla Kajtár (University of Pécs, Medical School, Department of Pathology, Pécs, Hungary), and Krisztián Szigeti (Semmelweis University, Faculty of Medicine, Department of Biophysics and Radiation Biology, Budapest, Hungary) for their help in designing the study and evaluating the data, and for valuable suggestions.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.820136/full#supplementary-material>

16. Papp L, Spielvogel CP, Rausch I, Hacker M, Beyer T. Personalizing Medicine Through Hybrid Imaging and Medical Big Data Analysis. *Front Physics* (2018) 6:51. doi: 10.3389/fphy.2018.00051
17. Traverso A, Wee L, Dekker A, Gillies R. Repeatability and Reproducibility of Radiomic Features: A Systematic Review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2018) 102:1143–58. doi: 10.1016/j.ijrobp.2018.05.053
18. Zwanenburg A, Vallières M, Abdalah MA, Aerts HJWL, Andrearczyk V, Apte A, et al. The Image Biomarker Standardization Initiative: Standardized Quantitative Radiomics for High-Throughput Image-Based Phenotyping. *Radiology* (2020) 295:328–38. doi: 10.1148/radiol.2020191145
19. Ibrahim A, Vallières M, Woodruff H, Primakov S, Beheshti M, Keek S, et al. Radiomics Analysis for Clinical Decision Support in Nuclear Medicine. *Semin Nucl Med* (2019) 49:438–49. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2019.06.005
20. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the Molecular Classification of Diffuse Large B-Cell Lymphoma by Immunohistochemistry Using a Tissue Microarray. *Blood* (2004) 103:275–82. doi: 10.1182/blood-2003-05-1545
21. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et al. Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma. *J Clin Oncol* (2007) 25:579–86. doi: 10.1200/JCO.2006.09.2403
22. Eude F, Toledano MN, Vera P, Tilly H, Mihaiescu SD, Becker S. Reproducibility of Baseline Tumour Metabolic Volume Measurements in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Is There a Superior Method? *Metabolites* (2021) 11:1–16. doi: 10.3390/metabo11020072
23. Kinahan PE, Fletcher JW. Positron Emission Tomography-Computed Tomography Standardized Uptake Values in Clinical Practice and Assessing Response to Therapy. *Semin Ultrasound CT MR* (2010) 31:496–505. doi: 10.1053/j.sult.2010.10.001
24. Maurer MJ, Ghesquière H, Jais JP, Witzig TE, Haioun C, Thompson CA, et al. Event-Free Survival at 24 Months is a Robust End Point for Disease-Related Outcome in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Immunochemotherapy. *J Clin Oncol* (2014) 32:1066–73. doi: 10.1200/JCO.2013.51.5866
25. Papp L, Spielvogel CP, Grubmüller B, Grahovac M, Krajnc D, Ecsedi B, et al. Supervised Machine Learning Enables non-Invasive Lesion Characterization in Primary Prostate Cancer With [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 PET/MRI. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2021) 48:1795–805. doi: 10.1007/s00259-020-05140-y
26. Papp L, Pötsch N, Grahovac M, Schmidbauer V, Woehrer A, Preusser M, et al. Glioma Survival Prediction With Combined Analysis of *In Vivo*. *J Nucl Med* (2018) 59:892–9. doi: 10.2967/jnumed.117.202267
27. Perry AM, Diebold J, Nathwani BN, MacLennan KA, Müller-Hermelink HK, Bast M, et al. Non-Hodgkin Lymphoma in the Developing World: Review of 4539 Cases From the International Non-Hodgkin Lymphoma Classification Project. *Haematologica* (2016) 101:1244–50. doi: 10.3324/haematol.2016.148809

28. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct Types of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Identified by Gene Expression Profiling. *Nature* (2000) 403:503–11. doi: 10.1038/35000501
29. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* (2018) 378:1396–407. doi: 10.1056/NEJMoa1801445
30. Freeman CL, Savage KJ, Villa DR, Scott DW, Srouf L, Gerrie AS, et al. Long-Term Results of PET-Guided Radiation in Patients With Advanced-Stage Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With R-CHOP. *Blood* (2021) 137:929–38. doi: 10.1182/blood.2020005846
31. Dührsen U, Müller S, Hertenstein B, Thomssen H, Kotzerke J, Mesters R, et al. Positron Emission Tomography-Guided Therapy of Aggressive Non-Hodgkin Lymphomas (PETAL): A Multicenter, Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol* (2018) 36:2024–34. doi: 10.1200/JCO.2017.76.8093
32. Hüttmann A, Rekowski J, Müller SP, Hertenstein B, Franzius C, Mesters R, et al. Six Versus Eight Doses of Rituximab in Patients With Aggressive B Cell Lymphoma Receiving Six Cycles of CHOP: Results From the "Positron Emission Tomography-Guided Therapy of Aggressive Non-Hodgkin Lymphomas" (PETAL) Trial. *Ann Hematol* (2019) 98:897–907. doi: 10.1007/s00277-018-3578-0
33. Zucca E, Cascione L, Ruberto T, Facchinelli D, Schär S, Hayoz S, et al. Prognostic Models Integrating Quantitative Parameters From Baseline and Interim Positron Emission Computed Tomography in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Post-Hoc Analysis From the SAKK38/07 Clinical Trial. *Hematol Oncol* (2020) 38:715–25. doi: 10.1002/hon.2805
34. Barrington SF, Mikhael NG, Kostakoglu L, Meignan M, Hutchings M, Müller SP, et al. Role of Imaging in the Staging and Response Assessment of Lymphoma: Consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol* (2014) 32:3048–58. doi: 10.1200/JCO.2013.53.5229
35. Vercellino L, Cottreau AS, Casasnovas O, Tilly H, Feugier P, Chartier L, et al. High Total Metabolic Tumor Volume at Baseline Predicts Survival Independent of Response to Therapy. *Blood* (2020) 135:1396–405. doi: 10.1182/blood.2019003526
36. Kostakoglu L, Chauvie S. PET-Derived Quantitative Metrics for Response and Prognosis in Lymphoma. *PET Clin* (2019) 14:317–29. doi: 10.1016/j.cpet.2019.03.002
37. Prieto Prieto JC, Vallejo Casas JA, Hatzimichael E, Fotopoulos A, Kiortsis DN, Sioka C. The Contribution of Metabolic Parameters of FDG PET/CT Prior and During Therapy of Adult Patients With Lymphomas. *Ann Nucl Med* (2020) 34:707–17. doi: 10.1007/s12149-020-01521-3
38. Bailly C, Bodet-Milin C, Bourgeois M, Gouard S, Ansquer C, Barbaud M, et al. Exploring Tumor Heterogeneity Using PET Imaging: The Big Picture. *Cancers (Basel)* (2019) 11:1–17. doi: 10.3390/cancers11091282
39. Mayerhoefer ME, Umutlu L, Schöder H. Functional Imaging Using Radiomic Features in Assessment of Lymphoma. *Methods* (2021) 188:105–11. doi: 10.1016/j.jymeth.2020.06.020
40. Mayerhoefer ME, Materka A, Langs G, Häggström I, Szczypiński P, Gibbs P, et al. Introduction to Radiomics. *J Nucl Med* (2020) 61:488–95. doi: 10.2967/jnumed.118.222893
41. Aide N, Fruchart C, Nganoa C, Gac AC, Lasnon C. Baseline. *Eur Radiol* (2020) 30:4623–32. doi: 10.1007/s00330-020-06815-8
42. Zhou Y, Ma XL, Pu LT, Zhou RF, Ou XJ, Tian R. Prediction of Overall Survival and Progression-Free Survival by the. *Contrast Media Mol Imaging* (2019) 2019:5963607. doi: 10.1155/2019/5963607
43. Sun Y, Qiao X, Jiang C, Liu S, Zhou Z. Texture Analysis Improves the Value of Pretreatment. *Contrast Media Mol Imaging* (2020) 2020:2981585. doi: 10.1155/2020/2981585
