



الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
كلية الطب البشري
قسم الطب المخبري

دراسة مستويات الدنا الحر الجوال البلازمي cfDNA عند عينة من
السوريين المصابين بلمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة: مقارنتها
بالأصحاء وتبدلاتها عند التقييم المرحلي للعلاج

رسالة مُقدّمة لنيل درجة الدكتوراه في الكيمياء الحيوية الطبية والبيولوجيا الجزيئية

إعداد الطالبة: ريم أبازيد

إجازة في الطب البشري؛ دراسات عليا في الطب المخبري

المشرف المشارك

د. سهام سليمان

أستاذ في طب الأورام

كلية الطب - جامعة دمشق

المشرف

د. يوسف بركات

أستاذ مساعد في الكيمياء الحيوية الطبية

كلية الطب - جامعة دمشق

قرار لجنة الحكم

شكر وتقدير

إهداء

فهرس المحتويات

x	قائمة المُختصرات
xiv	قائمة الجداول
xvi	قائمة الأشكال
2-1	الملخص
93-3	أولاً: الدراسة النظرية
4	الفصل (1) أورام الدم والأنسجة اللمفاوية: الوبائيات والتصنيف
4	1. 1 مقدمة: وبائيات السرطان
4	1. 1. 1 في العالم
6	1. 1. 2 في سورية
7	2. 1 تصنيف منظمة الصحة العالمية (2023) لأورام الدم والأنسجة اللمفاوية
8	3. 1 لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة في تصنيف منظمة الصحة العالمية 2023
12	الفصل (2) لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة
12	2. 1 مقدمة
13	2. 2 السببيات وعوامل الاختطار
14	2. 3 علم الأمراض والبيولوجيا والتصنيف
14	2. 3. 1 الآلية المرضية
16	2. 3. 2 البيولوجيا (الجزئية) والتصنيف
16	2. 3. 2 (أ) التصنيف وفق الخلية المنشأ
18	2. 3. 2 (ب) الخصائص الجزئية
19	2. 3. 2 (ج) الأنماط الفرعية المورثية
20	2. 4 المظهر السريري
21	2. 5 التشخيص
21	2. 5. 1 الدراسة المبدئية
23	2. 5. 2 التشخيص المناعي والتميط المناعي
24	2. 5. 3 التشخيص التفريقي
25	2. 6 تحديد مرحلة الورم
26	2. 7 تحديد الإنذار
26	2. 7. 1 المؤشر الإنذاري العالمي وتعديلاته
29	2. 7. 2 مكوّنات (مُحدّدات) المؤشر الإنذاري العالمي وتعديلاته خطأ! الإشارة المرجعية

	غير معرّفة.
29	2. 7. 2. (أ) تقييم حالة الأداء
29	2. 7. 2. (ب) المستويات المصلية لنانزة هيدروجين اللاكتات
30	2. 7. 2. (ج) المستويات المصلية للغلوبولين المكروي بيتا2
31	2. 8. المعالجة
34	2. 9 تقييم الاستجابة العلاجية
34	2. 10 المتابعة
35	الفصل (3) تقييم استجابة لمفوما الخلية البائية الكبيرة للعلاج ومتابعتها
36	3. 1 نماذج الاستجابة العلاجية
36	3. 1. 1 الترقّي الكاذب
39	3. 1. 2 فرط الترقّي
40	3. 1. 3 تعزيز أثر التشعيع البعيد على الأنسجة البعيدة عن مرمى الأشعة
41	3. 1. 4 التأثيرات الضائرة المرتبطة بالعلاج المناعي
42	3. 2 المعايير الشعاعية لاستجابة اللمفومات للعلاج خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
42	3. 2. 1 الخلفية ومعايير الاستجابة العلاجية التقليدية
43	3. 2. 2 تاريخ معايير الاستجابة العلاجية في اللمفومات
45	3. 2. 3 المعايير المستخدمة في تقييم استجابة نهاية العلاج في اللمفومات
	3. 2. 4 التقييم المرحلي للاستجابة العلاجية في اللمفومات خطأ! الإشارة المرجعية غير معرّفة.
48	3. 3 المتابعة والترصد في اللمفومات
50	3. 3. 1 دور التصوير في متابعة اللمفومات وترصدها
50	3. 3. 2 إيجابيات وسلبيات التصوير في متابعة اللمفومات وترصدها
54	الفصل (4) ملخص تدبير DLBCL وإيجابيات التصوير وسلبياته
54	4. 1 ملخص الممارسات السريرية والتوصيات
55	4. 2 إيجابيات وسلبيات التصوير الشعاعي في تدبير اللمفومات
55	4. 2. 1 التصوير المقطعي المحوسب
57	4. 2. 2 التصوير المقطعي بالإصدار البوزيتروني: النظام الأحادي والهجين
64	الفصل (5) الدنا الحر الجوال البلازمي
64	5. 1 مقدمة: تعريف وتأريخ وأهمية
65	5. 2 خصائص الدنا الحر البلازمي ومصادره المفترضة
69	5. 2. 1 أشكال الدنا الحر في الدوران
70	5. 2. 2 الاستماتة الخلوية
72	5. 2. 3 النخر الخلوي

73	5. 2. 4 آليات أخرى لإطلاق الدنا الحر
76	5. 3 الأدوار البيولوجية المحتملة للدنا الحر خارج الخلوي
79	الفصل (6) الدنا الحر البلازمي كواصم جزيئي لتدبير السرطانات
79	6. 1 مقدمة
80	6. 2 من الخزعة النسيجية إلى اختبارات الدنا الحر والخزعة السائلة
85	الفصل (7) الدنا الحر البلازمي في لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة
85	7. 1 مقدمة: مبررات التوجه نحو cfDNA
86	7. 2 دور الدنا الحر البلازمي كواصم حيوي في تدبير لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة
86	7. 2. 1 دور الدنا الحر البلازمي كواصم حيوي للكشف المبكر والتشخيص
86	7. 2. 2 دور الدنا الحر البلازمي كواصم حيوي لتحديد مرحلة الورم والإنذار وتصنيف
88	الاختطار
88	7. 2. 3 دور الدنا الحر البلازمي كواصم حيوي لكشف الاستجابة العلاجية و/أو متابعة
91	المرض
92	7. 2. 4 دور الدنا الحر البلازمي المحتمل في مراقبة المرض المتبقي الأدنى
133-94	ثانياً: الدراسة العملية
95	الفصل (8) المشكلة البحثية للدراسة
96	الفصل (9) مبررات الدراسة وأهدافها
96	9. 1 مبررات الدراسة
96	9. 2 أهداف الدراسة
98	الفصل (10) طرائق الدراسة
98	10. 1 تصميم الدراسة وزمانها
98	10. 2 إجازة الدراسة ومكان إجرائها
98	10. 3 حجم العينة ومجموعات الدراسة
100	10. 4 معايير الاستبعاد
100	10. 5 جمع المعطيات وقياس المتغيرات
101	10. 5. 1 معطيات التشخيص وتحديد مرحلة الورم وإنذاره
102	10. 5. 2 اعتيان الدم
103	10. 5. 3 القياسات المخبرية الكيميائية
103	طريقة معايرة حمض البول
103	طريقة معايرة الكرياتينين
104	طريقة معايرة نازعة هيدروجين اللاكتات وحساب نسبتها
104	10. 5. 4 استخلاص الدنا الحر البلازمي ومعايرته

104	أولاً: تحضير البلازما
105	ثانياً: استخلاص الدنا الحر البلازمي
107	ثالثاً: قياس تركيز الدنا الحر ونقاوته بمقياس الطيف الضوئي (النانو دروب)
109	رابعاً: قياس تركيز الدنا الحر بالتفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي qPCR بالزمن الفعلي
109	أ) مبدأ بروتوكول qPCR بالزمن الفعلي
110	ب) الأجهزة والكواشف ومكوناتها وتحضيرها
112	ج) الإجراء العملي
114	10. 6 التحليل الإحصائي
115	الفصل (11) نتائج الدراسة
115	11. 1 الاعتيان والمشاركون
115	11. 2 كشف القيم الناشئة في معطيات نتائج qPCR والنانودروب ودراسة توزيعها خطأ! الإشارة
115	المرجعية غير معروفة.
116	11. 3 عرض إجمالي النتائج
119	11. 4 مقارنة المعطيات بين المجموعتين وحسب الجنس
119	11. 4. 1 الجنس والعمر
119	11. 4. 2 حمض البول والكرياتينين
120	11. 4. 3 نازعة هيدروجين اللاكتات ونسبتها
120	11. 4. 4 الدنا الحر البلازمي المُقاس بتقانة التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي و المُقاس بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانو دروب
122	11. 5 مقارنة المعطيات المخبرية عند المرضى وقت التشخيص وفق الخصائص السريرية
123	11. 6 عرض ارتباطات الدنا الحر البلازمي المُقاس بتقانة qPCR مع باقي المتغيرات
125	11. 7 مقارنة المعطيات في مجموعة المرضى بين التشخيص والمتابعة
126	11. 8 عرض نتائج cfDNA البلازمي المُقاس بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانو دروب وارتباطاتها
126	11. 8. 1 قيم cfDNA البلازمي المُقاس بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانو دروب عند خط الأساس خطأ! الإشارة المرجعية غير معروفة.
128	11. 8. 2 مقارنة قيم cfDNA البلازمي المُقاس بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانو دروب بين خط الأساس ووقت المتابعة
129	11. 8. 3 مقارنة قيم cfDNA البلازمي بين المقاسة بتقانة التفاعل البوليميرازي السلسلي و بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانو دروب
131	11. 9 نتائج التحوف اللوجستي الثنائي
132	11. 10 اختبار منحنى خاصية تشغيل المستقبل

134	الفصل (12) مناقشة النتائج خطأ! الإشارة المرجعية غير معروفة.
145-143	ثالثاً: الاستنتاجات والتوصيات
144	الفصل (13) الاستنتاجات
145	الفصل (14) المقترحات والتوصيات
146	المراجع
165	الملاحق
165	الملحق (1): مصادر وآليات إطلاق cfDNA في الدوران
171	الملحق (2): الموافقة المستتيرة
173	الملحق (3): استبانة المرضى
174	الملحق (4): الملصق Poster
175	الملخص الأجنبي
177	العنوان الأجنبي

قائمة المُختصرات

العربي	الأجنبي	المختصر
النمط الشبيه بالخلية البائية المُفعَّلة	activated B cell	ABC
ابيضاض حاد مع خط خلوي ملتبس	Acute leukemia of Ambiguous Lineage	ALAL
لمفوما الخلية الكبيرة الكَشَمِيَّة (اللامتمايزة)	anaplastic large-cell lymphoma	ALCL
كيناز اللمفوما الكَشَمِيَّة (اللامتمايزة)	anaplastic lymphoma kinase	ALK
ابيضاض نقوي حاد	Acute Myeloid Leukemia	AML
زرع الخلايا الجذعية الذاتية	autologous stem cell transplantation	ASCT
المساحة تحت المنحنى	Area Under the Curve	AUC
الغلوبولين الميكروي بيتا2	β 2-Microglobulin	B2MIC
قاتل مناهض Bcl-2	Bcl-2 antagonist killer 1	BAK
وكالة كولومبيا البريطانية للسرطان	British Columbia Cancer agency	BCCA
مورثة (بروتين) لمفوما الخلية البائية2	B-cell lymphoma gene (protein) 2	BCL2
مُرتَبة مورثة لمفوما الخلية البائية2	BCL2 –rearrangement	BCL2-R
مورثة (بروتين) لمفوما الخلية البائية6	B-cell lymphoma gene (protein) 6	BCL6
مُرتَبة مورثلمفوما الخلية البائية6	BCL6- rearrangement	BCL6-R
زوج أساس	base pairs	Bp
ورم الخلايا التغصنية البلازماوية الأرومية	Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm	BPDCN
الدناز المفعّل بالكاسباز	caspase-activated DNase	CAD
مستقبل المستضد الخيمري (المأشوب)	Chimeric antigen receptor (recombinant)	CAR
التعداد الدموي الكامل	Complete blood count	CBC
عنقود تمايز أو كتلة تمايز	Cluster of Differentiation (CD) antigen	CD antigen
التصوير المقطعي المحوسب الظليل	Contrast-enhanced computed tomography	CECT
الدنا الحر خارج الخلوي (الجوال)	(circulating) cell-free DNA	cfDNA
استجابة استقلابية تامة	Complete Metabolic Response	CMR
خلية المنشأ	cell of origin	COO
السائل الدماغي الشوكي	Cerebrospinal fluid	CSF
التصوير المقطعي المُحَوَسَّب	computed tomography	CT
دورة العتبة	threshold cycle	C_T
الخلايا السرطانية الجواله	circulating tumor cells	CTCs
الدنا الورمي الجوال	circulating tumor DNA	ctDNA
البروتين الرابع المصاحب للخلايا اللمفاوية التائية السامة للخلايا	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4	CTLA4

العربي	الأجنبي	المختصر
السيتوكرومات C	Cytochromes C	CYCS
نظام مضبوط الجرعة مكون من الريتوكسيماب والإيتوبوسايد والبريدنيزولون والفينكريستين والسيكلوفسفاميد والدوكسوروبيسين	dose adjusted rituximab, etoposide, prednisolone, vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin	DA-EPOCH-R
ثنائي كلور سلفونات الفينول	Dichlorophenolsulfonate	DCFS
لمفوما التعبير المزدوج	double expresser lymphoma	DEL
لمفوما التعبير المزدوج	double expresser lymphoma	DEL
لمفوما الخلية للمقاوية البائية المنتشرة	diffuse large b-cell lymphoma	DLBCL
حرز دوفيل	Deauville score	DS
فيروس إبشتاين بار	Epstein-Barr virus	EBV
مجموعة علم الأورامالتعاونية الشرقية	Eastern Cooperative Oncology Group	ECOG
مجموعة علم الأورام التعاونية الشرقية	Eastern Cooperative Oncology Group	ECOG
معدل البقاء الخالية من الأحداث	event-free survival	EFS
نهاية العلاج	End-of treatment	EoT
الجمعية الأوروبية لعلم الأورام الطبي	European Society For Medical Oncology	ESMO
الغلوكوز منقوص الأكسجين الموسوم بالفلوريد المشع 18	18F-fluorodeoxyglucose	FDG
التصوير المقطعي المحسوب CT مع التصوير المقطعي للإصدار البوزيتروني PET للأشعة غاما التي يصدرها الغلوكوز منقوص الأكسجين الموسوم بالفلوريد المشع	Flourine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography	FDG PET-CT
تقانة التهجين المتألق في الموضع	fluorescence in situ hybridization	FISH
اللمفوما الجريبة	Follicular lymphoma	FL
خزعة الإبرة الدقيقة	Fine needle Aspiration	FNA
نمط خلايا المركز المنتش البائية	germinal center B cell	GCB
تتميط التعبير الجيني	Gene expression profiling	GEP
فيروس التهاب الكبد "ب"	Hepatitis B virus	HBV
فيروس التهاب الكبد سي	hepatitis C virus	HCV
المعالجة بجرعة عالية متبوعة بجرعة إنقاذ بالخلايا الجذعية الذاتية	High-Dose Therapy followed by Autologous Stem Cell Rescue	HDT/ASCR
فيروس العوز المناعي البشري	human immunodeficiency virus	HIV
اللمفوما الهودجكينية	Hodgkin lymphoma	HL
شبكة بحوث الخباثات الدموية	Hematological Malignancy Research Network	HMRN
الوكالة الدولية لبحوث السرطان	The International Agency for Research on Cancer	IARC
مثبطة الدناز المفعّل بالكاسباز	caspase-activated DNase inhibitor	ICAD
الكيميائية النسيجية المناعية	Immunohistochemical	IHC

المختصر	الأجنبي	العربي
ICANS	Immune Effector Cell Associated Neurotoxicity Syndrome	متلازمة السمية العصبية المرتبطة بالخلايا المستفحلة المناعية
IPI	international prognostic index	المؤشر الإنذاري العالمي
IPI-NCCN	National Comprehensive Cancer Network International Prognostic Index	المؤشر الإنذاري العالمي للشبكة الوطنية الشاملة للسرطان
IR	indeterminate response	استجابة غير محددة
IRF4	Interferon regulatory factor 4	العامل الرابع المنظم للإنترفيرونات
irRC	Immune-specific related response criteria	معايير الاستجابة المرتبطة نوعياً بالمناعة
JAK-STAT	Janus kinase–signal transducer and activator of transcription	كيناز جانوس – مُنَبِّغ الإشعار ومُنَشِّط الانتساخ
K3EDTA	tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid	ثلاثي بوتاسيوم رباعي حمض خل الإيثيلين ثنائي الأمين
LC	Langerhans cell	خلية لانغرهانس
LDH	lactate dehydrogenase	نازعة هيدروجين اللاكتات
LYRIC	Lymphoma Response to Immunomodulatory therapy Criteria	معايير استجابة اللمفوما للعلاج بالمعدلات المناعية
M	Mean	متوسط
MDN	Myelodysplastic Syndrome	ورم خلل التنسج النقوي
MIP	Maximum Intensity Projection	إسقاط الكثافة القصوى
miRNA	MicroRNA	الرنا الدقيق
MPN	Myeloproliferative neoplasm	ورم تكاثري نقوي
MRD	minimal residual disease	المرض المتبقي الأدنى
MRI	Magnetic resonance imaging	التصوير بالرنين المغناطيسي
mtDNA	mitochondrial DNA	الدنا المتقدري
MUM1	multiple myeloma oncogene 1	المورثة الورمية الأولى للورم النقوي العديد
MVBs	multivesicular bodies	الأجسام متعددة الحويصلات
MYC	Myelocytomatosis	مورثة (بروتين) الورم النقوي
MZL	Marginal zone lymphoma	لمفوما المناطق الهامشية
NA	Not applicable	غير قابل للتطبيق
NCCN	National Comprehensive Cancer Network	الشبكة الوطنية الشاملة للسرطان
NCDs	Noncommunicable diseases	الأمراض غير السارية
NCI	National Cancer Institute	المعهد الوطني للسرطان
NFκB	nuclear factor kappa B	العامل النووي كابا- ب
NHL	Non-Hodgkin lymphoma	اللمفوما اللاهودجكينية
NOS	not otherwise specified	غير المميز (ة) بطريقة أخرى
OR	odd ratio	نسبة الأرجحية

المختصر	الأجنبي	العربي
OS	Overall Survival	النُّقيا الإجمالية
PET	positron emission tomography scan	المسح المقطعي للانبعاث البوزيتروني
PFS	Progression Free Survival	النُّقيا دون ترقى المرض
PS	performance status	حالة الأداء
qPCR	quantitative polymerase chain reaction	التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي
RECIL	response evaluation criteria in lymphoma	معايير تقييم الاستجابة في اللمفوما
RECIST	Response evaluation criteria in solid tumors	معايير تقييم الاستجابة في الأورام الصلبة
ROC	receiver operating characteristic	خاصية تشغيل المستقبل
SCC	Squamous cell carcinoma	سرطانة الخلايا الحرشفية
SD	standard deviation	انحراف معياري
SYBR	Synergy Brands	شركة ساير
TFH	T follicular helper cell	خلية مساعدة جريبية تائية
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha	العامل المنخر للورم ألفا
UC	Unclassified	غير مُصنفة
WHO	World Health Organization	منظمة الصحة العالمية
WHO-HAEM5	The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours	الطبعة الخامسة من تصنيف منظمة الصحة العالمية للأورام الدموية للمفاوية

قائمة الجداول

الرقم	العنوان	الصفحة
1	لمفومات الخلية البائية الكبيرة	13
2	نظرة عامة على أنماط DLBCL الفرعية المورثية	19
3	الفحوص المخبرية في حالة الاشتباه باللمفوما	22
4	نظام تحديد مرحلة الورم المنقح للمفومات العقدية الأولية	25
5	المؤشر الإنذاري العالمي الأصلي وتعديلاته	27
6	المناسب السريرية للتنبؤ بحصائل مرضى لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة	28
7	حالة الشراهة للغلوكوز المفلور منقوص الأكسجين (FDG) ودرجتها في بعض أنماط اللمفوما	44
8	نظام حرز دوفيل ذو النقاط الخمس لمعايير استجابة الورم	46
9	معايير لوغانو لتصنيف استجابة الأورام	46
10	عرض الخصائص السريرية لمرضى DLBCL المشاركين في الدراسة	117
11	مقارنة متوسطات المتثابرات المدروسة بين مجموعتي الدراسة عند التشخيص (خط الأساس)	117
12	مقارنة متوسطات المتثابرات المدروسة وفق الجنس ضمن كل من مجموعتي الدراسة عند التشخيص (خط الأساس) واعتداد الفرق بينها (P) وفق الاختبار t (t-test)	118
13	مقارنة قيم متوسطات المتثابرات المدروسة عند التشخيص (خط الأساس) وتقييم المعالجة (بعد ثلاثة أشواط من المعالجة الكيميائية) في مجموعة مرضى DLBCL الذين تمت متابعتهم (41 مريضاً)	118
14	مقارنة متوسطات قيم الاختبارات الكيميائية بين مجموعتي الدراسة عند التشخيص (خط الأساس)	119
15	مقارنة متوسطات قيم LDH ونسبتها بين مجموعتي الدراسة عند التشخيص (خط الأساس)	120
16	مقارنة متوسطات قيم الدنا الحر cfDNA البلازمي (نغ/دنا/مكل)، المُقاس بتقانة التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي و المُقاس بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب، بين مجموعتي الدراسة عند التشخيص (خط الأساس)	121
17	مقارنة المعطيات المخبرية وفق خصائص الورم في مجموعة مرضى DLBCL عند التشخيص (خط الأساس)	122
18	قيم معامل ارتباط بيرسون (r) والاعتداد الإحصائي لارتباط cfDNA المُقاس بتقانة qPCR ونسبة LDH مع المتثابرات المدروسة الأخرى في المجموعة الأولى (الشواهد) والثانية (مجموعة مرضى DLBCL) والثالثة (مجموع المشاركين في الدراسة) عند خط الأساس	123
19	قيم cfDNA وقت التقييم والنسب المئوية لتبدلات المتثابرات المهمة في مراقبة الاستجابة العلاجية وقت تقييم مرضى (41 DLBCL مريضاً) مقارنة بخط الأساس (عند التشخيص)	126
20	قيم معامل ارتباط بيرسون (r) والاعتداد الإحصائي لارتباط cfDNA المُقاس بتقانة qPCR و المُقاس بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب Nanodrop (نغ/مكل) مع المتثابرات الرئيسة المدروسة الأخرى في المجموعة الأولى (الشواهد) والثانية (مجموعة مرضى DLBCL) والثالثة (مجموع المشاركين في الدراسة) عند خط الأساس.	127

الرقم	العنوان	الصفحة
21	مقارنة قيم cfDNA المقاس بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب وفق خصائص الورم في مجموعة مرضى DLBCL عند التشخيص (خط الأساس).	127
22	قيم cfDNA بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب وقت التقييم والنسب المئوية لتبدلات المتغيرات المهمة في مراقبة الاستجابة العلاجية وقت تقييم مرضى DLBCL (41 مريضاً) مقارنة بخط الأساس (عند التشخيص).	128
23	مقارنة بين طريقتي قياس الدنا الحر cfDNA البلازمي في المجموعات المدروسة.	129
24	نتائج التحوف اللوجستي الثنائي باستخدام احتمالية الإصابة بـ DLBCL كمتغير تابع (غير مستقل) وعوامل التنبؤ المحتملة كمتغيرات مستقلة لدى المشاركين في الدراسة.	131
25	القدرة التنبؤية بـ DLBCL لكل من LDH و cfDNA بتقانة qPCR وبمقياس الطيف الضوئي النانودروب.	133

قائمة الأشكال

الرقم	العنوان	صفحة
1	مخطط نسب أهم أنواع السرطانات في العالم	5
2	(أ) أهم أسباب الوفيات في سورية؛ (ب) أنواع الأمراض غير السارية المسببة لنحو 75% من الوفيات في سوريا. تأتي السرطانات في المرتبة الثانية.	6
3	(أ) معدلات وقوع أنواع السرطانات في سورية؛ (ب) أنواع السرطانات المسببة للوفيات في سوريا	7
4	بنية التصنيف الهرمي وترتيب المحتويات استناداً إلى الخط الخلوي في الإصدار الخامس من تصنيف منظمة الصحة العالمية للأورام الدموية والمفاوية.	9
5	مُراتبة مورثات السلسلة الثقيلة والسلسلة الخفيفة للغلوبولين المناعي	15
6	تداخل أنماط DLBCL وفق تصنيف خلية المنشأ والخصائص الجزيئية	17
7	مخطط طبوغرافي لأنماط DLBCL الفرعية الجزيئية يمثل تمثيلاً مفاهيمياً للتصنيف المورثي لها	20
8	عرض توضيحي رسومي لنماذج الاستجابة المختلفة بعد إعطاء المعالجة المناعية لمرضى اللمفومات	36
9	صور متسلسلة لإسقاط الكثافة القصوى MIP من تصوير FDG PET-CT عند مريض لمفوما هودجكن توضح نموذج ترقي المرض الكاذب خلال التقييم المرحلي بعد شوطين علاجيين	37
10	مخطط يوضح الفرق بين الترقي الكاذب وفرط الترقي	38
11	صور متسلسلة لإسقاط الكثافة القصوى MIP من تصوير FDG PET-CT عند مريض لمفوما هودجكن توضح نموذج فرط الترقي	39
12	عرض توضيحي لآلية التأثير البعيد المقترحة	40
13	أمثلة سريرية لتأثيرات ضائرة مرتبطة بالعلاج المناعي لوحظت في أثناء تصوير FDG PET-CT في مرضى اللمفومات	41
14	صور ¹⁸ FDG-PET لمرضى DLBCL	45
15	مبدأ تقانة FDG-PET	57
16	بنية الصبغي على مستويات مختلفة مع ملاحظة علاقة بنية الجسيم النووي بطول الدنا الحر	65
17	مناشئ cfDNA المحتملة المتنوعة عند البشر	66
18	مناشئ cfDNA المفترضة في جسم الإنسان	68
19	أشكال cfDNA المختلفة في الجهاز الدوراني للإنسان	69
20	سبل إشعار الاستماتة الخلوية	70
21	مصير الخلية المستميتة	72
22	مصير الخلية المتخثرة	72
23	أنواع الحويصلات خارج الخلية المختلفة في جسم الإنسان	75
24	دورة حياة cfDNA الجوال، وتتضمن إطلاقه وأدواره وتصفيته. يلخص الشكل الآليات الموصوفة جيداً لكل مرحلة	78

الرقم	العنوان	صفحة
25	مقارنة الخزعة النسيجية التقليدية مع الخزعة السائلة	83
26	حساب حجم العينة استناداً موقع برمجيات OpenEpi	99
27	مراحل استخلاص الدنا الحر في الأعمدة المغزلية الدقيقة	105
28	دور صبغة التآلق (أخضر ساير) في PCR الكمي	109
29	أطوار التآلق الأربعة في PCR الكمي	110
30	المنحنى المعياري المستخدم لحساب كمية نواتج PCR من التآلق	110
31	النواشز في معطيات نتائج qPCR	115
32	غياب النواشز في معطيات نتائج النانودروب	116
33	مقارنة متوسطات قيم نازعة هيدروجين اللاكتات LDH (وحدة دولية/ل) ونسبتها LDH Ratio بين مجموعة الشواهد control ومجموعة مرضى لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة DLBCL عند التشخيص (خط الأساس)	120
34	مقارنة متوسطات قيم الدنا الحر cfDNA البلازمي (نغ/مكل)، المُقاس بتقانة التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي qPCR و بمقياس الطيف الضوئي النانودروب، بين مجموعة الشواهد control ومجموعة مرضى لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة عند التشخيص (خط الأساس)	121
35	مخططا التششت اللذان يظهران ارتباط cfDNA المُقاس بتقانة qPCR الإيجابي مع LDH ونسبة LDH في مجموعة الشواهد	123
36	مخططات التششت التي تظهر الارتباطات الإيجابية بين cfDNA المُقاس بتقانة qPCR وكل من حجم أكبر كتلة ورمية (أ) و LDH (ب) ونسبة LDH (ج) في مجموعة المرضى. كما يظهر في الشكل ارتباط cfDNA الإيجابي مع كل من LDH (د) ونسبة LDH (هـ) عند مجموع المشاركين	124
37	مقارنة متوسط قيم كل من حجم كتلة الورم الكبرى (أ) و cfDNA (ب) بين خط الأساس Basal (عند التشخيص) والمتابعة follow-up (قبل بدء الشوط الرابع من المعالجة الكيميائية) عند 41 مريضاً تمت متابعتهم	125
38	مقارنة متوسط قيم cfDNA المُقاس بمقياس الطيف الضوئي النانودروب عند التشخيص بين مجموعة الشواهد control والمرضى DLBCL	126
39	مقارنة متوسط قيم cfDNA المُقاس بمقياس الطيف الضوئي النانودروب بين وقت التشخيص Basal والمتابعة Follow-up في مجموعة مرضى DLBCL	128
40	مقارنة متوسط قيم cfDNA المُقاسة بتقانة qPCR و بمقياس الطيف الضوئي (جهاز النانودروب) في مجموعة الشواهد control والمرضى DLBCL	129
41	مقارنة متوسط قيم cfDNA المُقاسة بتقانة qPCR وجهاز النانودروب في عينات الدراسة كلها	129
42	مخطط تششت يظهر الارتباط الإيجابي بين قيم cfDNA المُقاسة بتقانة التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي qPCR والنانودروب بجهاز NanoVue في 133 عينة.	130
43	تحليل بلاند-ألتمان للمقارنة بين تقديرات cfDNA المُقاسة بتقانة qPCR والنانودروب في عينات الدراسة كلها.	130
44	منحنى خاصية تشغيل المستقبل ROC والمساحة تحت المنحنى AUC والاعتداد الإحصائي "P" لعوامل التنبؤ المحتملة بحدوث DLBCL.	132

الملخص

الخلفية: لمفوما الخلية المفاوية البائية الكبيرة المنتشرة (DLBCL) Diffuse large B-cell lymphoma واحدة من أكثر أشكال اللمفومات شيوعاً التي تفرض عبئاً اقتصادياً واجتماعياً كبيراً على المرضى والمحيطين بهم والمجتمع والدولة. وطريق تدبير هذه الأورام طويلة ومُرهِقَةٌ ومُكَلِّفَةٌ، وتتضمن الكثير من الطرائق (النسجية والمخبرية والشعاعية والجراحية) التي تستهدف التحري والتشخيص وتحديد المرحلة والإنذار والمعالجة وتقييم الاستجابة للمعالجة وكشف النكس. ومن هذه الطرائق استخدام الخزعات النسيجية (الاستئصالية الجراحية أو بالإبرة) والتصوير المقطعي المُحَوَّسَب (CT) Computed tomography والمسح المقطعي للانبعاث البوزيتروني Positron emission tomography (PET) scan؛ وهي طرائق باضعة، وباهظة الثمن أحياناً، وتعرّض الجسم أحياناً لجرعات عالية من الإشعاع، وقد لا تتوافر في الأوضاع الصحية محدودة الموارد. فضلاً عن ذلك، فرغم الحساسية العالية لتقانة PET، إلا أنها تفتقر إلى النوعية للأورام، وتعطي الكثير من حالات السلبية أو الإيجابية الكاذبة، مما قد يتسبب أحياناً في تطبيق إجراءات علاجية كيميائية وباضعة غير ضرورية ومكلفة. أدى ذلك كله إلى البحث عن اختبارات أكثر يسراً، ومنها قياس كمية الدنا الحر الموجود في سوائل الجسم كبلازما الدم [قياس الدنا الحر خارج الخلوي (الجوال) (circulating) cell-free DNA (cfDNA) البلازمي].

الهدف: مقارنة مستويات cfDNA بين مجموعة من الأسوياء ظاهرياً ومجموعة من مرضى DLBCL السوريين، ودراسة علاقة هذه المستويات عند المرضى مع مرحلة الورم ومُحدّدات إنذاره، ومتابعة تبدلات هذه المستويات مع تطبيق المعالجة؛ ودراسة علاقة هذه التبدلات مع تبدلات الإجراءات التصويرية الشعاعية (CT أو PET) في حال وجودها. والغاية من ذلك كلّها هي استكشاف مدى مساهمة معايرة cfDNA الكمية في مراحل استقصاءات DLBCL المختلفة، كطريقة روتينية غير باضعة وغير مكلفة، بديلة أو متممة للإجراءات المعتمدة حالياً.

الطرائق: شملت الدراسة 92 شخصاً سورياً: 28 من الأسوياء ظاهرياً (الشواهد)، و64 مريضاً تم تشخيص DLBCL لديهم حديثاً. تم الحصول على المعطيات الأنثروبومترية (العمر والجنس وحالة الأداء) والشعاعية (عدد العقد وتوزعها وحجم أكبر كتلة) والتشخيص النسيجي (الخزعة التشخيصية). ومن ثم تم إجراء المعايير المخبرية (الكرياتينين وحمض البول والواصم الورمي نازعة هيدروجين اللاكتات LDH lactate dehydrogenase)، ومن ثم

حساب نسبة LDH. كما تمت معايرة cfDNA في بلازما المرضى والأصحاء بطريقتين هما مقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب وتقانة التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي quantitative polymerase chain reaction (qPCR) بالزمن الفعلي باستخدام صبغة السيانين الخضراء SYBR Green. فضلاً عن ذلك تمت إعادة الاختبارات السابقة عند المرضى فقط (41 مريضاً) وقت المتابعة الروتيني (بعد ثلاثة أشواط من المعالجة الكيميائية). ومن ثم تم إجراء التحليل الإحصائي باستخدام الإصدار 22 من برمجيات SPSS مع اعتماد قيمة P الأقل من 0.05 للاعتداد الإحصائي.

النتائج: (1) عند التشخيص: ترافقت DLBCL مع ارتفاع مستويات cfDNA مقارنة بالأسوياء، وكان الارتفاع معتدلاً به إحصائياً مع طريقتي القياس (النانودروب أو qPCR) اللتين جاءت نتائجهما متناسبة بشكل معتد به إحصائياً أيضاً. كما كان هذا الارتفاع (بطريقتي القياس) متناسباً طردياً وبشكل معتد به إحصائياً مع كل من حجم أكبر كتلة للورم عند التشخيص وLDH ونسبتها. بالمقابل، لم تتباين قيم cfDNA بشكل معتد به إحصائياً مع تغير حالة الأداء [وفق مقياس زوبرود (ECOG)] أو مرحلة الورم (وفق تصنيف آن بور أو تصنيف لوغانو) أو الإنذار (وفق أحرار IPI-NCCN) أو وجود المرض الكتلي (العقد اللمفاوية بقطر 7.5 سم أو أكبر) أو حسب الجنس والعمر. **(2) وقت المراقبة:** انخفضت مستويات cfDNA بعد ثلاثة أشواط من المعالجة بشكل معتد به إحصائياً عند المرضى الذين تمت مراقبتهم (41 مريضاً)، ولم يتوازي ذلك مع انخفاض معتد به إحصائياً في قيم LDH ونسبتها. كما لم يتناسب تغير مستويات cfDNA أو أي من هذه الواصفات مع النسبة المئوية للاستجابة للعلاج (مقدرة بمدى نقص حجم أكبر كتلة)، واقتصر الارتباط الإيجابي المعتد به إحصائياً وقت المراقبة على ارتباط قيم cfDNA (المُقاس بالتقانتين) مع النسبة المئوية لنقص حجم أكبر كتلة.

الاستنتاج: يمكن التأسيس على هذه النتائج لتغيير استخدام مقايسة cfDNA كمقدمة لاستخدامها بديلاً أو متمماً للإجراءات الشعاعية والنسجية الباضعة والمكلفة في مراحل تدبير مرضى DLBCL المتعلقة بوجود الورم ومتابعة نجاعة العلاج. كما يمكن استخدام cfDNA المُقاس بمقياس الطيف الضوئي (جهاز النانودروب) للهدف ذاته في الأوضاع محدودة الموارد. وربما تكشف دراسات طولانية أوسع دور هذه المعاييرة كبديل عن عدد من هذه الإجراءات الباضعة في مراحل التدبير المختلفة.

الكلمات المفتاحية: لمفوما الخلية اللمفاوية البائية المنتشرة DLBCL؛ الدنا الحر الجوال البلازمي cfDNA؛ مراقبة معالجة DLBCL؛ نازعة هيدروجين اللاكتات LDH.

أولاً: الدراسة النظرية

الفصل (1) أورام الدم والأنسجة اللمفاوية: الوبائيات والتصنيف

Hematolymphoid Tumors: Epidemiology & Classification

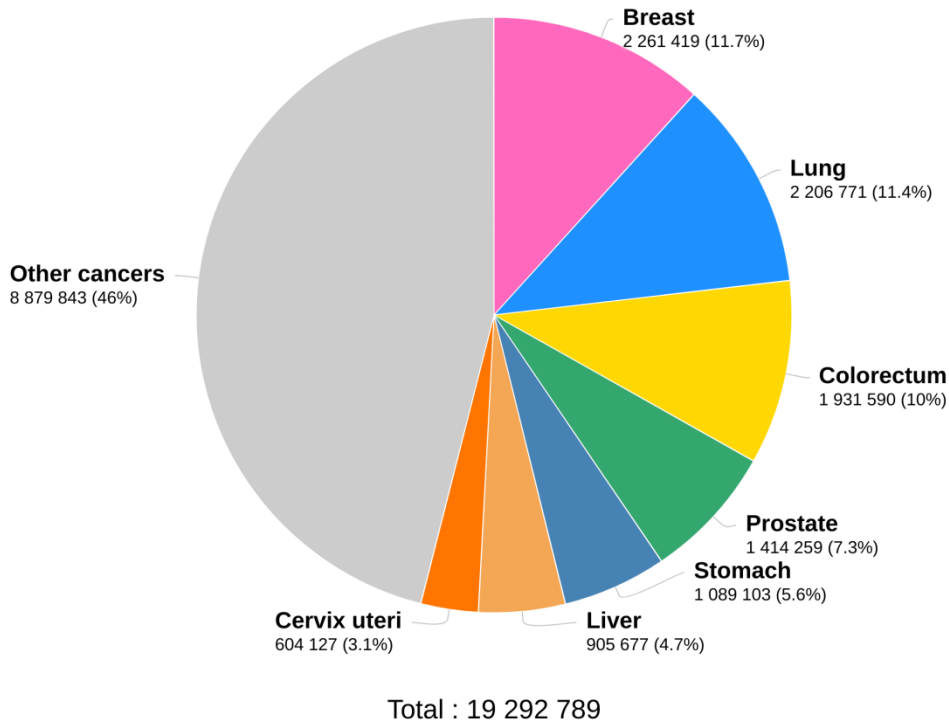
1.1 مقدمة: وبائيات السرطان

1.1.1 1.1 في العالم

السرطان cancer هو مصطلح عامّ يشمل مجموعةً كبيرة من الأمراض التي يمكن أن تصيب أيّ جزء من الجسم، وتُرادفه مصطلحات أخرى مستخدمة هي الأورام الخبيثة malignant tumours والتنتشّوات neoplasms. ويتّسم السرطان بالتولّد السريع لخلايا شاذة تنمو خارج نطاق حدودها المعتادة (الورم الموضعي) ويمكن أن تغزو بعد ذلك أجزاءً مجاورة من الجسم (امتداد موضعي) وأن تنتشر إلى أعضاء أخرى منه (النقائل metastasis)، وتمثل النقائل المنتشرة على نطاق واسع أهم أسباب الوفاة الناجمة عن السرطان (WHO, 2023a).

والسرطان هو أحد الأمراض غير السارية Noncommunicable diseases (NCDs) التي تضم أيضاً، فيما تضم، الأمراض القلبية الوعائية وداء السكري والأمراض التنفسية المزمنة، وهي المسؤولة تقريباً عن 75% من الوفيات العالمية حيث تتسبب بنحو 17 مليون وفاة عالمياً كل عام لمن هم دون السبعين من العمر (WHO, 2023c). ومن حيث الترتيب، يحتل السرطان المرتبة الثانية بين الأسباب الرئيسة للوفيات العالمية (Nagai & Kim, 2017)، ويأتي بعد الأمراض القلبية الوعائية بين الأمراض غير السارية؛ وقد أصاب في العام 2020 نحو 19.3 مليون شخص (الشكل 1) وتسبّب بنحو 10 مليون وفاة (Ferlay et al., 2021; Sung et al., 2021).

وتتشكل أورام الدم، وأهمها اللابيضاضات Leukemia واللمفومات lymphomas (الهودجكينية Hodgkin واللاهودجكينية "Non-Hodgkin" NHL) والورم النقوي العديد Multiple myeloma، جزءاً مهماً من السرطانات حيث تشير التقديرات العالمية في العام 2020 إلى حدوث نحو 1.3 مليون إصابة، ومعدّل وقوع يبلغ نحو 6.6% من إجمالي السرطانات في العالم. وتسبّبت هذه الأورام بنحو 7.1% من وفيات السرطان العالمية في العام 2020 (نحو 712 ألف حالة وفاة) (Sung et al., 2021).



الشكل 1: مخطط نسب أهم أنواع السرطانات في العالم (WHO-IARC, 2023).

وتشير تقديرات العام 2020 إلى أنّ عدد الإصابات باللمفومات اللاهودجكينية NHL (544,352 حالة؛ معدل الوقوع 2.8%) يحتل المرتبة الأولى بين أورام الدم (نحو 43% من الحالات)، وتأتي الوفيات الناجمة عنها (259,793 بمعدل 2.6%) في المرتبة الثانية (نحو 37% من وفيات أورام الدم) بعد الابيضاضات (نحو 44%). وهي تمثل سادس أكثر أنماط السرطان شيوعاً في المملكة المتحدة والولايات المتحدة الأمريكية، ويزداد حدوثها مع تقدم العمر فوق 65 عاماً، مع شيوع أكبر عند الذكور مقارنة بالإناث (Ferlay et al., 2021; Mafra et al., 2022;).

(Rodriguez-Abreu, Bordoni, & Zucca, 2007; Smith et al., 2015; Sung et al., 2021; UK, 2016).

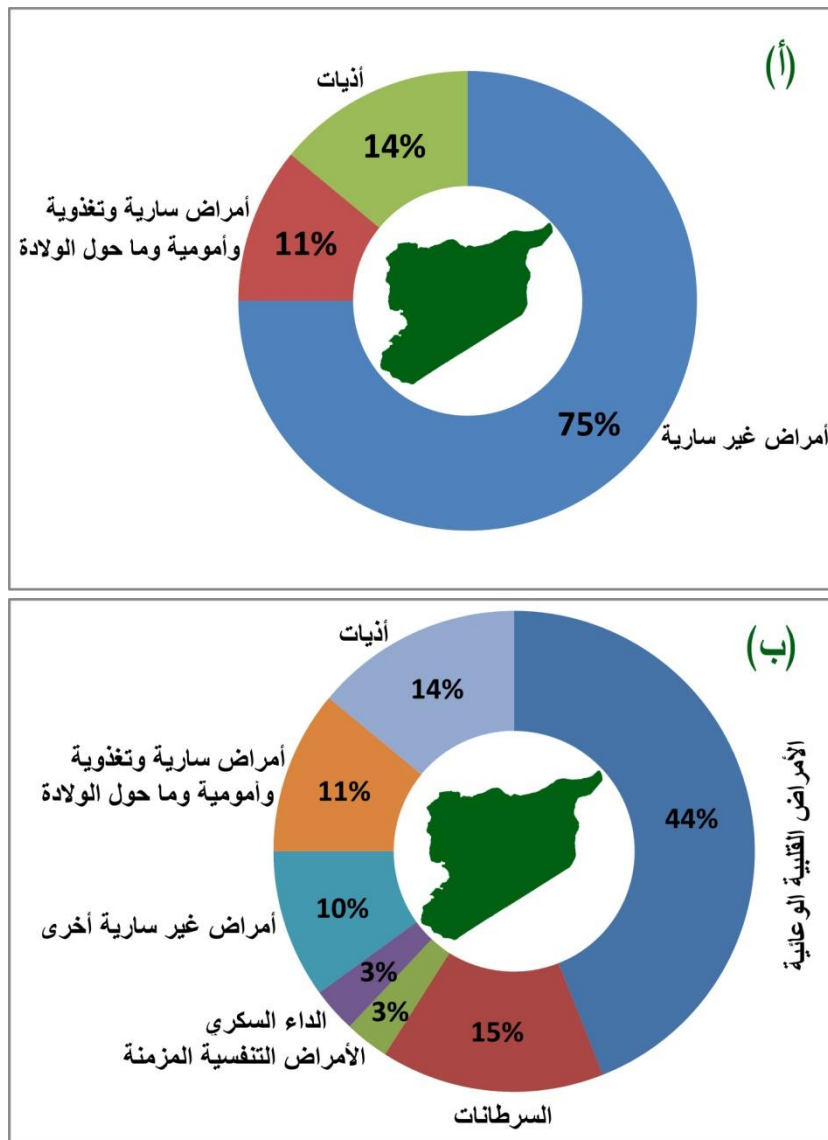
ولمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة DLBCL هي أكثر أشكال اللمفومات شيوعاً (25-30% من الحالات في العالم) وتصل عدد الحالات الجديدة السنوية في مختلف أنحاء العالم إلى نحو 150 ألف حالة (Freedman, Aster, Lister, & Rosmarin, 2023; Sehn & Salles, 2021; Singh et al., 2020). ويتراوح معدل وقوع DLBCL عالمياً بين 2.3 و13.8 حالة لكل 100 ألف من سنوات عمر الأشخاص، مع معدل انتشار بنحو 20.0%-63.9% بين حالات اللمفوما اللاهودجكينية (Garg et al., 2022; Mafra et al., 2022; Sehn & Salles,).

(2021; UK, 2016).

1.1. 2 في سورية

يمثل الشكل 2- (أ) أهم أسباب الوفيات في سورية، ويتضح منه أن الأمراض غير السارية NCDs تتسبب بنحو 75% من هذه الوفيات. وتأتي السرطانات بمختلف أشكالها ومواقعها في المرتبة الثانية (15% من أسباب وفيات الأمراض غير السارية) بعد الأمراض القلبية الوعائية (44% من وفياتها) (الشكل 2- (ب)) (WHO, 2023b).

وأظهرت تقديرات منظمة الصحة العالمية الخاصة وقوع 20959 إصابة بأنواع السرطانات في الجمهورية



العربية السورية في العام

WHO-IARC,) 2020

(2023). وكان أكثر أنواع

السرطانات وقوعاً هو

سرطان الثدي (معدل

الوقوع نحو 21%؛ نسبة

الوفيات نحو 14%)، أما

أكثر السرطانات تسبباً

بالوفيات فهي سرطانات

الرئة والقصبات والحنجرة

(معدل الوقوع نحو 9%؛

ونسبة الوفيات نحو

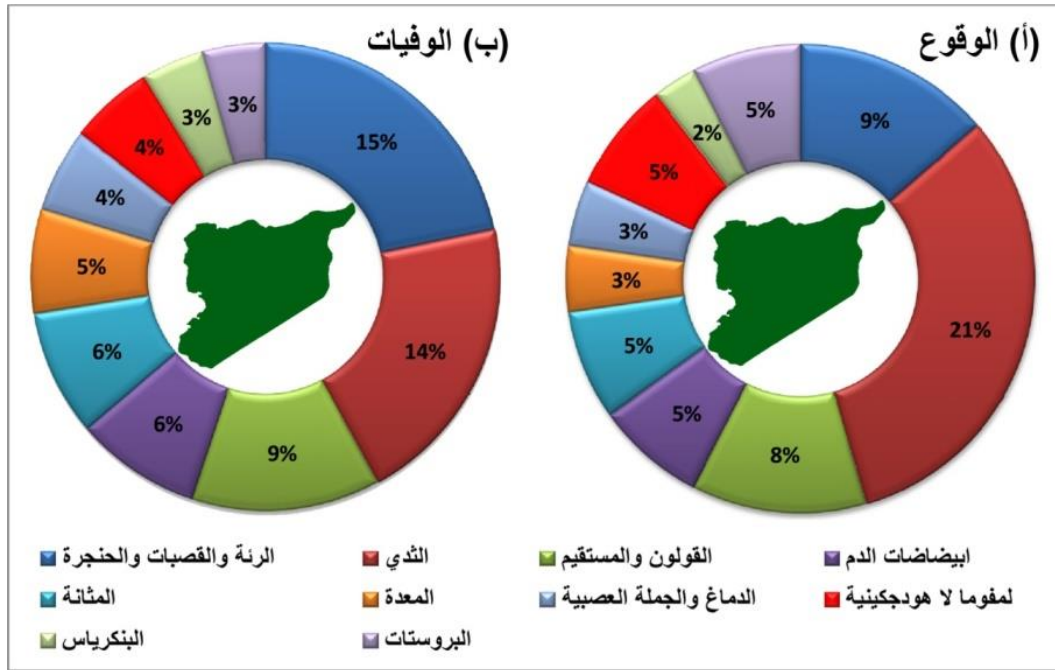
15%). أما اللمفومات

اللاهودجينية فكان معدل

وقوعها في سورية نحو

5% وتسببت بوفيات

الشكل 2: (أ) أهم أسباب الوفيات في سورية؛ (ب) أنواع الأمراض غير السارية المسببة لنحو 75% من الوفيات في سوريا. تأتي السرطانات في المرتبة الثانية. الشكل من تصميم الباحثة استناداً إلى إحصائيات منظمة الصحة العالمية (WHO, 2023b).



الشكل 3: (أ) معدلات وقوع أنواع السرطانات في سورية؛ (ب) أنواع السرطانات المسببة للوفيات في سوريا. الشكل من تصميم الباحثة استناداً إلى تقديرات تقريبية لمنظمة الصحة العالمية (WHO, 2023b).

تعاود نحو 4% من وفيات السرطانات عموماً (الشكل 3). ولم تتوافر للباحثة ولا لمنظمة الصحة العالمية إحصائيات خاصة بأنواع هذه اللمفومات، بما في ذلك لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة DLBCL في سورية (WHO, 2023b).

1. 2 تصنيف منظمة الصحة العالمية (2023) لأورام الدم والأنسجة اللمفاوية

بعد نسخها المنقحة الرابعة (2016) لتصنيف أورام الدم والأنسجة اللمفاوية، تابعت منظمة الصحة العالمية WHO في نسخها الخامسة الأخيرة (2023) استخدام هيكلية تصنيف تستند إلى الدمج بين الأسس الشكلية morphology (النوع الخلوي والنسجي وهندسة النسيج) والسمات السريرية (حاد/مزمن؛ ندرة الخلايا/كثرة الخلايا) والخط الخلوي lineage (استناداً إلى النمط الظاهري المناعي immunophenotype) والملاح الوراثية الخلوية cytogenetic والجزيئية (Freedman, Friedberg, Aster, Gurbuxani, & Sekeres, 2023). واعترفت WHO في هذا التصنيف الأخير بالأهمية المتزايدة للمعطيات المورثية والجزيئية الأخرى في تطور الأورام اللمفاوية وتعريفها وتصنيف مخاطرها، مع الأخذ بالاعتبار ما يعترف به المجتمع العلمي وحقيقة أن الموارد التشخيصية المطلوبة

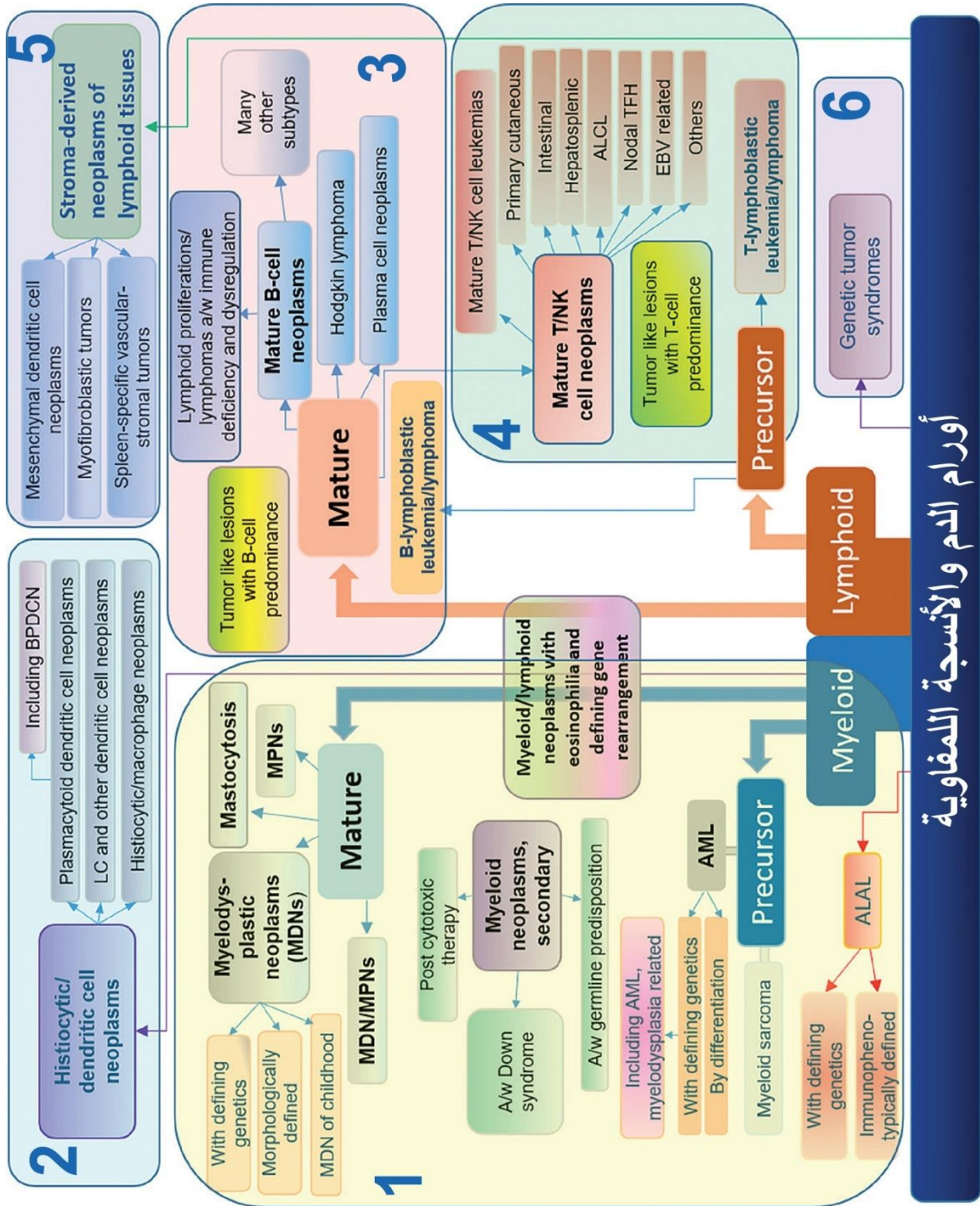
ليست متوافرة في أنحاء العالم. بالإضافة إلى ذلك، ولأول مرة، أدرج التصنيف حالات غير ورمية ربما تمثل تنبيهاً إلى التشخيص التفريقي الذي يحاكي المفوما (Alaggio et al., 2022; Kurz et al., 2023).