44. Senjo H, Hirata K, Izumiyama K, Minauchi K, Tsukamoto E, Itoh K, et al. High Metabolic Heterogeneity on Baseline 18FDG-PET/CT Scan as a Poor Prognostic Factor for Newly Diagnosed Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood Adv* (2020) 4:2286–96. doi: 10.1182/bloodadvances.2020001816
45. Lovinfosse P, Polus M, Van Daele D, Martinive P, Daenen F, Hatt M, et al. FDG PET/CT Radiomics for Predicting the Outcome of Locally Advanced Rectal Cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2018) 45:365–75. doi: 10.1007/s00259-017-3855-5
46. Park S, Ha S, Lee SH, Paeng JC, Keam B, Kim TM, et al. Intratumoral Heterogeneity Characterized by Pretreatment PET in non-Small Cell Lung Cancer Patients Predicts Progression-Free Survival on EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor. *PLoS One* (2018) 13:e0189766. doi: 10.1371/journal.pone.0189766
47. Cook GJ, Yip C, Siddique M, Goh V, Chicklore S, Roy A, et al. Are Pretreatment 18F-FDG PET Tumor Textural Features in non-Small Cell Lung Cancer Associated With Response and Survival After Chemoradiotherapy? *J Nucl Med* (2013) 54:19–26. doi: 10.2967/jnumed.112.107375
48. Kostakoglu L, Chauvie S. Metabolic Tumor Volume Metrics in Lymphoma. *Semin Nucl Med* (2018) 48:50–66. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2017.09.005
49. Gallicchio R, Mansueto G, Simeon V, Nardelli A, Guariglia R, Capacchione D, et al. F-18 FDG PET/CT Quantization Parameters as Predictors of Outcome in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Eur J Haematol* (2014) 92:382–9. doi: 10.1111/ejh.12268
50. Cottreau AS, Lanic H, Mareschal S, Meignan M, Vera P, Tilly H, et al. Molecular Profile and FDG-PET/CT Total Metabolic Tumor Volume Improve Risk Classification at Diagnosis for Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Clin Cancer Res* (2016) 22:3801–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2825
51. Adams HJ, de Klerk JM, Fijnheer R, Heggelman BG, Dubois SV, Nievelstein RA, et al. Prognostic Superiority of the National Comprehensive Cancer Network International Prognostic Index Over Pretreatment Whole-Body Volumetric-Metabolic FDG-PET/CT Metrics in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Eur J Haematol* (2015) 94:532–9. doi: 10.1111/ejh.12467
52. Cottreau AS, Nioche C, Dirand AS, Clerc J, Morschhauser F, Casasnovas O, et al. F-FDG PET Dissemination Features in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Are Predictive of Outcome. *J Nucl Med* (2020) 61:40–5. doi: 10.2967/jnumed.119.229450
53. Toyama Y, Hotta M, Motoi F, Takanami K, Minamimoto R, Takase K. Prognostic Value of FDG-PET Radiomics With Machine Learning in Pancreatic Cancer. *Sci Rep* (2020) 10:17024. doi: 10.1038/s41598-020-73237-3
54. Ahn HK, Lee H, Kim SG, Hyun SH. Pre-Treatment. *Clin Radiol* (2019) 74:467–73. doi: 10.1016/j.crad.2019.02.008
55. Zhong J, Frood R, Brown P, Nelstrop H, Prestwich R, McDermott G, et al. Machine Learning-Based FDG PET-CT Radiomics for Outcome Prediction in Larynx and Hypopharynx Squamous Cell Carcinoma. *Clin Radiol* (2021) 76:78.e9–e17. doi: 10.1016/j.crad.2020.08.030
56. Krajnc D, Papp L, Nakuz TS, Magometschnigg HF, Grahovac M, Spielvogel CP, et al. Breast Tumor Characterization Using [18F]FDG-PET/CT Imaging Combined With Data Preprocessing and Radiomics. *Cancers (Basel)* (2021) 13:1–18. doi: 10.3390/cancers13061249

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Ritter, Papp, Zámbo, Tóth, Dezső, Veres, Máthé, Budán, Karádi, Balikó, Pajor, Szomor, Schmidt and Alizadeh. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.