تقع أغلبية أورام الدم والأنسجة اللمفاوية في تصنيف WHO الحديث (WHO-HAEM5)، وحسب تمايز الخلية الورمية، ضمن فئتين عامتين (الشكل 4): أورام الخلايا النقية وأورام الخلايا اللمفاوية (المفومات)، وتتضمن الفئة الأخيرة كلاً من الخلايا البائية والخلايا التائية/القاتلة الطبيعية (W. Li, 2022). ويُرتَّب تصنيف WHO-HAEM5 الأمراض وفق زيادة مستويات الموصفات النوعية: (1) الفئة category (مثل الخلية اللمفاوية البائية الناضجة أو الخلية التائية أو الخلية النقية)؛ (2) الفصيلة family / الصنف class (مثل لمفومات الخلية البائية الكبيرة، المفوما الجريبية، لمفوما هودجكن HL)؛ (3) الكيان entity / النمط type (مثل لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة، غير المميزة بطريقة أخرى)؛ (4) النمط الفرعي subtype (مثل لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة المرافقة للالتهاب المزمن، لمفوما الخلية البائية الكبيرة المرافقة للفيبرين). وقد تمت صياغة الكيانات والأنماط الفرعية بحيث يكون تنفيذ نظام تصنيف WHO-HAEM5 مُمكنًا عالميًا، وفي جميع الأوضاع. وبناء على ذلك فقد وضع WHO-HAEM5 أورام الدم والأنسجة اللمفاوية ضمن ست فئات رئيسة يوضحها الشكل 4، وتتضمن (Alaggio et al., 2022; Freedman, Friedberg, et al., 2023; Kurz et al., 2023; W. Li, 2022):

- 1) تكاثرات الخلايا النقية وأورامها Myeloid proliferations and neoplasms
- 2) أورام الخلايا المُنسَّجة والمتغصنة Histiocytic/dendritic neoplasms
- 3) تكاثرات الخلايا اللمفاوية البائية والمفومات البائية B-cell lymphoid proliferations and lymphomas
- 4) تكاثرات ولمفومات الخلايا التائية (والقاتلة الطبيعية) T-cell lymphoid proliferations & lymphomas
- 5) أورام الأنسجة اللمفاوية المشتقة من السدى (البرانشيم) Stroma-derived neoplasms of lymphoid tissues
- 6) المتلازمات الورمية الوراثية Genetic tumor syndromes (Alaggio et al., 2022; W. Li, 2022).

1.3 مفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة في تصنيف منظمة الصحة العالمية 2023

تتألف فئة تكاثرات الخلايا اللمفاوية البائية والمفومات البائية في تصنيف WHO-HAEM5 من 5 فصائل:



الشكل 4: بنية التصنيف الهرمي وترتيب المحتويات استناداً إلى الخط الخلوي في الإصدار الخامس من تصنيف منظمة الصحة العالمية للأورام الدموية والمفاوية. تمثل الأرقام الكبيرة فئات الأورام الرئيسية الست (في الصفحة السابقة).

ALAL؛ ابيضاض حاد مع خط خلوي ملتبس؛ ALCL؛ لمفوما الخلية الكبيرة الكُثْمِيَّة (اللامتمايزة)؛ AML؛ ابيضاض نقوي حاد؛ A/w؛ مترافق مع؛ BPDN؛ ورم الخلايا التغصنية البلازماوية الأرومية؛ LC؛ خلية لانغرهانس؛ MDN؛ ورم خلل التسلج النقوي؛ MPN؛ خلية تكاثري نقوي؛ TFH؛ خلية مساعدة جريبية نائية (W. Li, 2022).

(أ) إصابات شبيهة بالورم مع غلبة اللمفاويات البائية Tumor-like lesions with B-cell predominance

(ب) أورام الخلية البائية الطبيعية Precursor B-cell neoplasms

(ج) أورام الخلية البائية الناضجة Mature B-cell neoplasms

(د) لمفوما هودجكن Hodgkin lymphoma (HL)

(هـ) أورام الخلايا البلازمية والأمراض الأخرى المترافقة مع وجود البارابروتين في البلازما Plasma cell neoplasms

(PCNs) and other diseases with paraproteins (Alaggio et al., 2022; W. Li, 2022).

تتكون أورام الخلية البائية الناضجة من 12 كياناً (نمطاً، أو فئة فرعية)، ومنها لمفومات وإبيضاضات

الخلية البائية الطحالية Splenic B-cell lymphomas and leukemias، ولمفوما المناطق الهامشية Marginal

zone lymphoma (MZL)، واللمفوما الجريبية Follicular lymphoma (FL)، ولمفوما الخلية الرئوية Mantle cell

lymphoma، ولمفوما بوركت Burkitt lymphoma، والتكاثرات اللمفاوية واللمفومات المترافقة مع نقص المناعة

واضطراب تنظيمها (وهي جاءت مكان الاضطرابات التكاثرية اللمفاوية المترافقة مع مع نقص المناعة في نسخة

2016 من تصنيف WHO، وتضم، فيما تضم، لمفومات الخلايا التائية الناضجة والقاتلة الطبيعية النادرة)،

ولمفومات الخلايا اللمفاوية البائية الكبيرة Large B-cell lymphomas. وأحد أهم الأنماط الفرعية لهذه

اللمفومات هو لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة Diffuse Large B-cell lymphomas، النمط الفرعي

النسجي الأكثر شيوعاً بين اللمفومات اللاهودجكينية (Alaggio et al., 2022; W. Li, 2022).

ورغم تطوير عدة تصنيف لأورام الدم والأنسجة اللمفاوية مع الزمن، لا تزال الكثير من المراكز العلاجية

والصحية حول العالم تعتمد على تصنيف اللمفومات إلى فرعين رئيسين:

• لمفوما هودجكن HL: وهي نوع خاص من اللمفومات كثيراً ما يترافق مع إصابة الخلايا السرطانية

باضطرابات وراثية متعددة مرتبطة بشذوذات مصاحبة في سبل الإشعار التي تسيطر عليها سبل إشعار نشطة

مثل سبل JAK-STAT (كيناز جانوس - مُنبغ الإشعار ومُنشّط الانتساخ Janus kinase-signal transducer

and activator of transcription) وسبل NFκB (العامل النووي كابا-ب)، وكلاهما يُنتج عادةً إشعارات بقاء

survival مفرطة النشاط (Z. Li, Mu, & Xiao, 2023). ويمكن تصنيف هذه اللمفوما إلى نوعين: لمفوما

هودجكين التقليدية ولمفوما هودجكين مع غلبة اللمفاويات العقدية (Alaggio et al., 2022).

• اللمفوما اللاهودجكينية (Non Hodgkin Lymphoma (NHL)، وهي تشمل باقي أنواع اللمفومات ويمكن تعريفها

على أنها مجموعة متنوعة من الخلايا المشتقة من عدة أنواع من الخلايا مثل سليفة الخلية البائية B-Cell

Progenitors وسليفة الخلية التائية T-Cell Progenitors والخلايا البائية الناضجة Mature B-Cells والخلايا

التائية الناضجة Mature T-Cells والخلايا القاتلة الطبيعية Natural Killer Cells. وأكثر اللمفومات

اللاهودجكينية شيوعاً هي لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة (Singh et al., 2020)، وهي موضع اهتمام

الدراسة الحالية وموضوع الفصل الثاني منها.

الفصل (2) لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة

Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)

2.1 مقدمة

تمثل لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة DLBCL مجموعةً من الأمراض المتغايرة heterogeneous سريرياً وبيولوجياً، وقد ساعدت الدراسات الجزيئية بشكل لافت على توسيع فهمنا لهذه الأورام واستعراف مجموعات فرعية جديدة منها وأهداف علاجية محتملة. وهي أكثر الأنماط الفرعية شيوعاً في العالم حيث تمثل ما يصل إلى نحو 40% من حالات المفوما اللاهودجكينية (Song et al., 2022). ورغم أن تصنيف منظمة الصحة العالمية الخامس لخباثات النسيج اللغفاوي استعرف وجود عدة أنماط فرعية من DLBCL تتصف بعلامات متفرقة سريرية و/أو إكلينيكية (الأنماط الفرعية المظلمة في الجدول 1)، تبقى معظم حالات هذه الخباثة (نحو 80%) ضمن فئة لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة، غير المميزة بطريقة أخرى DLBCL, NOS، وهي مرض عدواني يتطلب معالجة كيميائية مناعية فورية نظامها التقليدي هو نظام R-CHOP الذي يتكون من الريتوكسيماب Rituximab (مناعي) والسكلوفوسفاميد Cyclophosphamide وهيدروكسي الدوانوروبيسين Hydroxydaunorubicin (هيدروكلوريد الدوكسوروبيسين) والأونكوفين Oncovin (سلفات الفينكريستين) والبريدنيزون Prednisone. ورغم تحسن حصة العلاج، فمن المتوقع عادةً نكس هذا المرض (Freedman, Aster, et al., 2023; W. Li, 2022; Song et al., 2022; Sukswai, Lyapichev, Khoury, & Medeiros, 2020).

ورغم أن التصنيفات الأحدث للأورام الدموية واللمفاوية حافظت على اعتماد تصنيف "المنشأ الخلوي"، إلا أن المتوقع هو أن تساهم الأبحاث الكثيرة في مجال الوراثة الجزيئية، ومع التطور الهائل للتقانات الحيوية الجزيئية، في الانتقال إلى التصنيف المورثي الجزيئي molecular genetic classification في المستقبل القريب مما يوفر إمكانيات أكبر نحو توجيه أكثر نوعية لعلاج الأنماط الفرعية المختلفة من لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة بغية الوصول إلى حصة علاجية أفضل مع تخفيف احتمالات النكس (Cutmore, Krupka, & Hodson, 2023; W. Li, 2022; Song et al., 2022).

الجدول 1: لمفومات الخلية البائية الكبيرة (W. Li, 2022; NCCN, 2023; Song et al., 2022).

Diffuse large B-cell lymphoma, NOS	لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة، غير المميزة بطريقة أخرى
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma	لمفوما الخلية البائية الكبيرة الغنية بالمنسجات/الخلايا التائية
Diffuse large B-cell lymphoma (أو BCL2 و MYC مع مُراتبات	لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة/ لمفوما الخلية البائية عالية الدرجة مع مُراتبات MYC و BCL2 (أو
cell lymphoma/ high grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 rearrangements	
(ALK-positive large B-cell lymphoma (أو ALK مع إيجابية	لمفوما الخلية البائية الكبيرة مع إيجابية ALK (أو
(Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement (أو IRF4 مع مُراتبة	لمفوما الخلية البائية الكبيرة مع مُراتبة IRF4 (أو
High-grade B-cell lymphoma	لمفوما الخلية البائية عالية الدرجة مع شذوذات الذراع الطويل من الصبغي الحادي عشر
with 11q aberrations	
Lymphomatoid granulomatosis (وَرَامٌ خُبَيْبِيٌّ لِمُفَانِيّ)	الورم الحبيبي الشبيه بالمفوما (وَرَامٌ خُبَيْبِيٌّ لِمُفَانِيّ)
(EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma (أو EBV مع إيجابية	لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة مع إيجابية EBV (أو
Diffuse large B-cell lymphoma associated with	لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة المُصاحبة للالتهاب المزمن
chronic inflammation	
Fibrin-associated large B-cell lymphoma	لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة المُصاحبة للفيبرين
Fluid overload-associated large B-cell lymphoma	لمفوما الخلية البائية الكبيرة المُصاحبة لفرط حمل السوائل
(Richter's transformation (تحول ريختر	لمفوما الخلية البائية الكبيرة الناشئة من الالبيضاض اللغفاوي المزمن LLC (تحول ريختر
Plasmablastic lymphoma	المفوما الأرومية البلازمية
Primary large B-cell lymphoma of immune-privileged sites	لمفوما الخلية البائية الكبيرة الأولية في المواقع الحصينة على المناعة
Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type	لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة الجلدية الأولية، نمط الساق (تظهر في الساقين غالباً)
Intravascular large B-cell lymphoma	لمفوما الخلية البائية الكبيرة داخل الأوعية
Primary mediastinal large B-cell lymphoma	لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنصفية الأولية
Mediastinal grey zone lymphoma	لمفوما المنطقة الرمادية المنصفية
High-grade B-cell lymphoma, NOS	لمفوما الخلية البائية عالية الدرجة، غير المميزة بطريقة أخرى

ALK: كيناز المفوما الكَشْمِيَّة (اللامتمايزة) anaplastic lymphoma kinase؛ B-cell: خلية لمفاوية بائية؛ BCL2: مورثة (بروتين) لمفوما الخلية البائية 2؛ EBV: فيروس إيبشتاين بار Epstein-Barr virus؛ IRF4: العامل الرابع المنظم للإنترفيرونات 4 Interferon regulatory factor؛ MYC: مورثة (بروتين) الورم النقوي Myelocytomatosis؛ NOS: غير المميز (ة) بطريقة أخرى T-cell؛ not otherwise specified: خلية لمفاوية تائية.

2. 2 السببيات وعوامل الاختطار

تنشأ لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة عادةً على حساب الخلية البائية الناضجة من المركز المنتش وما بعد المركز المنتش، وتتكون عادةً من خلايا تشبه الأرومات المركزية centroblasts أو الأرومات المناعية immunoblasts، وهما نوعان من الخلية البائية المفعلة. والسببيات في DLBCL معقدة ومتعددة العوامل،

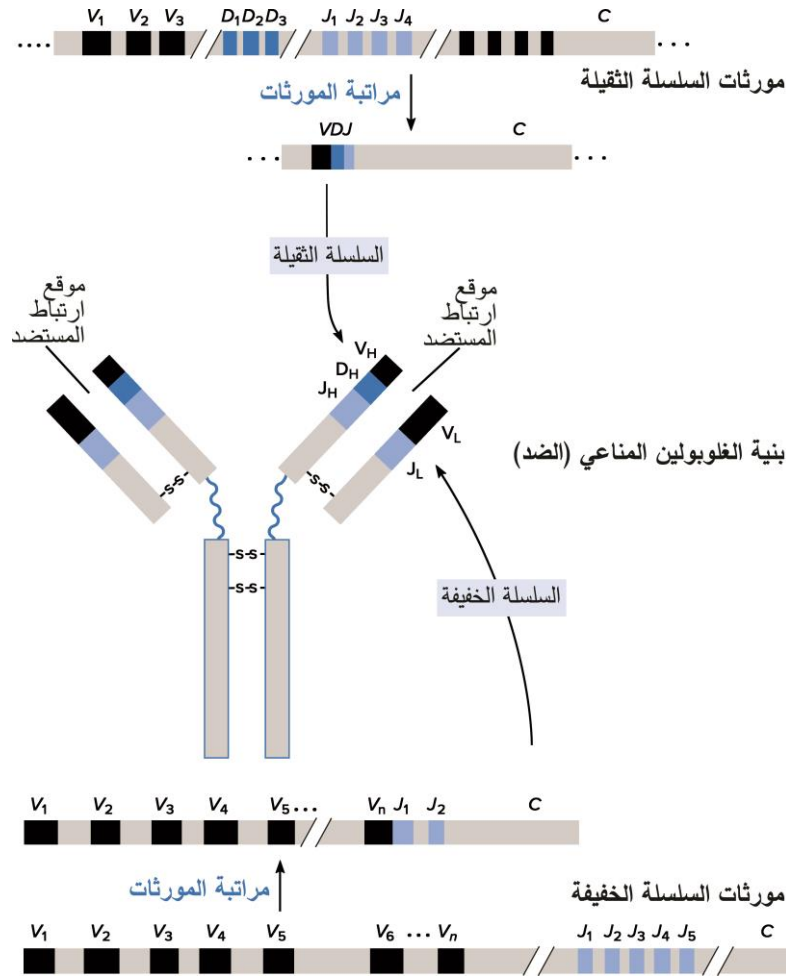
وتتضمن إصابات وراثية نوعية نسبياً لهذه المفوما (مثل مُراتبة المورثة *BCL6*) وتبدلات جزيئية يمكن أن توجد في الأنواع الأخرى من لمفوما لا هودجكن. و قد تكون DLBCL أولية وتنشأ مباشرة من الخلية البائية، وقد تنجم عن تحول العديد من الأنماط المختلفة من اللmfومات البائية منخفضة الدرجة (بطيئة التطور) كالابيضاض اللmfوي المزمن للخلية اللmfاوية البائية (مثل تحول ريختر Richter's transformation) واللمفوما الجريبية ولمفوما المناطق الهامشية ولمفوما المناطق الهامشية الطحالية. وعادة ما تكون تلك اللmfومات الناتجة عن خباثات دموية سابقة أكثر عدائية ويكون إنذارها أسوأ (Cutmore et al., 2023; Freedman, Aster, et al., 2023; Kumar, Shrivastava, Meghal, & Chandra, 2018; Leeksa, De Miranda, & Veelken, 2017).

إضافة إلى قصة وجود لمفوما سابقة، هناك العديد من عوامل الاختطار الأخرى التي تزيد احتمال حدوث DLBCL مثل العمر (فوق 65 عاماً) والجنس (الذكورة) والقصة العائلية لوجود DLBCL أو غيرها من اللmfومات اللاهودجكينية NHLs، والمواد الكيميائية (كالمبيدات الحشرية والعشبية والعوامل المؤكدة وصبغات الشعر) والتدخين والبدانة والإشعاع المؤين واضطرابات نقص المناعة الموروثة (مثل رنج توسع الشعيرات الوراثي ومُتلازمة فيسكوت-الدريك Wiskott-Aldrich syndrome وعوز المناعة الشائع المتغير واضطراب التكاثر اللmfوي المرتبط بالصبغي X والعوز المناعي المُشترَك الوخيم) والعدوى (مثل عدوى فيروس العوز المناعي البشري وفيروس الحلاّ البسيط وفيروس إيبشتاين بار والتهاب الكبد B وC) وأمراض المناعة الذاتية أو الأمراض الرثوية وغرس الأعضاء أو الخلايا الجذعية (Cutmore et al., 2023; Freedman, Aster, et al., 2023; Leeksa et al., 2017; J. Luo et al., 2022; Sehn & Salles, 2021).

2.3 علم الأمراض والبيولوجيا والتصنيف

2.3.1 الآلية المرضية

يجري تطور الخلية البائية السوي في نقي العظم وينجم عنه تحول سليفة الخلية البائية B-progenitor cell إلى خلية بائية ناضجة mature B cell تقوم بالتعبير عن جزيء ضدي مناعي نوعي IgM كامل على سطحها بعد مُراتبة rearrangement مورثات الحقول الثلاثة (VDJ: الحقل المتغير Variable وحقل التنوع Diversity وحقل الوصل Junction) للسلسلتين الخفيفتين 2L والسلسلتين الثقيلتين 2H (الشكل 5) (Barakat, 2023).



الشكل 5: مراتبة مورثات السلسلة الثقيلة والسلسلة الخفيفة للغلوبولين المناعي (Barakat, 2023).

وبعد إطلاقها من نقي العظم تتعرض الخلية البائية الناضجة لمستضد ما في المنطقة بين الجريبية interfollicular من الأنسجة اللمفاوية الثانوية، ثم تهاجر معظمها إلى داخل المركز المنتش germinal center، ثم تتكاثر في مركز جريب أولي لتشكل مركزاً منتشاً. تنضج الأرومات المركزية centroblasts إلى خلايا مركزية centrocytes في أثناء انتقالها من المنطقة الخفيفة light zone إلى المركز المنتش. وتخضع الخلية البائية في المركز المنتش إلى تأشيب محول للنوع class-switch recombination وتطفير فائق جسدي somatic hypermutation. وبعد مرورها عبر المركز المنتش، يمكن أن تتحول الخلية البائية إلى خلايا ذاكرة أو أرومات بلازمية plasmablasts تخضع للمزيد من التطور آخر لتصبح خلايا بلازمية (Alizadeh et al., 2000; Kumar et al., 2018). تتكون DLBCL من خلايا بائية كبيرة تتصف بنموذج نمو منتشر ويمكن أن تنشأ من الخلية البائية الناضجة في مختلف مراحل تمايزها، حيث يُعتقد أنّ الأرومات المركزية هي منشأ DLBCL من نوع GCB

(الخلية المركز المنتش البائية germinal center B cell)، وأنَّ الأرومات البلازمية هي منشأ DLBCL من نوع ABC (الشبيه بالخلية البائية المُفَعَّلة activated B cell like) (Alizadeh et al., 2000; Cutmore et al., 2023;) (Kumar et al., 2018; Song et al., 2022).

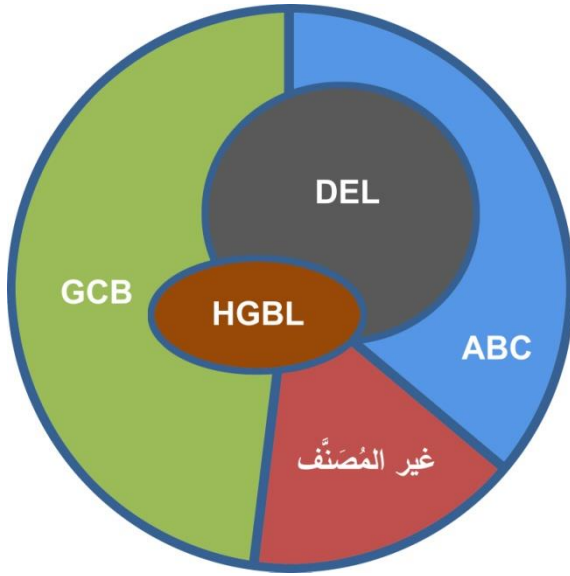
2.3.2 البيولوجيا (الجزئية) والتصنيف

لقد جاء مفهوم أنَّ DLBCL تتضمن أكثر من مرض جزئي واحد من تطور التقانة الحيوية الجزئية التي تسمح بوضع بروفيل تجميعية المنتسحات transcriptome profiling. وقد بُدِلَتْ جهودٌ كبيرةً على مدى العقدين السابقين قادها علماء متعدّدو التخصصات (في الأمراض والبيولوجيا الجزئية والسريريات) ليتم التوصل إلى استعراف أنماط فرعية من DLBCL استناداً إلى خلية المنشأ (COO) cell of origin أو الخصائص الجزئية (Cutmore et al., 2023; Susanibar-Adaniya & Barta, 2021). وكان تصنيف خلية المنشأ، والذي اقترحه فريق علي زادا (Alizadeh et al., 2000)، هو أكثر التصنيفات المعتمدة على الانتساخ قبولاً (Cutmore et al., 2023; Kumar et al., 2018; Susanibar-Adaniya & Barta, 2021).

2.3.2 (أ) التصنيف وفق الخلية المنشأ

التصنيف وفق الخلية المنشأ هو التطور الأكثر أهمية في فهم إمراضية لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة وتدرج اختطارها وإنذارها من حيث مدى الاستجابة للمعالجة. والفحص المعياري الأساسي لتحديد هذا التصنيف هو ترميط التعبير الجيني (Gene expression profiling (GEP) الذي يقسم DLBCL إلى ثلاثة أنماط فرعية رئيسة (الشكل 6) (Alizadeh et al., 2000; Cutmore et al., 2023; Kumar et al., 2018; Liu & Barta, 2019;) (Susanibar-Adaniya & Barta, 2021):

- **نمط خلايا المركز المنتش البائية (germinal center B cell (GCB):** وهي مشتقة من أرومات المركز المنتش السوية normal GC centroblasts، وتبدي شاكلة تعبيرية expression profile مشابهة لما تبديه خلايا المركز المنتش البائية مع وجود تغاير بين النسائل intraclonal heterogeneity وفرط نشاط تطفيري جسدي somatic hypermutation مستمر والتعبير عن CD10 وBCL6.



الشكل 6: تداخل أنماط DLBCL وفق تصنيف خلية المنشأ والخصائص الجزيئية (Liu & Barta, 2019). [ABC: النمط الشبيه بالخلية البائية المُفَعَّلة؛ DEL: لمفوما التعبير المزدوج؛ GCB: لمفوما خلايا المركز المنتش البائية؛ HGBL: لمفوما بائية عالية الدرجة (مع طفرة في المورثة MYC والمورثة BCL2 و/أو المورثة BCL6)، وتسمى أيضاً لمفوما الضربة المزدوجة أو الثلاثية].

• النمط الشبيه بالخلية البائية المُفَعَّلة

activated B cell (ABC): ويبدى شاكلة

تعبيرية مشابهة لخلايا ما بعد المركز

المنتش البائية أو الخلية البائية المُفَعَّلة مع

زيادة التعبير عن معقد NF-KB (العامل

النووي كاباب B nuclear factor kappa B)

ونشاطه المستمر، فضلاً عن التعبير عن

IRF4 و BCL2.

• النمط غير المصنّف unclassifiable:

ويشكل نحو 10-15% من الحالات، يتميز

بخلايا ورمية لا تتشابه أنماط تعبيرها

الجيني مع الخلية البائية في المركز

المنتش أو ما بعده.

ورغم كون تنميط التعبير الجيني GEP هو المعيار الذهبي لتنميط DLBCL وتحديد إنذارها وتدرج خطورتها،

فالقُدرة على إجراء GEP روتينياً باستخدام مصفوفات الدنا الدقيقة DNA microarrays في الممارسة السريرية

محدودة بسبب كلفتها وعدم انتشارها وبعض الصعوبات التقنية المرتبطة بها (S. Barton, Hawkes, 2012; Cutmore et al., 2023; Kumar et al., 2018; Susanibar-Adaniya &

Wotherspoon, & Cunningham, 2012; Cutmore et al., 2023; Kumar et al., 2018; Susanibar-Adaniya & Wotherspoon, & Cunningham, 2012; Cutmore et al., 2023; Kumar et al., 2018; Susanibar-Adaniya &

Wotherspoon, & Cunningham, 2012; Cutmore et al., 2023; Kumar et al., 2018; Susanibar-Adaniya & Wotherspoon, & Cunningham, 2012; Cutmore et al., 2023; Kumar et al., 2018; Susanibar-Adaniya &

Wotherspoon, & Cunningham, 2012; Cutmore et al., 2023; Kumar et al., 2018; Susanibar-Adaniya & Wotherspoon, & Cunningham, 2012; Cutmore et al., 2023; Kumar et al., 2018; Susanibar-Adaniya &

Wotherspoon, & Cunningham, 2012; Cutmore et al., 2023; Kumar et al., 2018; Susanibar-Adaniya & Wotherspoon, & Cunningham, 2012; Cutmore et al., 2023; Kumar et al., 2018; Susanibar-Adaniya &

Wotherspoon, & Cunningham, 2012; Cutmore et al., 2023; Kumar et al., 2018; Susanibar-Adaniya & Wotherspoon, & Cunningham, 2012; Cutmore et al., 2023; Kumar et al., 2018; Susanibar-Adaniya &

Wotherspoon, & Cunningham, 2012; Cutmore et al., 2023; Kumar et al., 2018; Susanibar-Adaniya & Wotherspoon, & Cunningham, 2012; Cutmore et al., 2023; Kumar et al., 2018; Susanibar-Adaniya &

فإن استخدام المقاربة المناعية محدودٌ بسبب ضعف التوافق مع GEP وانخفاض الدقة ومعدل التكرارية reproducible ونقص الفائدة الإنذارية. ولا تميز الخوارزمية المناعية ما نسبته 10-15% من الأورام. وقد تطورت حديثاً تقانات حيوية جزيئية لتنميط التعبير الجيني وتسمح بتصنيف الخباثات، وأظهرت العديد من الدراسات توافقها مع GEP بشكل أفضل من توافق IHC، وإن كان معظمها يقتصر استخدامه في الغالب على البحوث (Cutmore et al., 2023; Gleeson, Hawkes, Cunningham, Jack, & Linch, 2015; Susanibar-Adaniya & Barta, 2021).

2.3.2 (ب) الخصائص الجزيئية

توجد مُرَاتِبَة MYC، وهو طليعة مورثة ورمية على الشريط 24 من الذراع الطويلة من الصبغي الثامن 8q24، في نحو 10-15% من مرضى DLBCL حديثي التشخيص. تؤدي هذه المراتبة إلى اضطراب تنظيم النُقيا survival الخلوية والتكاثر. ونصف هؤلاء المرضى يحملون أيضاً مُرَاتِبَة لطليعة المورثة الورمية المضادة للاستماتة BCL2 و/أو التسلسل الكابح repressor لها BCL6. ويتم كشف هذه الاضطرابات المورثية باستخدام تقانة التهجين المتألق في الموضع خلال الطور البيني (FISH) interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) أو تقانات الوراثة الخلوية المعيارية standard cytogenetics. وتكون هذه الأورام أكثر عدائية واسوأ انذاراً، ويسمى هذا النمط الفرعي باسم لمفوما الضربة المزدوجة أو الثلاثية (الشكل 6)، وصنفتها النسخة الخامسة من تصنيف WHO باسم لمفوما الخلية البائية عالية الدرجة مع مُرَاتِبَات MYC و BCL2 (الجدول 1) (Cutmore et al., 2023; W. Li, 2022; Liu & Barta, 2019; Song et al., 2022; Susanibar-Adaniya & Barta, 2021).

يمكن أن يُصاب مرضى DLBCL أيضاً بما يسمى لمفوما التعبير المزدوج double expresser lymphoma (DEL) (الشكل 6) والتي تتميز بفرط التعبير عن طليعة المورثة الورمية MYC والمورثة BCL2، ويمكن كشف هذين الشذوذين بتقانة IHC. تشكل هذه الحالات نحو ثلث حالات DLBCL حديثة التشخيص، وهي متوسطة الإنذار، ويمكن كشفها أيضاً في 50% من حالات DLBCL الناكسة. والملاحظ هو أن الأنماط الفرعية مزدوجة الضربة أو ثلاثية الضربة تكثر في GCB، في حين تكثر DEL في نمط ABC. وهذه

الملاحظات جميعها تسلط الضوء على ضرورة الاستخدام الروتيني لدراسات IHC و FISH عند التشخيص، وكذلك يُفضل استخدامها عند النكس (Cutmore et al., 2023; Susanibar-Adaniya & Barta, 2021).

2.3.2 (ج) الأنماط الفرعية المورثية

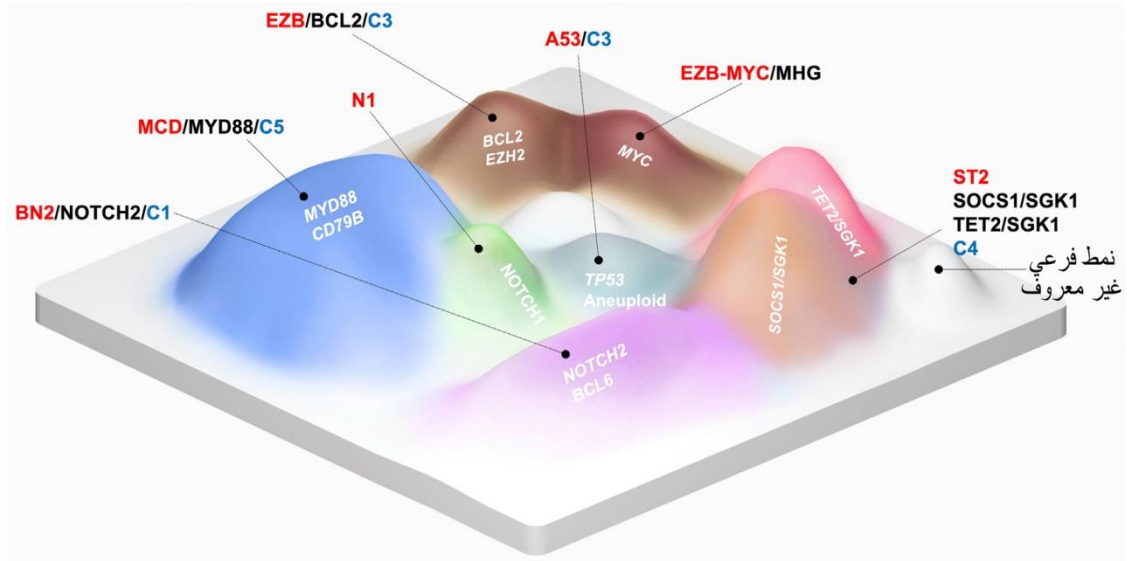
يعرضُ الجدول 2 والشكل 7 نتائج ثلاث دراسات حديثة كبيرة توصلت، وبشكل مستقل، إلى تصنيفات فرعية مورثية شديدة التشابه لحالات DLBCL استناداً إلى الطفرات التي يحملها المرضى المشمولين بها. وهذه الدراسات هي دراسة جامعة هارفرد (Chapuy et al., 2018)، ودراسة معهد السرطان الوطني National Cancer Institute (NCI) في الولايات المتحدة (Schmitz et al., 2018)، وشبكة بحوث الخباثات الدموية Haematological Malignancy Research Network (HMRN) في المملكة المتحدة (Lacy et al., 2020). خضعت طريقة التصنيف الأولى والثالثة للمزيد من التعديلات في حين طُرحت الثانية على الشبكة كأداة مفتوحة المصدر باسم LymphGen، وهي متاحة للاستخدام العمومي (Cutmore et al., 2023; Runge et al., 2021).

سيسمح هذا التصنيف المورثي بتقسيم DLBCL إلى مجموعات فرعية متميزة بيولوجياً وإمراضياً، ولكن المعلومات عن الإنذار والاستجابة للعلاج تحتاج لمزيد من الدراسة (Cutmore et al., 2023).

الجدول 2: نظرة عامة على أنماط DLBCL الفرعية المورثية. مقارنة بين الأنماط الفرعية المتكافئة حسب تسميات الدراسات الثلاث الأحدث LymphGen (معهد السرطان الوطني) و HMRN (شبكة بحوث الخباثات الدموية) المعدلة وهارفرد (Cutmore et al., 2023).

نوع اللمفوما	الحصيلة السريرية	COO	أهم التبدلات المورثية	هارفرد	HMRN المعدلة	LymphGen
لمفوما الجملة العصبية الأولية، لمفوما الخصية الأولية	سيئة	ABC	MYD88 ^{L265P} , CD79B, PIM1, ETV6, CDKN2A	C5	MYD88	MCD
لمفوما جريبية	جيدة	GCB	BCL2-R, EZH2, CREBBP, KMT2D, TNFRSF14	C3	BCL2	EZB
لمفوما الضربة المزدوجة	سيئة				BCL2-MYC	EZB-MYC+
لمفوما المنطقة الهامشية	متوسطة	ABC, GCB, UC	BCL6-R, NOTCH2, BCL10, SPEN, CD70, TNFAIP3	C1	NOTCH2	BN2
لمفوما هودجكن مع غلبة اللمفاويات العنقية	جيدة	GCB	TET2, SGK1, KLHL6, BRAF	C4	TET2/SGK1	ST2
لمفوما بائية منصفية أولية	جيدة جداً	GCB	SOCS1, SGK1, CD83, NFKB1A, NFKB1E, STAT3		SOCS1/SGK1	
				C0	NEC	Other
ابيضاض لمفاوي مزمن	سيئة	ABC	NOTCH1, ID3	NA	NOTCH1	N1
	متوسطة	Mixed	TP53, aneuploidy	C2	NA	A53

ABC: النمط الشبيه بالخلية البائية المُفعَّلة؛ BCL2-R مُرتابة المورثة BCL2؛ BCL6-R مُرتابة المورثة BCL6؛ COO: خلية المنشأ؛ GCB: لمفوما خلايا المركز المنتش البائية؛ NA: غير قابل للتطبيق؛ UC: غير مُصنفة.



الشكل 7: مخطط طوبوغرافي لأنماط DLBCL الفرعية الجزيئية يمثل تمثيلاً مفاهيمياً لتصنيف المورثي لها. تُصوّر التلال الملونة الأنماط الفرعية المورثية المعروفة. وقد تمت الإشارة إلى الطفرات الأكثر وجوداً في كل نمط فرعي باللون الأبيض؛ وتمت تسمية كل نمط فرعي وفق LymphGen (بالأحمر) و HMRN (بالأسود) وهارفرد (بالأزرق). ورغم تسمية المرضى المتمركزين على قمة "التلال" الملونة بشكل متكرر من خلال كل نظام تصنيف، إلا أن المرضى الموجودين في "الوديان" قد يكونون غير مصنّفين أو يتم تصنيفهم بأنظمة تصنيف مختلفة. تتوافق التلال غير الملونة مع أنماط فرعية غير معروفة من DLBCL، والتي قد تظهر في المستقبل من الحالات غير المصنفة حالياً (Cutmore et al., 2023).

2. 4 المظهر السريري

يأتي المرضى عادةً بكتلة عرضية وحيدة (أو أكثر) تكبر بسرعة، وغالباً ما يحدث التضخم العقدي في الرقبة والبطن، أو في المنصف في حالة لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنصفية الأولية. وقد توجد الكتلة في أي مكان آخر في الجسم؛ وقد تحدث الإصابات خارج العقدية في نحو 40% من حالات المرضى الذين يأتون أول مرة وهم في المرحلة الأولى أو الثانية من المرض. ويتظاهر المرض في نحو 60% من المرضى في المرحلة الثالثة أو الرابعة (Armitage & Weisenburger, 1998; Freedman, Aster, et al., 2023; Hui et al., 2010).

تحدث الإصابات خارج العقدية وتظاهراتها في أي مكان من الجسم، وأكثرها شيوعاً هي التظاهرات الهضمية (12% من الحالات)، وخصوصاً المعدة، وتشمل المناطق الأخرى النسيج الرخوة (4.5%) والجهاز العصبي المركزي (2.5%) والكبد (2%) والعظم (2%) والجلد والثدي والكلية والخصيتين والمبيضين والدرق ونقي

العظم والبروستات والرحم والتامور (Armitage & Weisenburger, 1998; Freedman, Aster, et al., 2023;)
 (López-Guillermo et al., 2005; Møller, Pedersen, & Christensen, 2004; Sukswai et al., 2020).
 وتشمل الأعراض المستعلنة presenting symptoms كلاً من الأعراض B (الحمى والتعرق الليلي وفقدان الوزن) التي تظهر عند 30% من المرضى، والأعراض المتعلقة بالكتلة متسارعة النمو ومكان توضعها مثل فرط كالسيوم الدم غير المفسر والتهاب الكبد والكلية (إصابة الكلية) أو فقر الدم ونقص الكريات البيض (إصابة نقي العظم) أو حالات إسعافية مثل انضغاط النخاع الشوكي أو متلازمة الوريد الأجوف العلوي أو انسداد هوائي حاد أو إصابات كتلية في الجملة العصبية المركزية أو قصور كلوي أو كبدي (Freedman, Aster, et al., 2023;)
 (Kumar et al., 2018; Møller et al., 2004; Paquin et al., 2023).

2. 5 التشخيص

يجب أن يُجرى الفحص التشخيصي لحالات DLBCL في مخبر تشريح مرضي للدمويات بوجود اختصاصي تشريح مرضي خبير بأورام الدم ومتخصص في تفسير التغيرات الشكلية، ويتم خلاله إجراء كافة التحريات الشكلية والجزيئية. وما تزال تمثل الخزعة الجراحية الاستئصالية surgical excision biopsy المقياس الذهبي لتشخيص اللمفوما، فهي تتيح المجال لتقييم البنية الهندسية للعقدة اللمفاوية وتأمين كمية مناسبة من مادة العقدة للدراسات الشكلية والجزيئية أكثر مما تتيحه خزعة العقدة بالإبرة والموجهة بالتنظير واللتين لا يوصى بهما إلا للمرضى الذين لا يكون الإجراء الجراحي عندهم ممكناً أو ينضوي على مخاطر كبيرة. وخزعة الإبرة الدقيقة Fine needle Aspiration (FNA) غير مناسبة للتشخيص المبدئي رغم أنها قد تكون كافية لتشخيص حالات النكس (Paquin et al., 2015; Tilly et al., 2023).

2. 5. 1 الدراسة المبدئية

تتضمن الدراسة المبدئية فحصاً سريرياً شاملاً مع انتباه خاص لمناطق العقد اللمفاوية ذات الصلة وحجم الكبد والطحال، وتقييم حالة الأداء (PS)، والأعراض B (الحمى والتعرق الليلي وفقدان الوزن والوهن)، وتحديد المواقع الملائمة للخزعة (Paquin et al., 2023).

أما التقييم المخبري فيتضمن اختبارات رئيسة (الجدول 3) أهمها تعداد الدم الكامل CBC والتفريقي والبروفيل الاستقلابي الشامل ونازعة هيدروجين اللاكتات (LDH) lactate dehydrogenase المصلية (ترتفع في نحو 50% من المرضى (Freedman, Aster, et al., 2023; Møller et al., 2004)) وفحوصاً إضافية كحمض البول والفوسفور عند المرضى ذوي الحمل الورمي العالي، والغلوبولين الميكروي بيتا₂ (β2-Microglobulin (B2MIC)، واختبار الحمل للمريضات في سن الإنجاب. ومن المفضل إجراء فحص التهاب الكبد B و C عند المرضى الذين

الجدول 3: الفحوص المخبرية في حالة الاشتباه بالمفوما (Paquin et al., 2023).

الفحص	التبرير	الشذوذات الموحية بالمفوما	النتائج التحذيرية
تعداد الدم الكامل CBC	التأكد من سواء الخطوط الخلوية الدموية الثلاثة، وتقييم الشذوذات التي توحى بإصابة نقي العظم	فقر الدم، قلة الصفيحات thrombocytopenia، قلة/كثرة الكريات البيض	قلة العدلات، أو تعداد البيض أكبر من 100 ألف، أو فقر دم وخيم، أو قلة الصفيحات
البروفيل الاستقلابي الشامل	تقييم وجود اضطراب وظيفة كبدية أو كلوية يوحى بكتلة ضاغطة أو ارتشاح ورمي	إصابة كلوية حادة، اضطراب الكهارل، نماذج إصابة كبدية أو ركودة صفراوية	شذوذات كهربية مهمة أو بيئة على إصابة مهمة في أحد الأعضاء
الفوسفور	تقييم البيئة على وجود تحلل الورم (قد يكون الفوسفور سوباً بعد التحلل التلقائي، ولكنه يرتفع في التحلل التالي للعلاج الكيميائي)	تحلل الورم*	ارتفاع فسفات المصل لأكثر من 4.5 ملغ/دل عند البالغين أو زيادة أكثر من 25% عن خط الأساس (مع المؤشرات الأخرى*)
نازعة هيدروجين اللاكتات	تقييم البيئة على وجود تقلب turnover خلوي سريع قد يكون مصحوباً بتحلل الورم	ارتفاع مستواها	مع المؤشرات الأخرى*
حمض البول	لاستبعاد متلازمة تحلل الورم	لا يوجد ارتباط واضح خارج متلازمة تحلل الورم	فرط حمض بول الدم مع ارتفاعه لأكثر من 8 ملغ/دل أو زيادة أكثر من 25% عن خط الأساس (مع المؤشرات الأخرى*)

* تتضمن مؤشرات تحلل الورم ارتفاع المستويات المصلية لكل من الفسفات وLDH وحمض البول والبوتاسيوم، مع إصابة كلوية حادة أو دونها.

يمكن أن يتطلبوا العلاج بالريتوكسيماب Rituximab. ويوصى بإجراء التصوير المقطعي بالانبعاث البوزيتروني / التصوير المقطعي المحوسب PET-CT لتحديد مرحلة الورم لأنها تحدد نوع العلاج، وهو أيضاً ضروري لتقييم الاستجابة عند إجراء PET-CT بعد العلاج (Kumar et al., 2018; NCCN, 2023; Paquin et al., 2023).

ومن الضروري أحياناً إجراء البزل القطني لكشف إصابة الجملة العصبية المركزية وخزعة نقي العظم لكشف إصابته (NCCN, 2023). وقد أظهرت مراجعة منهجية مع تحليل تلوي أجراه Adams وزملاؤه أن حساسية فحص PET/CT لكشف إصابة نقي العظام تتراوح بين 70.8% و 95.8% ونوعيته بين 99.0% و 100%. وكانت نتائج PET سلبية عند نحو 3.1% من المرضى أثبتت خزعة نقي العظم إصابته عندهم. وبالمقابل، فقد كانت خزعة نقي العظم سلبية عند 12.5% من المرضى الذين كُشفت إصابة نقي العظم لديهم باستعمال PET و PET/CT (Adams et al., 2014). وأظهرت دراسة أخرى أن إصابة نقي العظام كانت 3.6% من 192 من مرضى DLBCL في المرحلة الأولى والثانية (S. Lim, Tao, Cheung, Rajan, & Mann, 2005).

2.5. 2 التشخيص المناعي والتنميط المناعي

يجب تأكيد تشخيص DLBCL المورفولوجي في الحالات كلها باستقصاءات النمط الظاهري المناعي immunophenotypic investigations بتقانة IHC أو تعداد الكريات الانسيابي flow cytometry أو كليهما. والمثالي هو أن يتم إرسال الخزعة دون تثبيت إلى المختبر حتى يتم إجراء الدراسات الخلوية واستخلاص الدنا DNA والرنا RNA بجودة عالية (Tilly et al., 2015). وتذكر دلائل 2023 الإرشادية للشبكة الوطنية الشاملة للسرطان NCCN وجوب إجراء التنميط الظاهري المناعي الكافي لإثبات التشخيص وتحديد خلية المنشأ (GCB أم non-GCB)، وإجراء النمط الصبغي karyotype أو FISH للكشف عن مُرَاتَبَات المورثة MYC، فإن كانت إيجابية يتوجب البحث عن مُرَاتَبَات BCL2 و BCL6 لتحديد النمط المورثي (NCCN, 2023).

والنمط الظاهري المناعي Immunophenotype أساسي للتفريق بين أنماط DLBC المناعية المختلفة.

ويمكن أن يطبق تعداد الكريات الانسيابي لتحديد مدى إصابة نقي العظم عندما يكون PET/CT غير متوافر بسهولة لتحديد مرحلة الورم وتحديد مدى إصابة الأورام إيجابية CD5 (أي، CD5+) حيث تتوافق مع لمفوما أكثر

عدوانية ونسبة إصابة عالية للجهاز العصبي المركزي وإنذار أسوأ. وتحدد درجة إصابة الجهاز العصبي المركزي بتعداد الكريات الانسيابي للسائل النخاعي الشوكي (Alvarez et al., 2011). و عادةً ما تتوافق موجودات النمط الظاهري المناعي مع الموجودات الشكلية للوصول إلى التشخيص. وعموماً يجب أن يتضمن تشخيص DLBCL كلاً من (1) IHC لكشف CD20 و CD3 و CD5 و CD10 و CD21 و CD45 و BCL2 و BCL6 و Ki67 و IRF4/MUM1 و MYC؛ مع أو دون ما يظهره (2) تعداد الكريات الانسيابي لخلايا الدم المحيطي و/أو الخزعة من واصمات سطح خلوية تتضمن CD45 و CD3 و CD5 و CD19 و CD10 و CD20، ويتضمن النمط الظاهري المناعي النموذجي في DLBCL إيجابية CD20 و CD45 وسلبية CD3، ويتم استخدام الواصمات الأخرى للوصول إلى التصنيف الفرعي حيث تشير مستضدات CD10+ و BCL6+ إلى لمفوما GCB بينما يشير المستضد MUM1+ إلى لمفوما ABC (NCCN, 2023).

والأنواع الثلاثة الأكثر شيوعاً للإزفاء التبادلي في DLBCL هي BCL6 و BCL2 و MYC. والمورثة MYC هي المورثة الورمية المتورطة بأمراضه للمفوما العدوانية (NCCN, 2023)، ويعتبر الإزفاء الذي يشمل MYC حدثاً أولياً في نحو 5-15% من الحالات البدئية (Ott, Rosenwald, & Campo, 2013) ونحو 20% من حالات النكس الأولي للمرض (Cuccuini et al., 2012). والمورثة القرينة في DLBCL هي BCL-2 أو BCL-6 أو كليهما (المفوما الضربة المزدوجة أو الثلاثية) (NCCN, 2023; Susanibar-Adaniya & Barta, 2021). يمكن أن يتم فحص فرط التعبير عن البروتين MYC بتقنية IHC والتي يمكن أن تحدث بشكل مستقل عن الإزفاء التبادلي بنسبة 30% من الحالات. بينما يتطلب تأكيد الإزفاء النوعي استخدام تقانة التهجين FISH (Horn et al., 2013; NCCN, 2023).

2.5. 3 التشخيص التفريقي

ويتضمن مجاًلاً واسعاً من الأمراض التي تسبب اعتلال/تضخم العقد اللمفاوية مثل داء وحيدات النوى الخمجي وبعض اللمفومات الأخرى [لمفوما الخلايا الكبيرة الكَشَمِيَّة (اللامتمايزة) anaplastic و لمفوما المنطقة الرمادية و لمفوما بوركيت و هودجكن] والكارسينوما والميلانوما (Freedman, Aster, et al., 2023; Kumar et al., 2018).

2. 6 تحديد مرحلة الورم

كان نظام تحديد مرحلة الورم tumor staging المسمى نظام آن آربر Ann Arbor يستهدف تحديد مرحلة stage الورم عند مرضى HL، لكنه اعتُمد لاحقاً ليتم تطبيقه على مرضى لمفوما لا هودجكن (الجدول 4) حيث يصنف المرضى بين المرحلة I (ورم محدود موضع) والمرحلة IV (المنتشر) (Lister et al., 1989). كما يصنف هؤلاء المرضى إلى صنفين: A أو B بالاعتماد على غياب (A) أو وجود (B) أعراض B الجهازية، على الترتيب. والأعراض B تتضمن بشكل أساسي الحرارة والتعرق الليلي المفرط وخسارة الوزن بنحو 10% أو أكثر خلال 6 أشهر من تشخيص المرض. ولأن HL تصيب المواقع المتجاورة، بينما DLBCL تصيب مواقع غير متجاورة، فقد

الجدول 4: نظام تحديد مرحلة الورم المنقح للمفومات العقدية الأولية (B. D. Cheson et al., 2014; Kumar et al., 2018; NCCN, 2023).

مرحلة الورم	الإصابة العقدية*	الحالة خارج العقدية (E)
ورم محدود		
I	عقدة لمفاوية وحيدة أو مجموعة عقد متجاورة	إصابة خارج عقدية وحيدة دون وجود إصابة عقدية
II	مجموعتان عقديتان أو أكثر في جهة واحدة من الحجاب الحاجز	مرحلة I أو II وفق الإصابة العقدية مع امتداد محدود مجاور خارج عقدي
II كتلي**	نفس II مع مرض كتلي "ضخم"	غير قابلة للتطبيق
ورم متقدم		
III	عقد لمفاوية على جانبي الحجاب الحاجز أو عقد لمفاوية فوق الحجاب الحاجز مع إصابة طحالية	غير قابلة للتطبيق
IV	شمول خارج عقدي إضافي غير متجاور	غير قابلة للتطبيق

* يتم تحديد انتشار المرض في DLBCL بواسطة PET-CT أو CECT (التصوير المقطعي المحوسب الظليل Contrast-enhanced computed tomograph) إذا كان PET-CT غير متوافر. وتُعتبر اللوزتان وحلقة فالدير والطحال نسج عقدية.

** يتم اتخاذ القرار بعلاج مرض المرحلة II الكتلي كمرض محدود أو متقدم وفق الفحص النسيجي والمؤشر الإنذاري العالمي (IPI) international prognostic index.

اعتبر استخدام تصنيف آن آر بور محدود الأهمية في الأخيرة (Kumar et al., 2018). واستناداً إلى ما تم الإجماع عليه من توصيات حول التصنيف المرحلي للمفوما وإعادة التصنيف المطور من قبل مجموعات العمل السريرية والتصويرية الشعاعية للمؤتمر العالمي للمفومات الخبيثة في لوغانو/سويسرا في العام 2014، تم اعتماد تصنيف لوغانو Lugano classification (الجدول 4) الذي دمج مرضى المرحلتين I و II في مجموعة واحدة توصف بمحدودية المرض، بينما يوضع مرضى المرحلتين III و IV حسب تصنيف آن آر بور في مجموعة واحدة (المرض المتقدم)؛ ويقتصر الآن استخدام اللاحقة A و B على مرضى HL فقط (B. D.). ويتم تسجيل أكبر قطر عقدة لمفاوية (أو كتلة) تظهر بتصوير CT، ويعتبر المرض كتلياً (ضخماً) bulky disease، وفق NCCN، إذا كانت العقد اللمفاوية بقطر 7.5 سم فأكثر رغم أن بعض الدراسات تستخدم الرقم 10 سم (NCCN, 2023; Sehn & Salles, 2021).

2.7 تحديد الإنذار

إن قيمة تحديد مرحلة الورم في معرفة الإنذار prognosis محدودة بسبب عدم تجانس المرض وتنوعه. وقد تم تطوير عدة نماذج للجمع الكامل للمعلومات الإنذارية والتنبؤ بالبقاء survival، ومنها المؤشر الإنذاري العالمي international prognostic index (IPI) وتعديلاته (الجدول 5). ويجب استخدام تحديد مرحلة الورم عموماً مع هذه النماذج الإنذارية للحصول على معلومات مضبوطة (Kumar et al., 2018).

2.7.1 المؤشر الإنذاري العالمي وتعديلاته

كانت الغاية من وضع المؤشر الإنذاري العالمي الأصلي IPI تحديد المتغيرات التي تسمح بالتنبؤ بالبقاء الإجمالية Overall Survival (OS) والبقاء دون ترقى المرض Progression Free Survival (PFS). وقد شملت هذه المتغيرات كلاً من مرحلة الورم (III أو IV) وزيادة نشاط LDH في المصل وحالة الأداء (≤ 2) والعمر (< 60 سنة) وإصابة أكثر من موقع (الجدول 5). تُعطى نقطة واحدة لكل من المُحدّات (المعايير) السابقة ليتراوح المجموع (الحرز score) بين الصفر و5. ينقص المعدل المتوقع للبقاء لخمس سنوات كلما زاد الحرز حيث يبلغ 73% للحرز 0-1 و51% للحرز 2 و43% للحرز 3 و26% للحرز 4-5 (Kumar et al., 2018; Shipp, 1993).

بقيت نتائج IPI معتمدة حتى حقبة تطبيق الريتوكسيماب، ثم خضعت لإعادة تقييمها عند مرضى DLBCL المعالجين بنظام R-CHOP في دراسة بريطانية شملت من هم دون الستين من العمر. قامت الدراسة بإزالة العمر كأحد المحددات وإعادة توزيع أحرار IPI الى أحرار IPI المُنقَّح (الجدول 5) التي صنفت المجموعات الإنذارية إلى ثلاث: إنذار جيد جداً (الحرز 0) وجيد (الحرز 1-2) وسيء (الحرز: 3) (Sehn & Gascoyne, 2015; Sehn & Salles, 2021).

أدخلت الشبكة الوطنية الشاملة للسرطان NCCN معلومات مفصلة عن المتغيرات في IPI الأصلية، وقد استخدم فيها موقع الإصابات خارج العقدية وليس عددها لأن المؤشر التنبؤي الإنذاري للإصابة للمفاوية في الأعضاء الرئيسة (نقي العظام أو الجهاز العصبي المركزي أو الكبد/الجهاز الهضمي أو الرئة) أكثر سوءاً. كما استخدم هذا النظام نسبة LDH المصلية وفُصل في المراحل العمرية. ويصنف هذا النظام (NCCN-IPI) المرضى الى أربع مجموعات اختطار (الجدول 5): اختطار منخفض (0-1 نقطة)، ومتوسط منخفض (2-3 نقاط)، ومتوسط مرتفع (4-5 نقاط) ومرتفع (6 نقاط فأكثر) (Kumar et al., 2018; Zhou et al., 2014).

الجدول 5: المؤشر الإنذاري العالمي الأصلي وتعديلاته (Kumar et al., 2018; NCCN, 2023).

IPI الأصلي (نقطة لكل محدد)	IPI المُنقَّح (نقطة لكل محدد)*	NCCN-IPI
المرحلة III أو IV	المرحلة III أو IV	المرحلة III أو IV (نقطة واحدة)
ارتفاع LDH المصل	ارتفاع LDH المصل	نسبة LDH* بين 1 و3 (نقطة واحدة)
حالة الأداء من 2 إلى 4	حالة الأداء من 2 إلى 4	نسبة LDH أكبر من 3 (نقطتان)
العمر < 60 سنة	العمر 41-60 سنة (نقطة واحدة)	حالة الأداء 2 فأكثر (نقطتان)
	العمر 61-75 (نقطتان)	
	العمر أكبر من 75 (3 نقاط)	
أكثر من موقع خارج عقدي	مواقع خارج عقدية تشمل النقي أو الجملة العصبية المركزية أو الكبد/الجهاز الهضمي أو الرئة (نقطة واحدة)	
اختطار منخفض (0-1)	جيد جداً (0)	اختطار منخفض (0-1)
اختطار متوسط منخفض (2)	جيد (1)	اختطار متوسط منخفض (2-3)
اختطار متوسط مرتفع (3)	جيد (2)	اختطار متوسط مرتفع (4-5)
اختطار مرتفع (4-5)	سيء (3-5)	اختطار مرتفع (6 فأكثر)

* لمن هم دون الستين من العمر

** هي نسبة مستوى LDH عند المريض إلى الحد الأعلى للمجال المرجعي للمخبر.
(NCCN: الشبكة الوطنية الشاملة للسرطان؛ IPI: المؤشر الإنذاري العالمي)

يبقى IPI الأداة السريرية الأولية للتنبؤ بالحصائل وفرز المرضى في طبقات في التجارب السريرية. ورغم أن IPI المُنقَّح وNCCN-IPI يقدمان تنبؤاً أكثر دقة بالإنذار السريري، ويوصى باستخدام أي منهما روتينياً بغية فهم أفضل لإنذار المرض عند المصابين لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة (Freedman, Aster, et al., 2023; Zhou et al., 2014; Susanibar-Adaniya & Barta, 2021; Sehni & Salles, 2021; Kumar et al., 2018)، يحتل NCCN-IPI المركز الأول في قدرته على التمييز بين المرضى عاليي الخطر (الجدول 6).

ومع ذلك لا يمكن استخدام هذه المناسب indexes السريرية لاستعراف حالات الخطر شديد الارتفاع أو تمييز التغيرات البيولوجية biologic heterogeneity، ولم تُدمج بعد في منسب إنذاري تحققت مصدوقيته validated، لأنه ثبت ارتباط الكثير من العوامل البيولوجية الأخرى مع الحصيلة النهائية مثل التصنيف الجزيئي والكيميائي المناعي النسيجي لخلية المنشأ وجود الضربة المزدوجة/الثلاثية والتعبير عن بروتين MYC وBCL2 وتعداد اللمفاويات ونسبتها إلى الوحيدات ومنسب التكاثر وعوامل أخرى (Sehni & Salles, 2021).

الجدول 6: المناسب السريرية للتنبؤ بحصائل مرضى لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة (Sehni & Salles, 2021).

فئة الخطر	نسبة المرضى (%)	البقاء دون ترقى المرض (%) PES	البقاء الإجمالية (5 سنوات) OS (%)
IPI الأصلي			
خطر منخفض (0-1)	34	81	88
خطر متوسط منخفض (2)	23	67	76
خطر متوسط مرتفع (3)	23	58	67
خطر مرتفع (4-5)	20	46	54
IPI المُنقَّح			
جيد جداً (0)	8	87	93
جيد (1-2)	48	74	81
سيء (3-5)	43	53	61
NCCN-IPI			
خطر منخفض (0-1)	13	86	92
خطر متوسط منخفض (2-3)	41	75	84
خطر متوسط مرتفع (4-5)	36	54	63
خطر مرتفع (6 فأكثر)	10	43	49

2. 7. 2 مكوّنات (مُحدّدات) المؤشر الإنذاري العالمي وتعديلاته

2. 7. 2. (أ) تقييم حالة الأداء

تقييم حالة الأداء PS عند مرضى السرطان جزء مهم في تحديد إنذار الورم ورعاية مريض السرطان عموماً وتحديد الطريقة الأمثل لمعالجته. وهو عبارة عن نظام أحرار scores يقدر قابلية المريض لأداء نشاطات معينة في الحياة اليومية دون مساعدة الآخرين. وتتضمن هذه النشاطات الأفعال الحياتية اليومية الأساسية (مثل ارتداء الملابس وتناول الطعام والاستحمام) بالإضافة إلى نشاطات أكثر تعقيداً مثل تنظيف المنزل والقيام بعمل منتظم ما. وغالباً ما يتم تضمين قياس حالة الأداء في التقييم السريري للمرضى ومعايير الأهلية للدخول في التجارب السريرية والدلائل الإرشادية لتوصيات المعالجة القياسية. وأكثر مقاييس حالة الأداء استخداماً هو مقياس زوبرود Zubrod، ويسمى أيضاً مقياس ECOG (مجموعة علم الأورام التعاونية الشرقية Eastern Cooperative Oncology Group)، ويتراوح الحز فيه بين 0 و4 كما يلي (West & Jin, 2015):

الحز 0: مريض لا عرضي وبكامل الفاعلية وظيفياً (نشاط سوي)

الحز 1: مريض عرضي قادر على السير ambulatory؛ ويعتني بنفسه

الحز 2: قادر على السير أكثر من 50% من الأوقات ويحتاج إلى مساعدة أحياناً

الحز 3: قادر على السير 50% من الأوقات أو أقل ويحتاج إلى خدمة تمريضية

الحز 4: ملتزم بالفرش Bedridden.

2. 7. 2. (ب) المستويات المصلية لنازعة هيدروجين اللاكتات

ترتفع مستويات نازعة هيدروجين اللاكتات LDH المصلية في نحو 50% من مرضى DLBCL عادةً (Freedman, Aster, et al., 2023; Møller et al., 2004)، ويدخل تركيزها (أو نسبتها التي تعادل تركيزها المصلي مقسوماً على الحد الأعلى للمجال المرجعي في المختبر) في المحددات المتضمنة في أنظمة تحديد الإنذار (الجدول 5) مما قد يجعله يلعب دوراً أيضاً في مراقبة الاستجابة العلاجية والنكس. ورغم أهمية LDH الإنذارية، فهي ليست نوعية لتشخيص نوع السرطان (Yadav et al., 2016)، وتتفق الدراسات على أنها ليست واصماً نوعياً للمتابعة ولا يشكل ارتفاع مستوياتها المصلية عند مرضى اللمفوما اللاعرضيين عادةً مؤشراً على النكس الثانوي

رغم أنه يزيد القلق عند المريض. ويمكن أن يقود ارتفاع LDH الكاذب إلى إجراءات غير ضرورية ومكلفة، وربما تكون مؤذية كالتعرض غير الضروري لأشعة التصوير إضافة إلى الأذية الكلوية الناجمة عن المادة الظليلة المستخدمة في التصوير الشعاعي في كل من PET والتصوير المقطعي المحوسب مع حقن المادة الظليلة (William et al., 2013).

2.7.2 (ج) المستويات المصلية للغلوبولين المكروي بيتا₂

الغلوبولين المكروي بيتا₂ (B2MIC) هو سلسلة خفيفة عديدة الببتيد تشكل جزءاً من مستضدات الصنف الأول من معقد التوافق النسيجي الرئيس. ورغم عدم الفهم الواضح لدوره كعامل إنذاري سلبي في الأمراض التكاثرية اللمفاوية (المفوما والورم النقوي myeloma)، فقد أظهرت العديد من الدراسات دوره كعامل انذاري في DLBCL قبل وبعد المعالجة بالروتكسيماب، ولكن لم يتم إدراجه بعد ضمن محددات الإنذار (Bento et al., 2020). تتوافق مستويات B2MIC المرتفعة عند مرضى لمفوما لا هودجكن مع زيادة في معدل الوفاة مقارنة مع المرضى ذوي القيم السوية منه (L. Wu et al., 2014)، وتنخفض هذه المستويات عند المرضى بشكل مهم بعد المعالجة فقط في حالة الهجوع وتتيح مراقبة مستوياته في تقييم حجم الكتلة الورمية بعد المعالجة (Gupta, 2017). وما تزال آليات الترافق بين B2MIC وإنذار لمفوما لا هودجكن غير معروفة بشكل كبير، ويعتقد أن معدل تقلب الجدار الخلوي للكريات البيضاء هو المصدر الرئيس لهذا الواسم في المصل لوجود كمية كبيرة منه على سطح كريات الدم البيضاء (L. Wu et al., 2014).

تعتبر كل من نازعة هيدروجين اللاكتات LDH و B2MIC واصمات ورمية مصلية serological tumor markers في الأورام اللمفاوية الخبيثة ولكن استخدامهما محدود في مراقبة المعالجة الكيميائية نظراً لانخفاض حساسيتهما و نوعيتهما (Parilova NK, 2016).

2.8. المعالجة

تتصح معظم الدلائل الإرشادية بالمعالجة الكيميائية لحالات DLBCL مع خيارات خاصة لإرفاقها بالعلاج الشعاعي و/أو المناعي. وهناك العديد من أنظمة العلاج المستخدمة أهمها نظام CHOP الذي غالباً ما يستخدم، وحده أو مع المعالجة الشعاعية الموضوعة، للحالات الموضوعة المحدودة (المرحلة I أو II). وتعتبر المعالجة المشتركة بدورة CHOP علاجية مختصرة متبوعة بمعالجة شعاعية هي المعالجة المعيارية في هذه المرحلة (Armitage, 2007).

تتصح الدلائل الإرشادية في المرحلة I أو II مع إصابة غير كتلية (أقل من 7.5 سم) باستخدام R-CHOP على 3 دورات (أشواط) علاجية ثم إعادة تحديد المرحلة باستخدام PET-CT؛ أما مع الإصابة الكتلية فتتصح الدلائل باستخدام R-CHOP على 6 دورات علاجية مع المعالجة الشعاعية أو دونها مع إعادة تحديد المرحلة باستخدام PET-CT بعد 2-4 دورات. ومن الثابت الآن أنّ إضافة الريتوكسيماب (R-CHOP) في علاج مرضى DLBCL لعب دوراً كبيراً في تحسين الحاصلات العلاجية (Freedman, Aster, et al., 2023; NCCN, 2023; Persky et al., 2008; Stegemann, Denker, & Schmitt, 2022; Vodicka, Klener, & Trneny, 2022).

يتظاهر نحو 60-70% من حالات DLBCL بأعراض لمفوما متقدمة منتشرة، وتتصح دلائل NCCN الإرشادية بتطبيق نظام R-CHOP كل 21 يوماً كعلاج مفضل لهذه المجموعة من المرضى حيث يُشفى نحو 60% منهم بهذه المقاربة (Coiffier et al., 2002). ويوصى بتطبيق 6 دورات علاجية من R-CHOP عند معظم المرضى مع إعادة تحديد المرحلة باستخدام PET-CT بعد 2-4 دورات. وهناك محاولة تم تجربتها لتكثيف العلاج بنظام R-CHOP لتصبح كل 14 يوماً (Cunningham et al., 2013; Kumar et al., 2018; J. Luo et al., 2022; Susanibar-Adaniya & Barta, 2021; NCCN, 2023; Sehn & Salles, 2021; Stegemann et al., 2022).

تختلف خيارات العلاج بعد إعادة تحديد المرحلة وفق الاستجابة العلاجية (NCCN, 2023):

أ) الورم محدود دون إصابة كتلية: يُكتفى بشوط علاجي رابع في الاستجابة التامة، وبإكمال المعالجة الكيميائية حتى 4-6 أشواط و/أو المعالجة الشعاعية في حالة الاستجابة الجزئية، وبإعادة الخزعة في حال ترقى المرض.

(ب) الورم محدود مع إصابة كتلية: متابعة الخطة العلاجية (4-6 أشواط) مع المعالجة الشعاعية البدئية للموقع المصاب في حال الاستجابة التامة، ومع جرعات شعاعية أعلى في حال الاستجابة الجزئية، وإعادة الخزعة في حال ترقى المرض.

(ج) الورم المتقدم: متابعة الخطة العلاجية (4-6 أشواط) في حال الاستجابة التامة أو الجزئية، وإعادة الخزعة في حال عدم الاستجابة أو ترقى المرض.

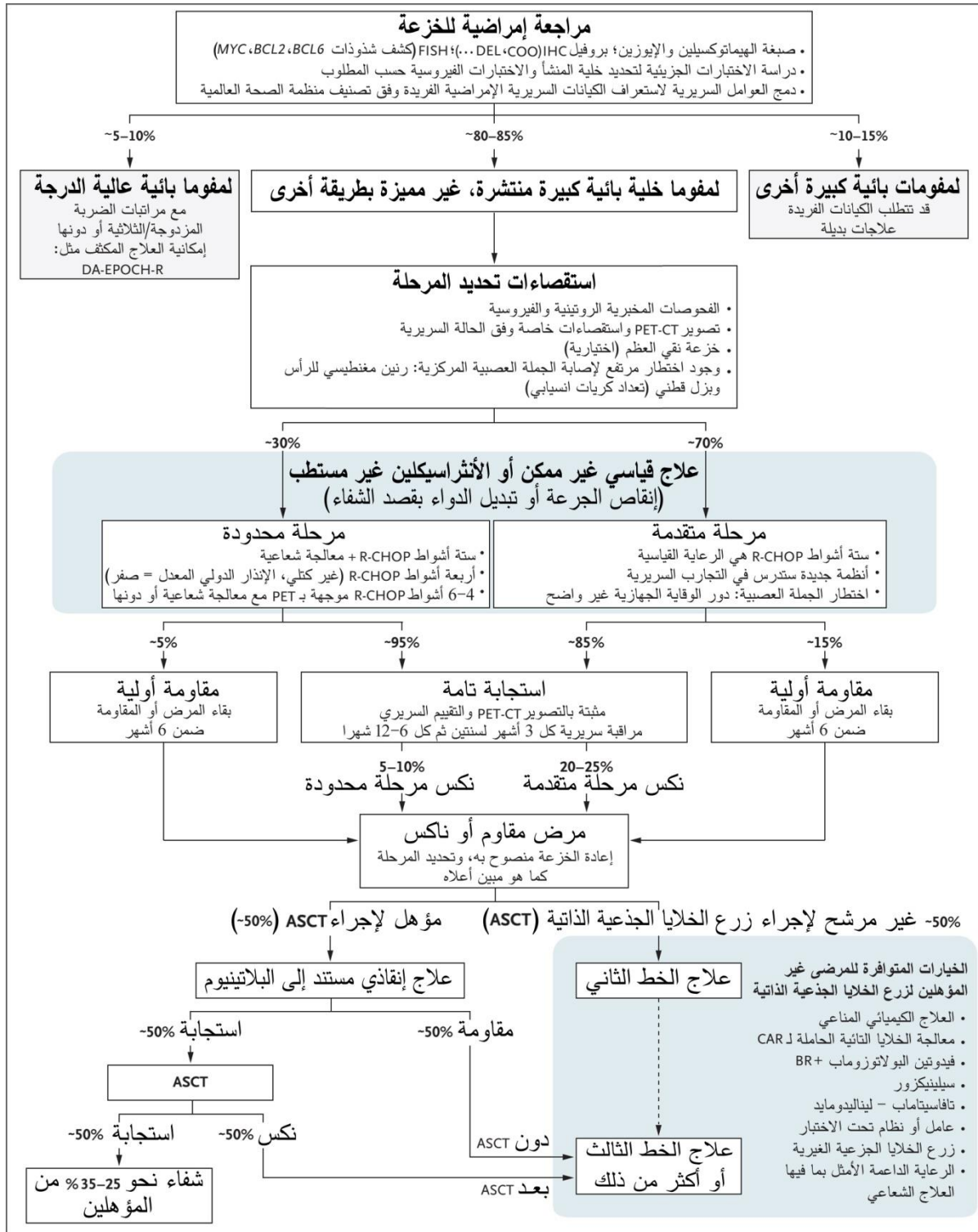
لقد أظهرت المعالجة بجرعة عالية من الخلايا الجذعية الذاتية (HDT/ASCR) تحسناً ملحوظاً في معدلات OS و PFS قبل تطبيق الريتوكسيماب (Haïoun et al., 2000; Haïoun et al., 2005)؛ ولكن حقبة الريتوكسيماب جعلت استطباب HDT/ASCR محدوداً بشكل كبير، وأظهرت العديد من الدراسات عدم وجود أية أهمية إحصائية للجوء إلى العلاج بزرع الخلايا الجذعية بعد أول هجوع عدا عند المرضى الذين يسجلون نقاطاً تدل على اختطار مرتفع (Vitolo et al., 2012; Vodicka et al., 2022).

ولا يعتبر المسنون مرشحون للمعالجة الهجومية لأسباب متعددة حيث لم تتم دراسة هذه المجموعة العمرية جيداً في الدراسات السريرية والتي تشكل الأساس للمعالجة المعيارية. ويشكل نقص العدلات neutropenia أكثر سمية علاجية متكررة مصادفة عند المسنين. ويمكن أن يساعد التقييم الشيوخوي الشامل في تحديد المرضى المناسبين للعلاج الكيميائي (Owusu & Berger, 2014).

يُذكر هنا أنّ المعالجة الداعمة Supportive care ضرورية لتخفيف الآثار الجانبية السمية للعلاج الكيميائي/المناعي. كما يجب توخي الرعاية خلال الشوط الأول من العلاج الكيميائي ويجب إعطاء المرضى جرعة وقائية من خافضات حمض البول allopurinol لمنع متلازمة تحلل الورم، وخاصة مع أنظمة العلاج شديدة الفاعلية المطبقة حالياً. كما يجب استقصاء وعلاج المرضى المصابين بالتهاب الكبد البائي بشكل ملائم إذا كان استعمال الريتوكسيماب مطروحاً (Kumar et al., 2018).

وتضع الدلائل الإرشادية العلاجية العديد من الأنظمة المتنوعة والخاصة بأشكال ومراحل وأنماط مختلفة من اللمفومات، ولكن لن يتم التطرق إلى تفصيلاتها لأنها خارج نطاق اهتمام هذه الدراسة.

يوضح المخطط التالي خيارات التدبير والعلاج والمتابعة عند مرضى DLBCL، والاختصارات غير الواردة سابقاً (Sehn & Salles, 2021).



ASCT: زرع الخلايا الجذعية الذاتية؛ BR: البنداموستين مع الريتوكسيماب؛ CAR: مستقبل المستضد الخيمري (المأشوب)؛ DA-EPOCH-R: نظام مضبوط الجرعة مكون من الريتوكسيماب والإيتوبوسايد والبريدنيزولون والفينكريستين والسيلكولوفسفاميد والدوكسوروبيسين.

2. 9 تقييم الاستجابة العلاجية

رغم بعض التباينات في نتائج الأبحاث، تتصح الدلائل الإرشادية الحالية باستخدام التصوير المقطعي المحوسب CT والمسح المقطعي للانبعاث (الإصدار) البوزيتروني PET scan (Positron emission tomography)، واختصاراً PET-CT، في مختلف مراحل تدبير مرضى اللفوما، بما في ذلك DLBCL، ابتداءً من التشخيص وتحديد مرحلة الورم، مروراً بتقييم الاستجابة العلاجية المرحلية (بعد 2-4 أشواط من المعالجة)، وخصوصاً في حقبة مشاركة الأدوية المناعية، وانتهاءً بتقييم الاستجابة العلاجية النهائية ومتابعة النكس في بعض الحالات (Al-Ibraheem et al., 2023; Kiamanesh et al., 2022; Kitajima et al., 2019; Kumar et al., 2018; NCCN, 2023; Salem et al., 2022; Stegemann et al., 2022; Susanibar-Adaniya & Barta, 2021; Vodicka et al., 2022; Yoo, 2022; Zanon et al., 2022; Zeman, Akin, Merryman, & Jacene, 2022; Zhang et al., 2022).

سيعرض الفصل القادم بعض التفصيل عن دور هذه التقانات التصويرية في تدبير DLBCL، وخصوصاً تقييم الاستجابة العلاجية المرحلي والنهائي.

2. 10 المتابعة

مرضى DLBCL الخالين من الأحداث المرضية بعد سنتين يتمتعون بمعدل بقيا إجمالي يماثل جمهرة السكان مع التأكيد على المراقبة النوعية للمرض عندهم خلال هذه الفترة الباكرا (Maurer et al., 2014). ويجب أن يتم إجراء الفحص البدني وأخذ القصة المرضية عند مرضى DLBCL كل 3 أشهر لمدة سنة ثم كل 6 أشهر لمدة سنتين، ثم سنوياً بعد ذلك مع النصح بالانتباه إلى تطور أية أورام ثانوية أو تأثيرات جانبية طويلة الأمد للمعالجة الكيميائية/المناعية. ويجب إجراء التقييم المخبري (تعداد الدم الكامل CBC وفحص البروفيل الاستقلابي LDH) بعد 3 و 6 و 12 و 24 شهراً، وعند اللزوم بعد ذلك (وفقاً لوجود علامات أو أعراض تشير الشبهة) (Guppy, 2015; Tebbutt, Norman, & Cunningham, 2003; Kumar et al., 2018; Maurer et al., 2014; Tilly et al., 2015).

وستتم مناقشة دور التصوير الشعاعي في المتابعة في الفصل القادم.

الفصل (3) تقييم استجابة لمفوما الخلية البائية الكبيرة للعلاج ومتابعتها

Assessment of therapeutic response and follow up

تختلف فوائد طرائق التصوير الشعاعية خلال تدبير DLBCL وغاياتها والبيانات عليها بين التوقيات التي تُستخدم فيها والتي تشمل التقييم الأولي قبل العلاج والتقييم المرحلي (بعد 2-4 أشواط من العلاج) وتقييم الاستجابة النهائية للعلاج والترصد والمتابعة (Al-Ibraheem et al., 2023; Froot et al., 2021; Kallam, Adusumalli, & Armitage, 2020; Kiamanesh et al., 2022; Kitajima et al., 2019; NCCN, 2023; Rutherford, 2019; Salem et al., 2022; Yoo, 2022; Zeman et al., 2022; Zhang et al., 2022).

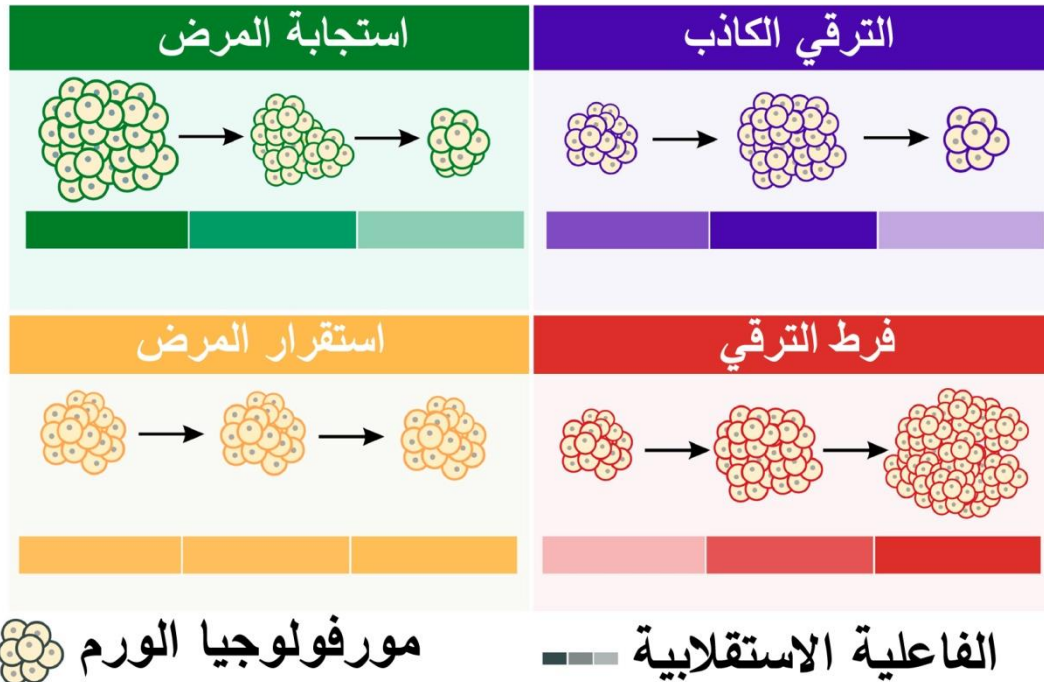
إنّ عدم وجود واصمات الحيوية biomarkers يمكن التعويل عليها reliable لقياس الاستجابة العلاجية للسرطان، وخصوصاً بعد إدخال المعالجة المناعية، جعل من تقانات التصوير الشعاعي ملاذاً لتحقيق هذه الغاية. وأصبحت معايير الاستجابة التي يقدمها FDG PET-CT (اختصار للتصوير المقطعي المحوسب CT مع التصوير المقطعي للإصدار البوزيتروني PET للأشعة غاما التي يصدرها الغلوكوز منقوص الأكسجين الموسوم بالفلوريد المشع 18F-fluorodeoxyglucose (FDG)) أكثر فائدة في هذا السياق. تستند هذه الفائدة إلى كون استهلاك الخلايا السرطانية للغلوكوز وحاجتها إليه أكبر بكثير من حاجة الخلايا السوية، وهذا ما يجعلها تقبّل الغلوكوز المشع بشراهة. ويمكن أن تستخدم طريقة التصوير الهجين هذه مثابنات استقلابية metabolic parameters مختلفة للتنبؤ بالاستجابة العلاجية وتقييمها. وفي الواقع، فإن FDG PET-CT هي طريقة التصوير الوحيدة القادرة على إظهار وتقييم الاستجابة العلاجية، وخصوصاً المناعية، وعلامات التنفيل المناعي (القبط الطحالي وما إلى ذلك)، والجوانب الاستقلابية للآثار الجانبية المرتبطة بالعلاج المناعي. وهذه التقانة مهمّة بالطبع للتفريق بين الآثار الجانبية للعلاج المناعي والاستجابة الفعلية للعلاج وحالات الترقّي الكاذب pseudoprogression والترقّي الفعليّ real progression وفرط الترقّي hyperprogression، مع ما لذلك من أهمية كبيرة في رعاية المريض وتدبير المرض (Al-Ibraheem et al., 2023; Prigent & Aide, 2020; Q. Wang, Gao, & Wu, 2018).

3. 1 نماذج الاستجابة العلاجية

رغم أنّ معظم المرضى يُظهرون استجابة بدئية جيدة للعلاج الكيميائي المناعي، فإنّ أنماط الاستجابة المرحلية والنهائية تختلف فيما بينهم (الشكل 8)، وقد تتضمن استجابات غير نموذجية تتمثل فيما يلي (Al-Ibraheem et al., 2023; Borcoman, Nandikolla, Long, Goel, & Le Tourneau, 2018; Lopci & Meignan, 2020):

3. 1. 1 الترقّي الكاذب

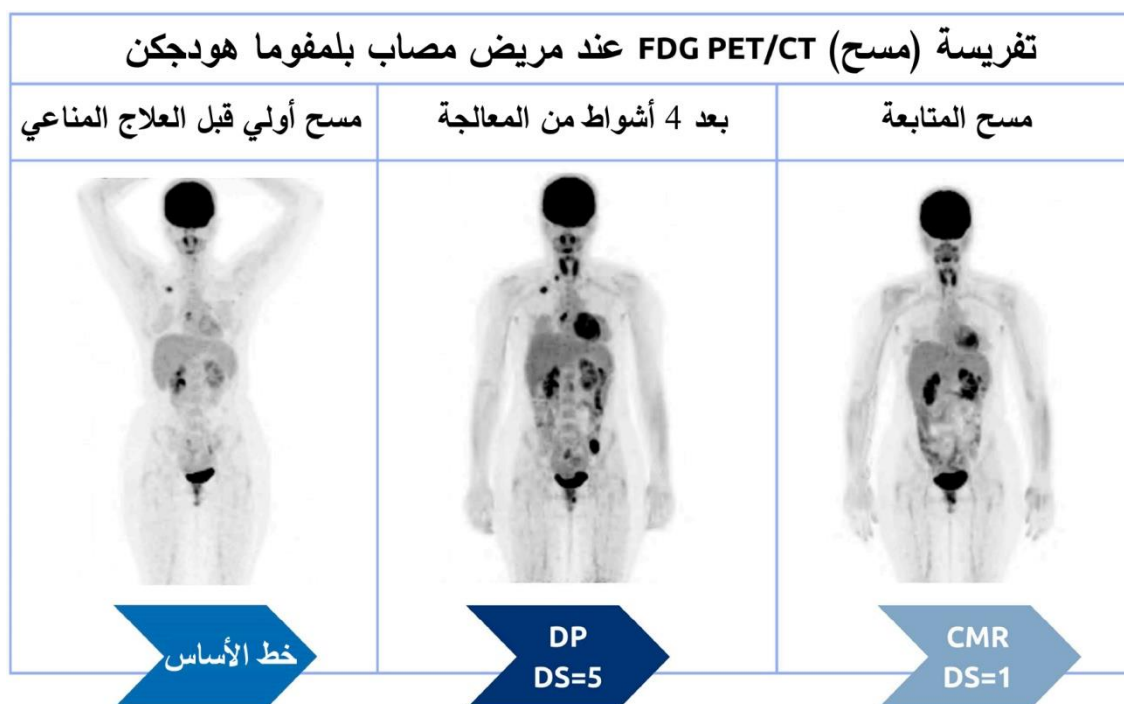
قد يبدو عند بعض المرضى أنهم يعانون في البداية من ترقّي المرض (المعروف باسم الترقّي الكاذب) قبل أن يحققوا في النهاية الصورة السريرية المناسبة. وقد تم الإبلاغ عن هذا النموذج الإيجابي الكاذب لأول مرة في 15% من المرضى الذين يتلقون مثبطات CTLA4 (البروتين الرابع المصاحب للخلايا للمفاوية التائية السامة للخلايا Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4) كعلاج للورم (Wolchok et al., 2009). والحاجة لتصحيح النتائج الإيجابية الأولية الخطأ تتطلب تنفيذ معايير الاستجابة (Hodi et al., 2016; Nishino et al., 2013). لقد لوحظ الترقّي الكاذب لأول مرة في الأورام الصلبة، ثم تم الإبلاغ عنه لاحقاً في اللmfومات، مما أدى



الشكل 8: عرض توضيحي رسومي لنماذج الاستجابة المختلفة بعد إعطاء المعالجة المناعية لمرضى اللmfومات (Al-Ibraheem et al., 2023).

إلى ارتباط إضافي في تقييم الاستجابة الموجه بالتصوير المقطعي بالإصدار البوزيتروني (Borcoman et al., 2018; Lopci & Meignan, 2020; Q. Wang et al., 2018).

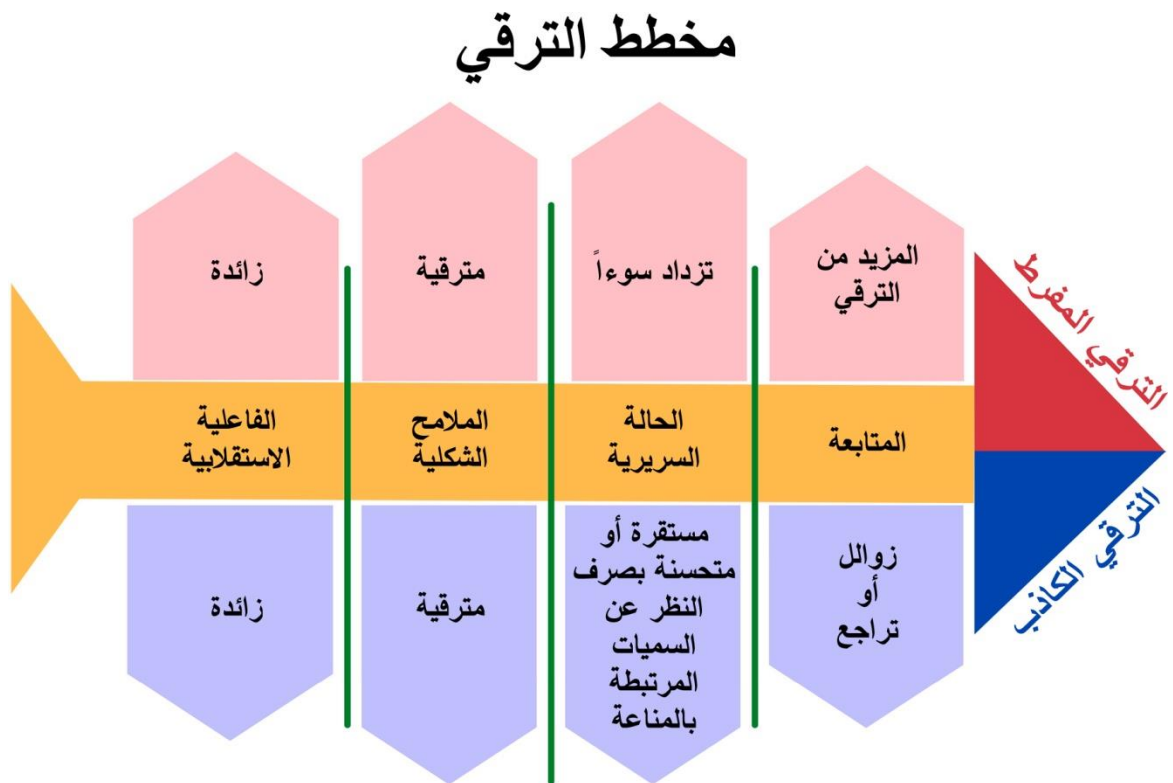
بدلاً من أن يكون مؤشراً على الترقّي الفعلي، فإن الترقّي الكاذب يشبه إلى حد كبير ظاهرة التوهج الناتجة عن التحفيز المناعي الهائل (الشكل 9) (Lopci & Meignan, 2020). ومن الممكن أيضاً أن تساهم الاستجابة المناعية المتأخرة في حدوث الترقّي الكاذب (Q. Wang et al., 2018)؛ وقد ذكرت زيادة قصوى في عبء الورم المرتبط بالترقّي الكاذب تراوحت قيمتها بين 20-163% من العبء الأولي عند التشخيص (Chae, 2017; Wang, Nimeiri, Kalyan, & Giles, 2017). ويمكن تعريف هذه الظاهرة على أنها زيادة مؤقتة في حجم الورم والفاعلية (النشاط) الاستقلابية كنتيجة لتجنيد الخلايا المناعية في البيئة الدقيقة للورم خلال المراحل الأولية من العلاج (Lopci & Meignan, 2020). إلا أنه يمكن تأكيد الترقّي الكاذب في أثناء تصوير المتابعة من خلال تراجع الورم في نهاية المطاف والحصول على النتائج السريرية المرغوبة (B. D. Cheson et al., 2016).



الشكل 9: صور متسلسلة لإسقاط الكثافة القصوى (Maximum Intensity Projection (MIP) من تصوير FDG PET-CT عند مريض لمفوما هودجكن توضح نموذج ترقّي المرض الكاذب خلال التقييم المرحلي بعد شوطين علاجيين (Al-Ibraheem et al., 2023). [CMR: استجابة استقلابية تامة Complete Metabolic Response؛ DP: ترقّي المرض؛ DS: حُرز دوفيل Deauville score]

لا يزال من المهم تقييم إمكانية أن يكون الترقّي الشعاعي الأولي ترقياً كاذباً مقابل إمكانية الترقّي الفعلي. قد تكون خزعة الآفات المتضخمة للمراجعة مفيدة في استعراف الترقّي الكاذب (B. D. Cheson et al., 2016)، وهي غالباً ما تكون سلبية فضلاً عن تراجع الأعراض عند المريض (Al-Ibraheem et al., 2023; Kwong et al., 2017; McGehee et al., 2021).

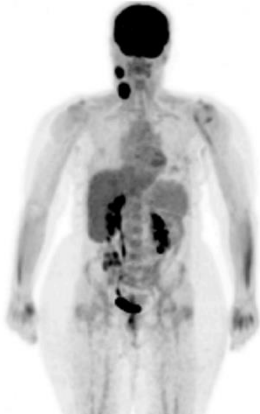
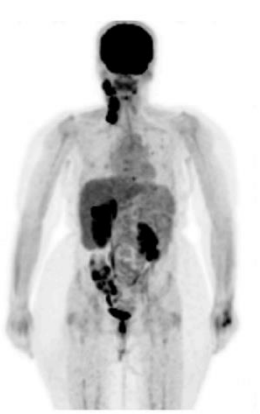
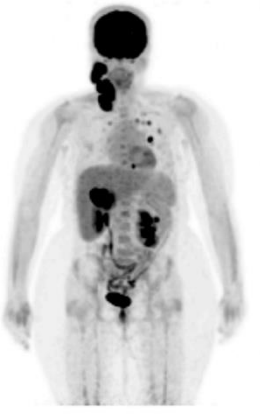
ورغم أنّ خزعة الآفات المتضخمة يمكن أن تكون مفيدة في التمييز بين الترقّي الكاذب وترقّي المرض الفعلي، إلا أنها ليست عملية دائماً لبعض المرضى (الشكل 10). فعلى سبيل المثال، يميل المرضى الذين لا يعانون من أعراض عادةً إلى التعبير عن هذا النمط لاحقاً. ولذلك، فإن الارتباط السريري والمتابعة الدقيقة هما المفتاحان لتتبع ترقّي المرض بشكل أفضل. وعادةً ما يكون الترقّي الكاذب مصحوباً بزيادة أولية في حجم الورم دون تدهور في الحالة السريرية للمريض أو حالة الأداء. ومن ناحية أخرى، فغالباً ما يكون الترقّي الفعلي للمرض، أو الترقّي المفرط، مصحوباً بتدهور في حالة المريض (الشكل 10) (Al-Ibraheem et al., 2023; Lopci & Meignan, 2020).



الشكل 10: مخطط يوضح الفرق بين الترقّي الكاذب وفرط الترقّي (Al-Ibraheem et al., 2023).

3. 1. 2 فرط الترقي

وهو نموذج آخر من أنماط الاستجابة يتصف بزيادة معدل نمو الورم، وقد وُصف لأول مرة مع المعالجة المناعية، ويصيب 4-29% من المرضى، وخصوصاً كبار السن (أكبر من 65 سنة)، وأثبتته التجارب السريرية من الطور الثالث (Champiat et al., 2017; Ferrara et al., 2018; Onesti, Frères, & Jerusalem, 2019). والعنصر المفتاحي لتعريف هذه الظاهرة (الشكل 11)، كما وصفها فريق شامبيات Champiat أول مرة، هو زيادة حجم الورم بمعدل الضعف على الأقل بين خط الأساس ووقت التقييم المرحلي (بعد بدء العلاج بشهرين) (Champiat et al., 2017; Kato et al., 2017). وعلى عكس الترقي الكاذب، توجد بيئة على معدل نمو دراماتيكي لحجم الورم مع سوء الحالة السريرية (الشكل 10 والشكل 11)، وهو ما يقود عادة إلى إنذار سيء (Saâda-Bouza et al., 2017)، والحل الوحيد في مثل هذه الحالات هو إيقاف المعالجة المناعية (Al-Ibraheem et al., 2023; Lopci & Meignan, 2020).

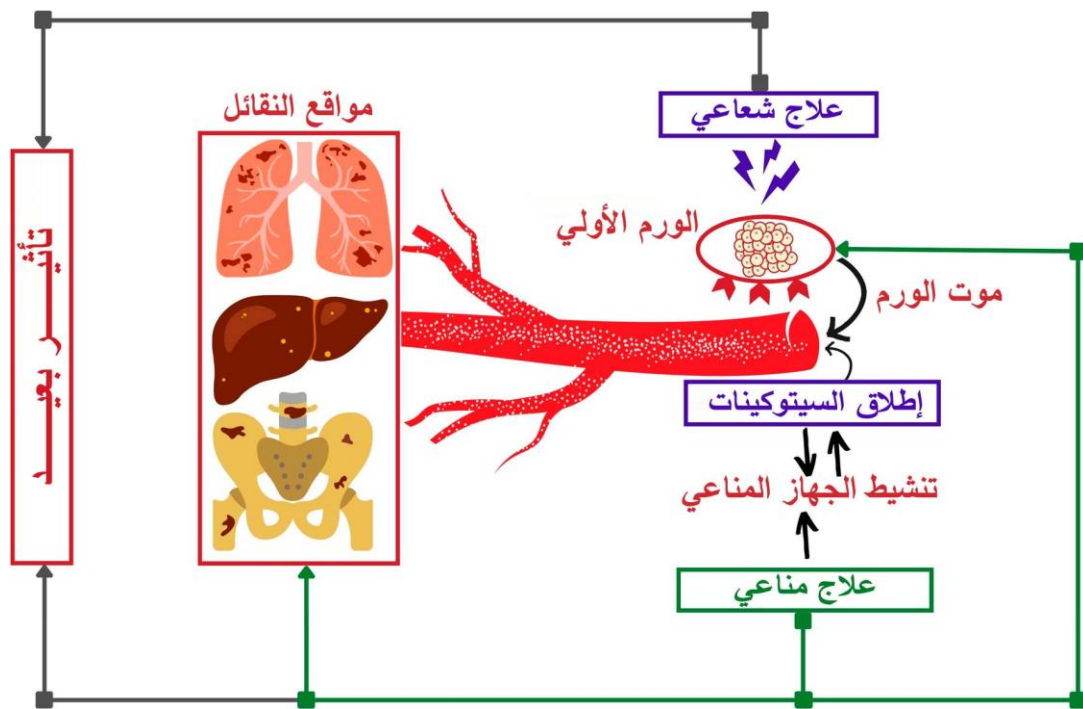
تفريسة (مسح) FDG PET/CT عند مريض مصاب بلمفوما هودجكن		
مسح أولي قبل العلاج المناعي	بعد 3 أشواط من المعالجة	مسح المتابعة
		
خط الأساس	DP DS=5	زيادة DP

الشكل 11: صور متسلسلة لإسقاط الكثافة القصوى (Maximum Intensity Projection (MIP) من تصوير FDG PET-CT عند مريض لمفوما هودجكن توضح نموذج فرط الترقي (Al-Ibraheem et al., 2023). [DP: ترقي المرض؛ DS: حرز دوفيل Deauville score]

3.1.3 تعزيز أثر التشعيع البعيد على الأنسجة البعيدة عن مرمى الأشعة

وصفت مؤخراً تقارير حالات تأثيراً محتملاً بعيداً في سياق العلاج المناعي (Michot et al., 2016; Ribeiro Gomes et al., 2016)، ولأنّ المناعة هي التي تتوسط هذا التأثير، فهو قد يحدد انكماش الورم في مواقع بعيدة عن المرض بعد العلاجات الموضعية (العلاج الإشعاعي عادة)، حيث تشير الموجودات إلى أن جمع العلاج الإشعاعي والمناعي قد يعزز من تأثير العلاج الإشعاعي الموضعي (الشكل 12) (Lopci & Meignan, 2020).

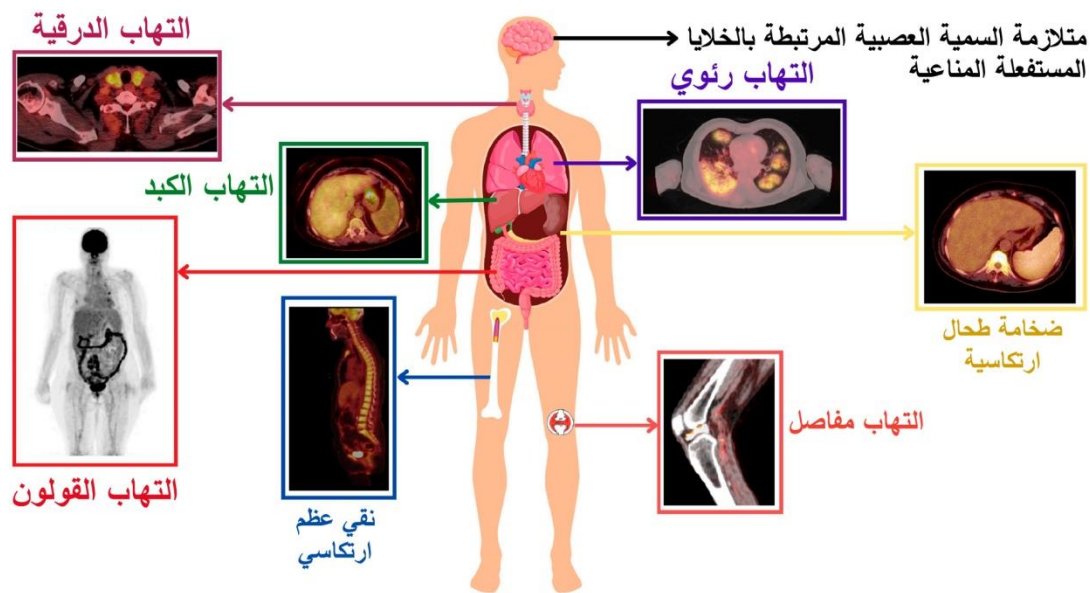
لوحظ نموذج الاستجابة هذا لأول مرة في خمسينيات القرن الماضي بعد أن لاحظ الباحثون الاستجابات السريرية في مواقع النقائل البعيدة بعد إعطاء العلاج الإشعاعي الموضعي الموجه إلى موضع كتلة الورم الرئيسة (Mole, 1953). وأظهرت الأبحاث اللاحقة أن هذه الظاهرة تتوسطها الخلايا التائية، وأن حدوثها سائح في المرضى المؤهلين مناعياً (Slone, Peters, & Milas, 1979). ويمكن أن يؤدي تعزيز استجابة الجهاز المناعي من خلال العلاجات المناعية إلى التأثير التآزري المحتمل الذي لا يزال الباحثون يعملون على تحديد آليته الدقيقة بعد العديد من الحالات السريرية المبلغ عنها (Al-Ibraheem et al., 2023; Golden et al., 2015; Kang, Demaria, & Formenti, 2016).



الشكل 12: عرض توضيحي لآلية التأثير البعيد المقترحة (Al-Ibraheem et al., 2023).

3. 1. 4 التأثيرات الضائرة المرتبطة بالعلاج المناعي

حققت المعالجات المناعية لأنواع اللمفوما نجاحاً كبيراً ولكن، ولسوء الحظ، جاء هذا مع عواقب زيادة السميات المرتبطة بالعلاج المناعي، وإن كان معظمها ليس مهدداً للحياة ويمكن تدبيره إذا تم تشخيصه بشكل صحيح، وهو ما يساعد فيه كثيراً استخدام تصوير FDG PET-CT خلال المعالجة (Prigent & Aide, 2020). ومن هذه السميات، على سبيل المثال لا الحصر (الشكل 13)، الارتكاسات المناعية مثل التهاب المعدة والأمعاء المرتبط بالتهاب القولون والأمعاء والتهاب الرئة والتهاب الكبد (Shi et al., 2019)، والتهاب القولون والتهاب الكبد والتهاب العضلة القلبية (Bajwa et al., 2019)، والتهاب الدرقية المناعي الذاتي (Petersen et al., 2016)، والتهاب المفاصل (Sachpekidis, Kopp-Schneider, Hakim-Meibodi, Dimitrakopoulou-Strauss, & Hassel, 2019)، ومتلازمة السمية العصبية المرتبطة بالخلايا المستفعلة المناعية Immune Effector Cell Associated Neurotoxicity Syndrome (ICANS) التي تتضمن تظاهراتها السريرية كلا من التهاب الدماغ والهذيان وتغير الحالة الذهنية (Brentjens et al., 2013; Rubin et al., 2019; Schuster et al., 2017)، وارتكاس توهج الورم Tumor Flare Reaction (متلازمة سريرية تتميز بشكل رئيس باعتلال (ضخامة) عقدية لمفاوية معممة وضخامة طحال فيما يشبه نموذج فرط الترقّي، والفرق الملاحظ الوحيد هو في الآلية، فالمتلازمة تتوسطها الاستجابة المناعية، وليست ترقياً للمرض) (Al-Ibraheem et al., 2023; Corazzelli et al., 2010; Witzig et al., 2011).



الشكل 13: أمثلة سريرية لتأثيرات ضائرة مرتبطة بالعلاج المناعي لوحظت في أثناء تصوير FDG PET-CT في مرضى اللمفومات. (Al-Ibraheem et al., 2023).

3.2 المعايير الشعاعية لاستجابة اللمفومات للعلاج

تشكل اللمفومات مجموعة متغيرة من الأمراض التي تختلف في تظاهراتها السريرية والشعاعية، وتوفر طرائق التصوير المختلفة (الأمواج فوق الصوتية والرنين المغناطيسي MRI و CT و PET-CT) معلومات حاسمة لتقييم استجابة هذه الأورام للعلاج. وإن كان للأمواج فوق الصوتية و MRI حالات استخدام محددة ونوعية، فإن معظم مراحل تدبير اللمفومات تعتمد على CT و PET-CT، وخصوصاً تحديد مرحلة الورم واستجابته للعلاج خلال المعالجة أو في نهايتها (Agrawal, Manikandan, Uppal, & Rangarajan, 2021).

3.2.1 الخلفية ومعايير الاستجابة العلاجية التقليدية

مع تطور العلاجات المناعية وتنوع آليات عملها في حقبة علم الأورام المناعي immuno-oncology، تزايدت باطراد أهمية تقييم الاستجابات المضادة للأورام وفهمها مع زيادة القدرة على تمييز نتائج العوامل المناعية العلاجية الجديدة عن العوامل السامة للخلايا التقليدية والعوامل الأخرى المستهدفة جزيئياً (Al-Ibraheem et al., 2022; Borcoman et al., 2018; Guglielmi, Andreisek, & Halpern, 2023).

جاءت المحاولات الأولى لتوحيد تقييم الاستجابة العلاجية للأورام، وبالتالي فاعلية العلاج، عندما وضعت منظمة الصحة العالمية المعايير في العام 1981، والتي استندت إلى القياسات ثنائية الأبعاد لتحديد الحجم الكلي للورم، واستُخدمت على نطاق واسع في البداية؛ لكنها سرعان ما تعرضت للنقد وإظهار السلبيات مما أدى إلى وضع معايير جديدة [النسخة الأولى من معايير تقييم الاستجابة في الأورام الصلبة Response evaluation criteria in solid tumors (RECIST1.0) في أواخر التسعينيات (Negrier et al., 2000; Thiesse et al., 1997)]. استخدمت هذه المعايير قياسات أحادية البعد بدلاً من قياسات ثنائية الأبعاد لأن دراسة تحليل تلوي meta-analysis توصلت إلى أن القياس أحادي البعد للحد الأقصى لقطر الورم يكفي لتقييم الاستجابة الموضوعية (James et al., 1999). وقد تم تحديد التقييم بالتصوير المقطعي المحوسب ليكون الطريقة الأكثر معولية وعملية (Borcoman et al., 2018; Padhani & Ollivier, 2001). وكما هو متوقع، أضحت أوجه القصور في RECIST1.0 واضحة مع مرور الوقت، وأهمها مدى قابلية تطبيقها على تجارب المرحلة الثالثة التي كانت نقطة

النهاية فيها هي البُقايا دون ترقى المرض و/أو البُقايا الإجمالية، وليس معدل الاستجابة الإجمالي؛ وزيادة استخدام تقانات التصوير بالرنين المغناطيسي و PET/ CT ليُصبح دمجها في تقييم الاستجابة تحدياً؛ وعدم تضمين تقييم العقد اللمفاوية في هذه المعايير. وقد أدت هذه العيوب إلى تطوير RECIST1.1 التي تضمنت تغييرات مهمة مثل عدد الآفات المفترض تقييمها (انخفض من 10 كحد أقصى إلى 5 كمجموع)، وتغير عدد الآفات المسموح بها لكل عضو (من 5 إلى 2)، وتضمنت العقد اللمفاوية المرضية (المحور القصير 15 ملم) كمرض قابل للقياس. وتم ذكر استخدام تقريسة FDG-PET على وجه التحديد للكشف عن الآفات الجديدة، مع تكرار التصوير كل 6-8 أسابيع 15. ومع تطورات المعالجة المناعية، ظهر القصور في معايير RECIST، مما خلق حاجة للوصول إلى معايير الاستجابة المرتبطة نوعياً بالمناعة (immune-specific related response criteria (irRC) التي خضعت أيضاً لتعديلات لاحقة وظهرت بعدها عدة معايير (مثل iRECIST و PERCIMP و RECIL2017 و LYRIC وغيرها) لا تزال تخضع للتطوير حتى الآن لتستوعب تطورات المعالجات المناعية (Al-Ibraheem et al., 2023; Borcoman et al., 2018; B. D. Cheson et al., 2016; Guglielmi et al., 2022; Nakata et al., 2017; Younes et al., 2021).

3. 2. 2 تاريخ معايير الاستجابة العلاجية في اللمفومات

تم نشر أول معايير مقبولة لاستجابة NHLs في عام 1999 من قبل مجموعة عمل دولية وتم اعتمادها أيضاً في لمفوما هودجكين (B. Cheson et al., 1999). وقد قدمت الدلائل الإرشادية لمجموعة العمل الدولية هذه تعاريف لكل من الهدأة التامة complete remission والهدأة الجزئية والهدأة الكاملة غير المؤكدة والمرض المستقر والمرض الناكس والمرض المتروكي بناءً على الفحص البدني والأشعة السينية للصدر والتصوير المقطعي المحسوب CT وتقريسة التصوير المقطعي المحسوب بإصدار فوتون واحد وتقييم نقي العظم بالمشاهدة (B. D. Cheson et al., 2016; McCarten, Nadel, Shulkin, & Cho, 2019).

قاد التوافر اللاحق لتصوير PET والكيمياء النسيجية المناعية وتعداد الخلايا الانسيابي لخلايا نقي العظم إلى وضع الدلائل الإرشادية المنقحة لعام 2007، متضمنةً PET كأحد المكونات لتقييم استجابة HL و DLBCL بشكل رئيس (B. D. Cheson et al., 2007). وفي ذلك الوقت، تمت التوصية باستخدام PET للتقييم ما بعد

معالجة HL وDLBCL، وفي التجارب السريرية على المفوما الجريبية أو غيرها من الأنسجة الشرة للغوكوز المفلور منقوص الأكسجين FDG. ثم قادت الخبرة الإضافية في تفسير نتائج تفرسة PET إلى تصنيف لوغانو Lugano لتقييم درجة الورم والاستجابة العلاجية (B. Cheson et al., 2014) مع دمج PET-CT كمكون قياسي لكل من تحديد درجة الورم والاستجابة العلاجية للأنماط النسيجية الشرة لـ FDG (الجدول 7) والاحتفاظ بتقييم CT للأنواع الفرعية الأخرى (Al-Ibraheem et al., 2023; B. D. Cheson et al., 2016).

وكما هي الحال مع المعايير السابقة، استندت معايير لوغانو على الخبرة مع أنظمة العلاج الكيميائية التقليدية أو الكيميائية المناعية التي أضافت الريتوكسيماب بشكل رئيس. إلا أن توافر أعداد متزايدة من العوامل البيولوجية التي تعمل وفق آليات مناعية متنوعة، ودخولها في التدبير السريري، جعلاً المرونة في تفسير التوصيات أمراً ضرورياً ليصبح ممكناً أخذ خصائص هذه العوامل البيولوجية والمعدلة للمناعة بالحسبان، سيما وأن استخدامها العلاجي ترافق مع أشكال مختلفة غير نموذجية من الاستجابات كما مرّ سابقاً (Al-Ibraheem et al., 2023; B. D. Cheson et al., 2016; Guglielmi et al., 2022).

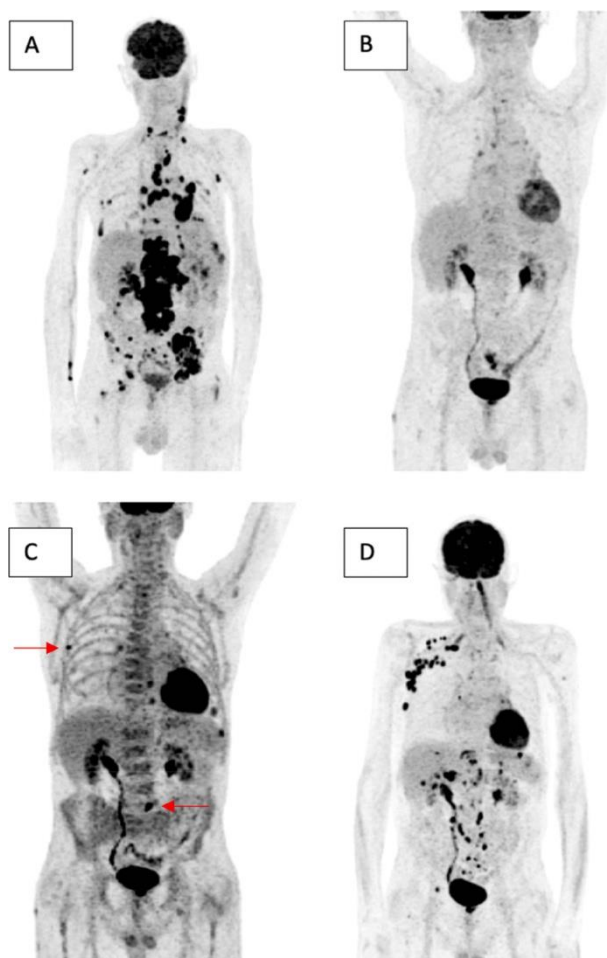
الجدول 7: حالة الشرة للغوكوز المفلور منقوص الأكسجين (FDG) ودرجتها في بعض أنماط المفوما الرئيسية والفرعية (Al-Ibraheem et al., 2023).

الفئة	النمط الفرعي من المفوما	الشرة لـ FDG	درجة الشرة لـ FDG
هودجكن	التقليدية	نعم	عالية
	مختلطة الخلايا	نعم	معتدلة إلى عالية
	مع نفاذ الخلايا للمفاوية	نعم	معتدلة إلى عالية
	مع غلبة الخلايا للمفاوية	نعم	معتدلة
لا هودجكن العدوانية	الخلية البائية الكبيرة المنتشرة	نعم	عالية
	بوركي	نعم	عالية
	الخلية الكبيرة الكشمية (اللامتمايزة)	نعم	عالية
	خلايا مانتل	نعم	معتدلة
لا هودجكن المهاودة	الجريبية	متغاير	منخفضة - عالية
	المنطقة الهامشية	متغاير	معدومة - عالية
	الخلايا للمفاوية الصغيرة	متغاير	معدومة - عالية
	الكشمية (اللامتمايزة) الجلدية	متغاير	معدومة - معتدلة

3. 2. 3 المعايير المستخدمة في تقييم استجابة نهاية العلاج في اللمفومات

اكتسبت معايير تقييم استجابة HL و NHL دوراً محورياً بسبب معدل شفائهما المرتفع. وغالباً ما تكون معايير التصوير الشكلي في CT غير كافية للتنبؤ المبكر باستجابة أورام الدم الخبيثة. وبما أن معظم أنماط اللمفومات الفرعية شرهة لـ FDG (الجدول 7)، يتصدر PET كأداة أساسية مفيدة في تحديد مرحلة هذه الأورام في البداية وبعد بدء المعالجة والاستجابة العلاجية (الشكل 14) مع الانتباه لتنوع مدى شراحتها للمادة المشعة (^{18}F FDG) (الجدول 7) (Guglielmi et al., 2022; McCarten et al., 2019).

رغم دخوله إلى الميدان السريري منذ أكثر من 20 سنة، لم يتم إدخال ^{18}F -FDG PET/CT في الدلائل الإرشادية التصويرية لتقييم الاستجابة العلاجية حتى العام 1999 عندما اقترح فريق من الباحثين بقيادة Cheson البيان الاتفاقي النهائي لمختلف الجمعيات الرائدة المشاركة في علاج اللمفومات من أجل تحديد التطبيق الصحيح لتقانة PET/CT (المعهد الأمريكي لعلم الأشعة من قبل جمعية الطب النووي والتصوير الجزيئي؛ الرابطة الأوروبية للطب النووي، الجمعية الأمريكية لعلم الأورام



الشكل 14: صور ^{18}F FDG-PET لمرضى DLBCL.

A: يُظهر إسقاط الكثافة القصوى ضخامة عقديّة لمفاوية في مواقع عنق الرحم والصدر والبطن والحوض.
B: أظهرت صورة إسقاط الكثافة القصوى المرحلية بعد دورتين من العلاج الكيميائي المناعي استجابةً استقلابية جيدة جداً مع حد أدنى فقط من ضخامة عقديّة في المنصف (حرز دوفيل = 4).
C: كشفت صورة FDG-PET في نهاية العلاج (بعد 4 أشهر و 6 أشواط علاجية مناعية) زيادة شراهة لـ FDG (سهم أحمر) في عقدة لمفاوية إبطينية واحدة يمين وفي عقدة لمفاوية واحدة خلف البريتوان (دوفيل: 5). بالإضافة إلى إعادة تنشيط نقي العظم وكسور ضلعية تسلسلية يسرى في الضلعين الأماميين السابع والثامن والضلعين الخلفيين العاشر والحادي عشر.
D: أظهرت صورة FDG-PET بعد 4 أشهر أخرى زيادة إضافية كبيرة في تضخم العقد اللمفاوية في مواقع فوق الحجاب الحاجز وتحتة مؤكدة ترقى المرض (دوفيل 5) (Guglielmi et al., 2022).

الجدول 8: نظام حرز دوفيل ذو النقاط الخمس لمعايير استجابة الورم (Guglielmi et al., 2022).

الحرز	المعيار/القبط
1	لا يوجد قبط
2	القبط أقل من قبط المنصف
3	القبط أكبر من قبط المنصف وأقل من قبط الكبد
4	القبط أكبر قليلاً من قبط الكبد
5	القبط أكبر بشكل ملحوظ من قبط الكبد و/أو آفات لمفاوية جديدة

السريري، الكلية الأمريكية للطب النووي، جمعية أشعة الأطفال، الجمعية الكندية للطب النووي). وقد اقترح الباحثون تصنيفاً حرزياً لوصف استخدام PET/CT في كشف المرض الناكس وفي تقييم الاستجابة العلاجية (B. Cheson et al., 1999).

تطور التصوير في أورام الدم على نطاق واسع خلال العقود العديدة الماضية. ويعتبر ^{18}F -FDG-PET/CT ضرورياً حالياً للتحديد الدقيق

لمرحلة الورم والتقييم المبكر والمتأخر للاستجابة العلاجية. تم مؤخراً اعتماد مقياس دوفيل البصري (5 نقاط؛ الجدول 8) وتوصيات تصنيف لوغانو (سويسرا) (الجدول 9) على نطاق واسع، وقد ساعدا جيداً في تغيير تفسير تقريسات PET مما سمح بتحسين تدبير مرضى اللفومات (Granata et al., 2021; Guglielmi et al., 2022; Zandoni et al., 2021). وتعتمد معايير لوغانو على مدى قبط ^{18}F -FDG و/أو القياسات ثنائية الأبعاد للورم على

الجدول 9: معايير لوغانو لتصنيف استجابة الأورام (Agrawal et al., 2021; Guglielmi et al., 2022).

التصنيف	المعايير المُستندة إلى PET-CT (استقلابية)	المعايير المُستندة إلى CT (شكلية)
استجابة تامة	حرز دوفيل 1 أو 2 أو 3 في مواقع عقدية أو غير عقدية مع كتلة متبقية أو دونها	تناقص القطر الأكبر لآفة في موقع عقدي إلى 1.5 سم أو أقل من ذلك اختفاء تام للبيئة الشعاعية على المرض
استجابة جزئية	حرز دوفيل 4 أو 5 مع نقص القبط مقارنة بخط الأساس والكتلة (أو الكتل) المتبقية بأي حجم	نقص بمعدل 50% فأكثر في مجموع جداء الأقطار المتعامدة لما يصل إلى 6 عقد أو مواقع خارج عقدية ممثلة للمرض
مرض مستقر	حرز دوفيل 4 أو 5 مع عدم تبدل قبط FDG	نقص بمعدل أقل من 50% من خط الأساس في مجموع جداء الأقطار المتعامدة لما يصل إلى 6 عقد أو مواقع خارج عقدية قابلة للقياس
مرض متقدم	حرز دوفيل 4 أو 5 مع زيادة في قبط FDG	عقدة مفردة بقطر معترض 1.5 سم فأكثر، أو زيادة بمعدل 50% فأكثر في مجموع جداء الأقطار المتعامدة لما يصل إلى 6 عقد ضخامة طحال جديدة أو ناكسة إصابة جديدة أو ناكسة للعقد ونقي العظم

تقريسة CT، مع PET أو وحده (B. Cheson et al., 1999). وفي العام 2017 افترضت مجموعة العمل الدولية RECIL (معايير تقييم الاستجابة في اللمفوما response evaluation criteria in lymphoma) إمكانية استخدام القياسات أحادية البعد لتقييم الاستجابة للعلاج في اللمفومات (Younes et al., 2017).

ومع ظهور مشبطات نقطة التحقق check point المناعية أو العلاج المناعي الجديد، أصبح تفسير FDG-PET-CT تحدياً. تؤدي آلية عمل هذه العوامل إلى نمط استجابة مختلف قد يحاكي ترقّي المرض (الترقي الكاذب). ولذا تم تطوير معايير LYRIC (معايير استجابة اللمفوما للعلاج بالمعدلات المناعية Lymphoma Response to Immunomodulatory therapy Criteria)، وهي معايير خاصة لتقييم الاستجابة بعد العلاج الكيميائي المناعي. تشير نتائج التصوير في الترقّي الكاذب إلى زيادة حجم الآفات ونشاطها الاستقلابي دون أي تدهور سريري للمريض. يُطلق على هذا اسم الاستجابة غير المحددة (IR) indeterminate response في معايير LYRIC، وتتطلب هذه الاستجابة تكرار التصوير بعد 12 أسبوعاً للتمييز بين الترقّي الكاذب والترقي الفعلي للمرض. تشبه معايير LYRIC ما جاء في معايير لوغانو (الجدول 9) وتضيف تعاريف لثلاثة أنماط من IR وهي (Agrawal et al., 2021; B. D. Cheson et al., 2016; Ferrari et al., 2021; Pelosi et al., 2010):

- IR1: زيادة بمعدل 50% فأكثر في مجموع جداء الأقطار في أول 12 أسبوعاً من العلاج
- IR2: زيادة في مجموع جداء الأقطار بمعدل أقل من 50% مع آفة (أو آفات) جديدة، أو زيادة بمعدل 50% فأكثر في جداء الأقطار المتعامدة لآفة أو مجموعة آفات في أي وقت من العلاج
- IR3: زيادة في قبط FDG دون زيادة متزامنة في حجم الآفة تجعلها تحقق معايير ترقّي المرض.

يمكن إجراء CT كجزء من PET-CT مع تحسين التباين (ceCT) contrast enhancement بجرعة كاملة للحصول على صور عالية الجودة، أو دون تباين باستخدام جرعة أقل. قد يستعرف ceCT موجودات إضافية ويحسن الكشف عن أمراض البطن أو الحوض (Barrington et al., 2014). بالإضافة إلى ذلك، فقد تحدث أخطاء صغيرة في قياس قبط FDG في الورم بوجود وسائط التباين، بسبب التأثير على تصحيح التخفيف attenuation، مما يؤدي إلى المبالغة في تقدير قبط FDG بنسبة 10-15% في المنصف والكبد (Vriens, Visser, 2010). ولذا، توصي العديد من الجمعيات العلمية (كالرابطة الأوروبية للطب النووي

وجمعية الطب النووي والجمعية الشعاعية للأمريكا الشمالية) بإجراء ceCT قبل إجراء PET-CT وبشكل منفصل عنه (Barrington et al., 2014). وبالطبع، فإن PET-CT هو المفضل مع الأورام اللمفاوية الشرهة لـ FDG (الجدول 7)، بينما يُفضل CT مع الأورام اللمفاوية الأخرى. علاوة على ذلك، يستعرف CT المزيد من العقد النقيرية hilar، وقد يميز بشكل أفضل بين كتلة عقدية كبيرة واحدة ومجموعة من العقد المفردة. ويجب تضمين ceCT من أجل قياس أكثر مضبوطة لحجم العقد وفي وضع الانضغاط أو التخثر في الأوعية المركزية أو المنصفية. كما يُفضل أيضاً ceCT في التخطيط للمعالجة الشعاعية، وكذلك فالأمر محسوم لصالح CT في حالات الأورام غير الشرهة لمادة FDG المشعة، وفي الأوضاع فقيرة الموارد أو التي لا يتوافر فيها التصوير المقطعي بالإصدار البوزيتروني (Barrington et al., 2014; Granata et al., 2021; Vriens et al., 2010; Zandoni et al., 2021).

3. 2. 4 التقييم المرحلي للاستجابة العلاجية في اللمفومات

إضافة إلى إجراء تقييم الاستجابة في نهاية العلاج End-of treatment (EoT) response، يمكن إجراء هذا التقييم باكراً بعد بدء العلاج. يتم إجراء هذا التقييم المرحلي Interim عادةً بعد 2-4 أسبوعاً من المعالجة الكيميائية، ويتم باستخدام CT أو PET (يسمى اختصاراً i-PET)، ويساعد في تقييم الحساسية الكيميائية في اللمفومات بما فيها NHL. وبالعكس حالات هودجكين، لا يمكن استخدام هذا التقييم روتينياً في NHL بغية تعديل نظام العلاج. تترافق النتيجة السلبية من i-PET مع سلبية EoT-PET وحاصلات علاجية نهائية جيدة (Carr et al., 2014; Mamot et al., 2015). ولكن ذُكرت تقارير تفيد بأن إيجابية i-PET عند مرضى DLBCL ترافقت مع معدل بُقيا إجمالي يساوي 92% وهذه تامة بعد إتمام أسبوع R-CHOP كلها (Carr et al., 2014). وهكذا، ورغم أن i-PET يقدم قيمة تنبؤية سلبية عالية جداً، فإن النتائج الإيجابية الكاذبة يمكن أن تحدث، ولذلك فمن النادر إجراء التعديل على العلاج استناداً إلى هذا التصوير (Agrawal et al., 2021; Kitajima et al., 2019; Schöder et al., 2020).

تذكر دلائل NCCN الإرشادية (2023) حول DLBCL ضرورة إجراء إعادة تحديد مرحلة الورم بعد بدء العلاج لاستعراف المرضى الذين لم يستجب مرضهم للعلاج أو ترقى مرضهم بعد المعالجة التحريضية. وتشير

إلى أن دراسات عديدة أظهرت أن iPET السلبي بعد 2-4 أشواط من العلاج ترافق مع معدلات بقاء عالية معتد بها إحصائياً. ولكنها تؤكد على أن تفريسات i-PET قد تعطي نتائج إيجابية كاذبة، وأن العديد من المرضى المعالجين بالأنظمة الكيميائية المناعية يحصلون على حصائل جيدة طويلة الأمد رغم الإيجابية التي أظهرتها تفريسة i-PET بعد بدء العلاج (NCCN, 2023). وقد أظهرت دراسة استباقية prospective أن معدل البقاء دون ترقى المرض PFS بين مرضى كانت نتائج i-PET عندهم إيجابية مع سلبية الخزعة (بعد 4 أشواط تسارعية من R-CHOP) كان مطابقاً لمعدل PFS بين المرضى الذين كانت تفريسات i-PET عندهم سلبية (Moskowitz et al., 2010). كما ذكر تحليل استعادي retrospective فرقاً صغيراً في معدلات PFS بعد سنتين بين المرضى سلبي وإيجابي تفريسات i-PET بعد 6-8 أشواط من R-CHOP (72% مقابل 85%) (Pregno et al., 2012). وأثبتت تقارير أحدث محدودة القيمة الإنذارية لتفريسات i-PET عند مرضى DLBCL المعالجين بنظام R-CHOP الكيميائي المناعي (Carr et al., 2014; Dabaja et al., 2015; Mamot et al., 2015; Swinnen et al., 2015). وقد قامت دراسة استباقية بتقييم القيمة التنبؤية لتفريسات i-PET بعد شوطين من R-CHOP في 138 مريضاً، فكان معدل البقاء الخالية من الأحداث (EFS) لمدة سنتين أقصر بشكل معتد به إحصائياً عند المرضى إيجابي i-PET مقارنة بالمرضى سلبي i-PET (48% مقابل 74%؛ $P = 0.004$)، إلا أن معدل البقاء الإجمالي OS لسنتين لم يختلف بشكل معتد به إحصائياً (88% مقابل 91%؛ $P = 0.46$) (Mamot et al., 2015). كما أظهرت تجربة أخرى أن تفريسة i-PET الإيجابية كانت مترافقة مع معدل أفضل لكل من OS وEFS، رغم أن تكثيف العلاج استناداً إلى هذه التفريسة لم يُحسن الحصلة عند مرضى DLBCL المعالجين بنظام R-CHOP الكيميائي المناعي (Dührsen et al., 2018; NCCN, 2023).

يوصى أيضاً بإجراء تصوير إضافي باستخدام MRI أو الخزعة عندما تكون موجودات نقي العظام ظاهرة على تفريسة i-PET لتحري إصابة النقي وتعديل العلاج (Barrington & Kluge, 2017; Barrington et al., 2014; B. D. Cheson et al., 2014).

بناءً على ذلك، لا تتصح دلائل NCCN الإرشادية (2023) بإجراء تفريسة i-PET لتوجيه التغييرات في

المعالجة، وإذا كانت تعديلات المعالجة مطروحةً للدراسة استناداً إلى هذه التقریسة، يُنصح بقوة بإعادة إجراء الخزعة من الكتل المتبقية لإثبات إيجابية تقریسة i-PET قبل إضافة أي علاج أو تعديله. فإذا كانت الخزعة سلبية فالمنصوح به هو عدم تغيير الخطة العلاجية الموضوعة والتي هي ذاتها في حال كانت تقریسة i-PET سلبية (NCCN, 2023).

يجب أن يخضع المرضى للتقييم قبل تلقي العلاج الشعاعي، بمن فيهم إيجابي تقریسة i-PET؛ وإن لم يكن هذا مخططاً، فإن إعادة تحديد مرحلة الورم بعد 2-4 أشواط من R-CHOP إجراءً مناسباً لإثبات الاستجابة. والتوقيت المثالي المناسب لإعادة إجراء تحديد مرحلة الورم بعد إتمام العلاج غير معروف، وإن كان المنصوح به هو الانتظار 6-8 أسابيع بعد إتمام العلاج قبل إعادة تقریسة PET لهذا الغرض (NCCN, 2023).

3.3 المتابعة والترصد في المفومات

مرضى DLBCL الخالين من الأحداث المرضية بعد سنتين يتمتعون بمعدل بقيا إجمالي يماثل جمهرة السكان مع التأكيد على المراقبة النوعية للمرض عندهم خلال هذه الفترة الباكرة (Maurer et al., 2014). ويجب أن يتم إجراء الفحص البدني وأخذ القصة المرضية عند مرضى DLBCL كل 3 أشهر لمدة سنة ثم كل 6 أشهر لمدة سنتين، ثم سنوياً بعد ذلك مع النصح بالانتباه إلى تطور أية أورام ثانوية أو تأثيرات جانبية طويلة الأمد للمعالجة الكيميائية. ويجب إجراء التقييم المخبري (التعداد الدموي الكامل (CBC) وفحص البروفيل الاستقلابي وLDH) بعد 3 و6 و12 و24 شهراً، وعند اللزوم بعد ذلك (وفقاً لوجود علامات وأعراض تشير الشبهة). أما إجراء التصوير الشعاعي في الشهر 6 و12 و24 على الأقل بعد المعالجة فهو ممارسة شائعة رغم غياب أية بينة (دليل) على أن التصوير الروتيني في المرضى مع هدأة كاملة يقدم أية ميزة إيجابية تخص الحصيلة النهائية، وقد يزيد من فرص حدوث الأورام الثانوية. والمراقبة الروتينية بوساطة تصوير PET غير منصوح بها (Guppy et al., 2003; Kumar et al., 2018; Maurer et al., 2014; Tilly et al., 2015).

3.3.1 دور التصوير في متابعة المفومات وترصدها

تؤكد دلائل NCCN الإرشادية على استمرار الشك في فائدة استخدام التصوير الشعاعي روتينياً لترصد المرضى

الذين حققوا الاستجابة التامة بعد المعالجة التحريضية induction therapy. ورغم أن النتائج الإيجابية قد تساعد في الاستعراف المبكر للمرضى الناكسين غير العرضيين، تبقى النتائج الإيجابية الكاذبة شائعة وإشكالية، وقد تقود إلى تعرض شعاعي غير ضروري فضلاً عن إجراءات باضعة أخرى وزيادة النفقات الصحية (NCCN, 2023).

قامت دراسة بتقييم استخدام تفريسات CT للترصد بعد 3 و 12 شهراً من إتمام العلاج عند 117 من مرضى DLBCL حققوا الاستجابة التامة بعد المعالجة التحريضية، وأظهرت هذه الدراسة أن 35 مريضاً تعرضوا للنكس ولم تكشف المتابعة بتفريسة CT إلا 6% من غير العرضيين منهم، وأن 86% من حالات النكس كانت مصحوبةً بأعراض أو علامات جديدة للنكس. وبذلك، استنتج الباحثون أن التردد الروتيني باستخدام CT لكشف النكس بعد الاستجابة التامة ذو قيمة محدودة (Guppy et al., 2003). وفي دراسة استعادية قيّمت أيضاً التصوير بغية التردد عند 108 مريضاً تعرضوا لنكس لمفوما عدائية بعد تحقيقهم الاستجابة التامة بعد المعالجة الكيميائية الأولية، وُجد أن التصوير اكتشف 20% فقط من الناكسين اللاعرضيين، وأن استعراف الحالات الباقية (80%) تم من خلال الأعراض و/أو العلامات السريرية. وأكثر من ذلك، فإن حالات النكس المكتشفة بالتصوير كانت تمثل جمهرة من المرضى منخفضي الاختطار استناداً إلى IPI المعدل (الجدول 5) (Liedtke, Hamlin, 2006). وهكذا، فإن التصوير الروتيني خلال الهدأة قد يساعد في استعراف المرضى ذوي المرض المحدود وقت النكس لكنه لا يحسّن الحويلة النهائية (NCCN, 2023).

قيّمت دراسة استباقية أخرى دور تفريسات PET (بعد 6 و 12 و 18 و 24 شهراً من إتمام المعالجة التحريضية) في مرضى وصلوا إلى الهدأة (الاستجابة) التامة بعد المعالجة التحريضية للمفومات، وأظهرت أن التردد باستخدام تفريسات PET مفيدة للكشف عن النكس المبكر. فمن بين حشد من 183 مريضاً بالمفومات العدوانية في هذه الدراسة، كشفت تفريسات PET الترددية نكساً حقيقياً في 10% من المرضى في الشهر السادس و 5% في الشهر 12 و 11% في الشهر 18؛ وكان معدل التفريسات الإيجابية الكاذبة منخفضاً (1%). وقد تم الحصول على تفريسة PET غير حاسمة في 4% من المرضى (8 من أصل 183)، وأكدت الخزعة وجود النكس عند 6 من هؤلاء المرضى (Zinzani et al., 2009). وفي دراسة استعادية قيّمت استخدام تفريسة PET/CT

للمتابعة في 75 من مرضى DLBCL وصلوا إلى الهدأة (الاستجابة) التامة بعد المعالجة التحريضية، كشف مسح PET/CT النكس عند 27 مريضاً، وأكدته الخزعة في 23 منهم. وبالتالي، كانت القيمة التنبؤية الإيجابية لتقريسة PET/CT للكشف عن النكس 0.85 في هذه الدراسة. وكان عمر المريض (أكبر من 60 عاماً) ووجود علامات سريرية على النكس من المنبئات المهمة لنكس المرض في هذه الدراسة (Petrausch et al., 2010). كما أوجت دراسات استعادية عديدة بأنّ التردّد باستخدام تقريسات CT و PET محدودة الفائدة في كشف النكس عند معظم مرضى DLBCL الذين وصلوا إلى الهدأة التامة بعد المعالجة التحريضية (Avivi et al., 2013; Cheah et al., 2014; NCCN, 2023; C. A. Thompson et al., 2014; El-Galaly et al., 2015).

أثبتت دراسة استعادية متعددة المؤسسات على حشدين مستقلين من مرضى DLBCL عولجوا بعلاج مناعي كيميائي قائم على الأنثراسيكليين أنّ معدل البُتيا الإجمالي عند المرضى الذين حققوا EFS بعد 24 شهراً (EFS24) مكافئ لذلك الخاص بالجمهرة العامة المتوافقة معهم من حيث العمر والجنس (Maurer et al., 2014; Schöder et al., 2020). تشير هذه البيانات إلى أن EFS24 يجب أن يكون مفيداً لتطوير استراتيجيات التردّد بعد علاج مرضى DLBCL وتقديم المشورة لهم وكنقطة نهاية في الدراسات السريرية عنهم (NCCN, 2023).

ومع غياب البينة الواضحة على تحسين الحصيلة النهائية باستخدام التصوير الروتيني للتردّد والكشف عن النكس (Kallam et al., 2020)، لا توصي دلائل NCCN الإرشادية باستخدام PET أو CT للتردّد الروتيني لمرضى المرحلة الأولى والثانية الذين حققوا الاستجابة (الهدأة) التامة مع العلاج الأولي. أما مرضى المرحلة الثالثة والرابعة الذين يحققون هدأة مع العلاج الأولي فتتصح دلائل NCCN الإرشادية معهم بإجراء CT مرة واحدة كل 6 أشهر لمدة لا تزيد عن عامين بعد الانتهاء من العلاج، مع عدم إجراء تصوير تردّد روتيني مستمر بعد ذلك الوقت ما لم يُستطَب ذلك سريرياً. وعند إجراء تصوير التردّد سيكون CT مفضلاً على PET/CT عند غالبية المرضى. وقد يكون الأخير مفضلاً عند المرضى الذين يعانون من تظاهرات عظمية بشكل أساسي، مع التحذير من أن إعادة تشكيل العظم قد يترافق أيضاً بشراهة لـ FDG، ولذلك يوصى بالخزعة من المواقع إيجابية PET قبل التأسيس لعلاج الخط الثاني (NCCN, 2023).

بالمقابل فهناك عدد من الدلائل الإرشادية التي لا تنصح أبداً بإجراء PET-CT من أجل الترصّد والمتابعة مثل الدلائل الإرشادية الصادرة عن ESMO (الجمعية الأوروبية لعلم الأورام الطبي) (Tilly et al., 2015) وBCCA (وكالة كولومبيا البريطانية للسرطان) (Cheung et al., 2018) وتوصيات لوغانو، وتحصر الجمعية الأمريكية لأمراض الدم ممارسته بأشكال اللمفوما العدائية (Cassel & Guest, 2012; Kallam et al., 2020).

الفصل (4) ملخص تدبير DLBCL وإيجابيات التصوير وسلبياته

4.1 ملخص الممارسات السريرية والتوصيات

تتفق العديد من المراجعات والدلائل الإرشادية على النقاط التالية في مجال تدبير مرضى DLBCL من

التشخيص حتى التردد والمتابعة (B. D. Cheson et al., 2014; Freedman, Aster, et al., 2023; Kumar et al., 2018; Liu & Barta, 2019; NCCN, 2023; Paquin et al., 2023; Sehn & Salles, 2021; Susanibar-Adaniya & Barta, 2021; Tilly et al., 2015; Vodicka et al., 2022; Yoo, 2022):

- يعتمد التشخيص والتصنيف على الفحص السريري (كشف ضخامة العقد اللمفاوية) والتصوير الشعاعي (تحديد الضخامات والكتل) والخزعة النسيجية وفحصها (شكلياً و ICH وتنميط التعبير الجيني و FISH) في مخبر متخصص وبكفاءات متخصصة. والخزعة الجراحية هي الطريقة المثلى للتشخيص (المقياس الذهبي) حيث يقدم فحص الخزعة يقدم معلومات كاملة عن الشكل والإمراضية والتبدلات البيولوجية الجزيئية (طفرات أو إزفاءات، وخصوصاً تبدلات MYC و BCL2 و BCL6). أما الخزعة بالإبرة وبالمناظير فيحتفظ بهما للمرضى الذين يصعب إجراء الجراحة لهم. ولا يجوز الاعتماد على الرشافة بالإبرة كأداة وحيدة للتشخيص.
- يعتمد تحديد مرحلة الورم وقياس الاختطار وتحديد الإنذار على الفحص السريري وحالة الأداء ووجود الأعراض B والفحوص المخبرية (تعداد الدم الكامل والاختبارات الكيميائية الدموية الروتينية بما فيها البروفيل الاستقلابي و LDH وحمض البول واختبارات تحري HIV و HBV و HCV) والتصوير الشعاعي (CT أو PET/CT) هو المقياس الذهبي لتحديد المرحلة مع أهمية MRI الخاصة عند الاشتباه بإصابة الجملة العصبية المركزية. وقد يكون مطلوباً قياس وظائف القلب وبزل السائل الدماغي الشوكي. ويتم تحديد مرحلة الورم وفق آن آربر المعدل (معايير لوغانو (الجدول 4)) والإنذار وفق IPI وتعديلاته (الجدول 5).
- اختيار المعالجة وفق توصيات الدلائل الإرشادية.

- تقييم الاستجابة للعلاج مرحلياً (بعد 2-4 أشواط من المعالجة) أو بعد نهاية المعالجة باستخدام تقانات التصوير (CT أو PET/CT) ومعايير التقييم (الجدول 8 والجدول 9). ولا يجوز أن يعتمد قرار تغيير

المعالجة على ضوء تصوير PET/CT المرحلي وحده. وتوجد فائدة إنذارية من إجراء PET بعد شوتين من العلاج.

• تقوم متابعة مرضى DLBCL على:

○ إجراء الفحص البدني وأخذ القصة المرضية كل 3 أشهر لمدة سنة ثم كل 6 أشهر لمدة سنتين، ثم سنوياً بعد ذلك مع الانتباه إلى تطور أية أورام ثانوية أو تأثيرات جانبية طويلة الأمد للمعالجة الكيميائية.

○ إجراء التقييم المخبري [التعداد الدموي الكامل (CBC) وفحص البروفيل الاستقلابي وLDH) بعد 3 و6 و12 و24 شهراً، وعند اللزوم بعد ذلك.

○ رغم أنّ إجراء التصوير الشعاعي في الشهر 6 و12 و24 بعد المعالجة ممارسة شائعة، إلا أنه لا توجد بيئة على أن التصوير الروتيني للمرضى مع هدأة كاملة يقدم أية ميزة إيجابية تخصّ الحصلة النهائية، وهو قد يزيد فرص حدوث الأورام الثانوية، والترصد الروتيني باستخدام PET غير منصح بها.

يتضح من العرض الموجز السابق للتوصيات أن الخزعة النسيجية الاستقصائية وتصوير PET/CT هما أكثر الإجراءات المجهدة للمريض لأنهما باضعان ومكلفان ويتطلبان إجراءات وتحضيرات خاصة.

4. 2 إيجابيات وسلبيات التصوير الشعاعي في تدبير اللمفومات

4. 2. 1 التصوير المقطعي المحوسب

قبل عصر CT، كان المرضى المشخصين باللمفومات يتعرضون لمجموعة كبيرة من الدراسات الشعاعية التي تشمل التصوير الشعاعي للصدر وتصوير الجهاز البولي بحقن المادة المشعة الظليلة وريدياً وتصوير الأوعية اللمفاوية والمسوحات الهيكلية وتقريسات النظائر المشعة. علاوةً على ذلك، فقد كان معظم مرضى HL يخضعون لفتح البطن الاستقصائي مع ما يحمله من مخاطرها (Kwee, Kwee, & Nievelstein, 2008; Rosenberg et al., 1971). وكان إدخال CT في أوائل سبعينيات القرن العشرين بمثابة فتح هائل في التصوير غير الباضع، وسرعان ما تم استعراق واستقصاء احتمال مساهمته في تحديد مرحلة اللمفومات، ليصبح تدريجياً طريقة التصوير المفضلة في هذا المجال، وليخضع للتطوير والصقل بشكل مستمر، فأصبحت خصائصه الجديدة تسمح

بالحصول على شرائح أرق في وقت أقصر مما يمكنه من كشف العقد اللمفاوية التي يبلغ قطرها 5 مم أو أقل في جميع أنحاء الجسم. وباقتراح هذه التقنية مع حقن وسط التباين الميودن (المشع) عن طريق الوريد، يمكن استعراض الآفات البؤرية خارج العقد اللمفاوية برتبة بضعة ملليمترات. أدى هذا، جنباً إلى جنب مع توافره الواسع وتكلفته المنخفضة نسبياً، إلى جعل CT أكثر طرائق التصوير استخداماً في تحديد مرحلة اللمفومات قبل أن يتم تحديد مميزات FDG-PET و FDG-PET/CT في هذه الخطوة، مقارنة بإجراء CT وحده (Kwee et al., 2008;).

(Lucey, Stuhlfaut, & Soto, 2005; Prokop, 2003; Rydberg et al., 2000; Vinnicombe & Reznick, 2003). إنَّ CT تقنية تصويرية تشريحية محضة مما أدى إلى عدة سلبيات منها قصوره في كشف التغيرات المرضية في البنى النسيجية التي لم يكبر حجمها نتيجة المرض، وكذلك الآفات ضعيفة التباين مع محيطها. ولا يمكن التعويل على CT في كشف مرض نقي العظم الذي يغير، إن وجد، مرحلة الورم إلى المرحلة الرابعة (Vinnicombe & Reznick, 2003).

كما أنَّ تعريض المريض لكميات كبيرة من الإشعاع المؤيّن يمكن أن يحرض سرطانات ثانوية، ويزداد هذا الخطر عند مرضى اللمفومات الخبيثة لأن إجراء CT سيتكرر خلال المتابعة، وسيصبح مصدر قلق خاص عند الأطفال لأنهم أكثر حساسية لهذا الإشعاع من البالغين ولأن أعمارهم سنوات أكثر لتحدث عندهم التغيرات السرطانية (Barentsz et al., 2006; Kwee et al., 2008; Semelka, Armao, Elias, & Huda, 2007).

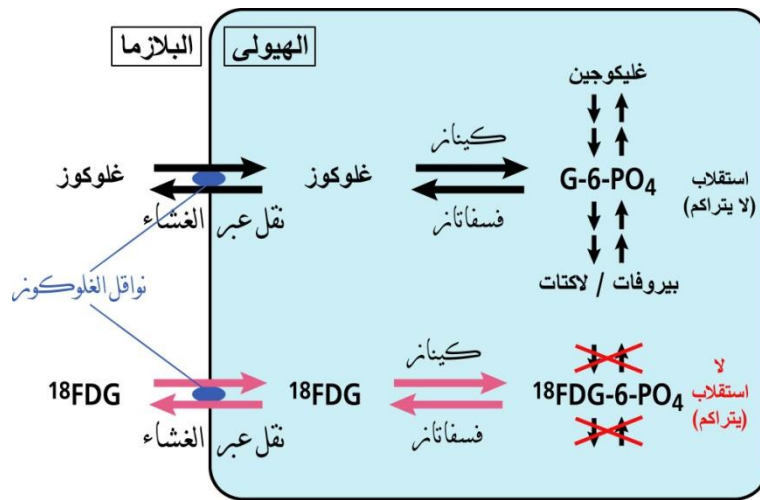
لا يستطيع CT أيضاً أن يميّز النسيج الورمي الحي المتبقّي عن التليف المُحرّض بالمعالجة، وبذلك فنوعيته في تحديد مرحلة الورم منخفضة إلى معتدلة وفق الدراسات هذا يعني أنَّ استخدامه وحده في إعادة تحديد مرحلة اللمفومات الخبيثة بعد العلاج قد يكون محدوداً (Kwee et al., 2008). ومع تقدم علم الأورام، أصبح جلياً أنَّ التصوير التشريحي (CT و MRI) غير كافٍ لتقييم الاستجابة للعلاج (Guglielmi et al., 2022).

ومن مساوئ CT أيضاً أنَّ عوامل التباين (المواد الظليلة) الميودنة قد تسبب تفاعلات ضائرة adverse reactions كالسمية الكلوية والصدمة التأقية، وهما نادران، ولكنهما مهددتان للحياة (Kwee et al., 2008;). (Namasivayam, Kalra, Torres, & Small, 2006).

4. 2. التصوير المقطعي بالإصدار البوزيتروني: النظام الأحادي والهجين

أساس تقانة PET هو وسم أحد الجزيئات المهمة حيويًا كالسكاكر أو الحموض الأمينية أو الحموض النووية أو اللجان الرابطة للمستقبلات بأحد النويدات المشعة radionuclides التي تصدر الإشعاع البوزيتروني. ومع التحلل (التفكك) الشعاعي radioactive decay للأخير، يمكن كشف موضعه داخل الجسم عن طريق جهاز ماسح خاص بتقانة PET. ويتصوير التوزيع المؤقت لهذه المواد المشعة يمكن رسم "خرائط فيزيولوجية" للوظائف أو العمليات ذات الصلة بالجزيئات الموسومة (Griffeth, 2005). وإحدى أكثر هذه المواد شيوعاً هي الجلوكوز منقوص الأكسجين الموسوم بالفلوريد المشع ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG) الذي أخذ استخدامه لتصوير المعدل الاستقلابي للجلوكوز أفضلية كبيرة استناداً إلى ملاحظة ذكرت للمرة الأولى منذ نحو قرن من الزمن، وهي أنّ معدلات تحلل السكر glycolysis في الخلايا السرطانية أعلى بكثير مما هي عليه في الخلايا السوية، وبالتالي فهي تقبّل الجلوكوز وتستهلكه لتلبي متطلباتها الطاقية (Griffeth, 2005; Warburg, 1930).

يتم قبّل FDG بوساطة



نواقل الجلوكوز الغشائية نفسها التي تقبّل الجلوكوز، ومن ثم تتم فسفتته (الشكل 15) بوساطة كيناز الهكسوز لينتج شكله المفسف FDG-6-PO₄ الذي يتم احتجازه ضمن الخلية كما هو لأنه لا يستطيع الدخول في السبل الاستقلابية التي يدخلها الجلوكوز عادة، فهو لا يمكن أن يتحول إلى الغليكوجين أو أن يتم تقويضه عبر تحلل السكر ليتشكل البيروفات أو اللاكتات.

الشكل 15: مبدأ تقانة FDG-PET. الجلوكوز منقوص الأكسجين الموسوم بالفلوريد المشع (FDG) مضاهي للجلوكوز، ولذلك تعامله الخلية كالجلوكوز من حيث نقله عبر الغشاء بنواقل الجلوكوز وخضوعه للفسفة بوساطة كيناز الهكسوز لينتج مشقته الفسفاتي FDG-6-PO₄. وعلى عكس الجلوكوز، لا يستطيع الأخير الدخول في السبل الاستقلابية للجلوكوز (التقويض عبر تحلل السكر أو الخزن على شكل غليكوجين) مما يؤدي إلى احتجازه داخل الخلية. وبما أنّ الخلايا السرطانية شديدة الشراهة للجلوكوز، فهي ستقبّل FDG أكثر بكثير من الخلايا السوية (Griffeth, 2005).

ولأنه مركبٌ قطبي (بسبب وجود الفسفات السالبة)، لا يمكنه المرور بسهولة عبر غشاء الخلية لإعادة توزيعه خارج الخلية؛ فإذا كان هناك مستويات عالية من إنزيم فسفاتاز الغلوكوز-6-فسفات في الخلية، يمكن عندئذٍ فصل مجموعة الفوسفات ليتولد FDG غير المفسف من جديد الذي يمكن أن ينتشر مرة أخرى خارج الخلية ليدخل مجرى الدم ويُعاد امتصاصه في مكان آخر. أظهرت الدراسات أنّ المحدّد الرئيس لقبط FDG بالنسبة لمعظم الأورام هو المستوى المرتفع لناقلات الغلوكوز الغشائية. ومن حسن الحظ، فيما يتعلق بتطبيق FDG-PET في علم الأورام، فإنّ الأورام الخبيثة تحتوي عادةً على مستويات مرتفعة من ناقلات الغلوكوز، وغالباً ما تحتوي على مستويات مرتفعة من كيناز الهكسوز، مع كميات مستقرة إلى منخفضة فسفاتاز الغلوكوز-6-فسفات (Mamede et al., 2005).

التصوير المقطعي بالإصدار البوزيتروني هو تصوير "تزامني" يختلف عن تقانات التصوير الأخرى المستخدمة في الطب النووي. يتم جمع صور PET عن طريق إحاطة جسم المريض (أو جزء من جسمه) بحلقات متعددة من بلورات الكاشف المتخصصة. يقود كل "حدث" تفكك (تحلل) للمادة المستخدمة (^{18}FDG) إلى إنتاج بوزيترون واحد (إلكترون موجب الشحنة). يعبر هذا البوزيترون عادةً بضعة ملليمترات فقط في الأنسجة قبل أن يخضع لما يسمى "تفاعل فناء أو اندثار" مع إلكترون آخر، حيث يقوم كلا الجسيمين بتحويل كتلتهما إلى طاقة يتم إطلاقها في الغالب على شكل فوتونين يسيران في اتجاهين متعاكسين. يكشف ماسح PET هذه الفوتونات في الوقت ذاته (أو "بالتزامن")، وهكذا يتم تسجيل الحدث وتحديد موقعه على أنه فناء البوزيترون، أو "الحدث". ومن خلال جمع الملايين من هذه الحداثات، تستخدم أجهزة PET الحديثة أجهزة وبرمجيات متطورة لإعادة بناء صور توزع القائف tracer المشع (Griffeth, 2005).

تم اختراع تقانة PET في جامعة واشنطن في منتصف سبعينيات القرن العشرين بعد وقت قصير من CT، وسرعان ما تم تبنيه في مجاليّ الأمراض العصبية والقلبية كأداة بحثية قيمة؛ إلا أنّ الباحثين استغرقوا أكثر من عقد من الزمان حتى أدركوا أنّ هذه التقانة قد تكون أيضاً أداة قوية في علم الأورام. وفي مقابل إظهار CT للتفاصيل التشريحية، فإنّ تقانة PET تصوّر الظواهر الكيميائية الحيوية والفيزيولوجية؛ ولهذا فهي تتمتع بمزايا جوهرية تجعلها أفضل من طرائق التصوير التشريحية في تصوير الأورام، فهي تستطيع غالباً تمييز الإصابات الخبيثة عن الحميدة، وكشف التبدلات الاستقلابية في المناطق المشمولة بالمفوما قبل أن تصبح التغيرات البنيوية التشريحية ظاهرة، وكشف الأمراض قبل ظهور أعراضها وعلاماتها، وهذا ما لا تستطيعه صور CT وMRI.

التشريحية، وهذه أهم ميزات هذه التقانة التصويرية (D'souza et al., 2013; Griffeth, 2005; Kwee et al., 2008). ومن مزاياه الأخرى تقليل عدد العمليات الجراحية غير الضرورية التي تتم بسبب خطأ المعطيات والتشخيص، وهو أكثر أماناً لأن الجرعة الإشعاعية التي يتعرض لها المريض منخفضة نسبياً بالمقارنة مع الأشكال الأخرى من الأشعة المقطعية CT، وكذلك لأولئك الذين يُخشى من تلقيهم العدوى بسبب الإجراءات الطبية (Kwee et al., 2019; Rahmim et al., 2008).

دخل نظام التصوير الهجين الاستخدام السريري منذ نحو عقدين من الزمن، وأكثر أشكاله استخداماً هو نظام FDG-PET/CT الذي سمح بأن تعطي صورته معلومات بدقة أكبر عن جسم المريض (تُظهرُ صور PET النشاطات الشاذة في الأنسجة والأعضاء وتعطي صور CT مع المادة الظليلة رؤية تشريحية واضحة تماماً). وقد تم تطوير هذه التقانة باستمرار لتعطي صوراً أكثر دقة وحساسية. وأحد ميزات هذا النظام الهجين هو أن صورته الكاملة تظهر موقع الشذوذ الاستقلابي الدقيق في جسم المريض. ويمكن استخدام PET/CT لتشخيص مجال أوسع من الأمراض التي لا يشخصها CT وحده مثل السرطانات والعدوى، ويستطيع كشف الخلية السرطانية في وقت أبكر منه، وتمييز النسيج الورمي الحي المتبقّي عن التليف المُحرّض بالمعالجة. بالمقابل، فإن تقريسات PET/CT أكثر مضبوطة من تقريسات PET وحده لأن الأخير لا يستطيع إظهار بنية جسم الإنسان التشريحية بالوضوح ذاته الذي تعطيهِ تقريسات CT التشريحية (Guo, 2022; Kwee et al., 2008; Rahmim et al., 2019).

إضافة إلى وقت الفحص الإجمالي المنخفض، تشمل المزايا السريرية الرئيسة للتقانة الهجينة PET/CT تحديداً أفضل لموضع النشاط على البنى السوية مقابل البنى غير السوية، واستعرافاً أفضل للآفات الالتهابية، وإظهار CT للآفات السلبية في تصوير PET (خاصة آفات العظام)، وكشف الشذوذات غير المتوقعة، وتأكيد المواقع غير عادية أو الشاذة، وتحسين تحديد موضع الخزعة أو العلاج الإشعاعي (Griffeth, 2005). يسمح هذا النظام الهجين بتحديد أعلى مضبوطة لمواضع البؤر التي يزداد فيها قبط FDG مقارنةً بتقانة PET وحدها، مما قد ينقص مشكلات التفسير الخطأ لمواقع قبط FDG الفيزيولوجية على أنها مرضية وإعطاء معلومات كاذبة عن مواضع مرضية (Kwee et al., 2008).

وفي الحديث عن المفومات، فإنّ نظام PET/CT طريقة تصوير فعالة في مختلف مراحل تدبير هذه الأورام من تشخيص وتحديد المرحلة وتقييم الإنذار إلى تحديد نوع المعالجة وتقييم الاستجابة لها وكشف النكس

(El-Galaly et al., 2018; Milgrom, Rechner, & Berthelsen, 2021). وهذه الطريقة فعالة أيضاً في كشف إصابة نقي العظم، وربما تصبح مفضلةً على خزعة النقي النسيجية حيث وجدت دراسةً مؤخراً أفضلية PET/CT من حيث الحساسية والنوعية والقيمة التنبؤية (الإيجابية والسلبية) ومضبوطية التشخيص الإجمالية. ويصور PET-CT نقي العظم في الجسم كله بشكل تعجز عنه الخزعة وCT. وليست خافية أهمية تقييم إصابة النقي في مختلف مراحل تدبير اللمفومات من التشخيص حتى كشف النكس (Asif et al., 2023; Kwee et al., 2008).

ومن ناحيةٍ أخرى، فقد كان تقييم الاستجابة العلاجية في حقبة التصوير التشريحي (CT) يعتمد فقط على تقييم حجم الأورام الأولية أو النقائل. لكن، ومع تقدم علم الأورام السريري ظهرت سلبيات هذا التقييم، ففي معظم الأحيان كانت التغيرات التشريحية الواضحة في تقيسات CT تُلاحظ بعد فترة طويلة من بدء المرض مما جعل العديد من القرارات العلاجية ذات الصلة عرضة للخطأ أو التأخير الكبير. كما أن تغيرات الحجم لا تستطيع التنبؤ بسلوك المرض دون لبس، وقد توجد التبدلات الاستقلابية والوظيفية حتى في غياب تبدلات تشريحية موافقة لها. وبوجود تقانة PET-CT، تغير الأمر وازدادت حساسية كشف الأورام، وكثيراً ما يحدث هذا حتى قبل الوصول إلى عتبات الحجم المرضية على صور CT وحده. ومن الواضح أن مضبوطية تحديد مرحلة الورم قبل العلاج وخلاله في الأورام الشرهة لـ FDG أعلى مع تقانة PET-CT مقارنةً بصور CT وحده. وهذا ما يستدعي اتخاذ إجراءات أخرى في الأورام التي لا تقبض FDG (الجدول 7) (Guglielmi et al., 2022; Kwee et al., 2008).

إنّ القيمة التنبؤية الحيوية biologic predictive value لتقانة FDG-PET¹⁸ أكبر من تلك الخاصة بالدراسات التشريحية في بعض الأورام، بما فيها اللمفومات، مع ملاحظة أن بعض الأورام ليست شرهة للغلوكوز (الجدول 7) أو قد تكون أصغر جداً من أن يتمكن PET من تحديدها كمياً بمعولية جيدة. سيحدّ هذا من قيمة PET في هذا النظام الهجين، وخصوصاً عندما يؤخذ بالحسبان أنّ المعلومات التشريحية ليست مهمة في مراقبة حجم الورم فقط، بل أيضاً في تعريف مدى غزو الورم لمحيطه (لا يستطيع PET تقييمه بمضبوطية عالية) وفي التخطيط للخزعة والجراحة والتشعيع (Guglielmi et al., 2022).

يلعب نظام التصوير الهجين FDG-PET/CT دوراً رئيساً في قرارات علاج اللمفوما. فتحديد مرحلة الورم

عند التشخيص أمر حاسم لاختيار العلاج المناسب، ويمكن لهذا النظام استعراف مناطق اللمفوما بشكل أكثر دقة ومضبوطة، وخصوصاً تلك التي لا يظهرها CT وحده، مما يسمح بتجنب نقص العلاج للمرضى الذين يعانون من مرحلة متقدمة من المرض ويضعهم CT في تصنيف المرض المحدود. كما تقدم تقريسات FDG-PET/CT المرحلة الإيجابية بعد بدء علاج اللمفوما مؤشراً إنذارياً على الحاصل السريرية في حالات لمفوما هودجكين، وخصوصاً في حال إظهار الصور لتحسن الحالة، ويمكن أن تفيد في استراتيجيات علاج هذا النوع (El-Galaly et al., 2018). ولكن هذه المعطيات تكون أقل اتساقاً في حالات DLBCL، وليس منصوحاً باستخدام التقييم المرحلي روتينياً كأداة لتوجيه العلاج في هذه الحالات (Kitajima et al., 2019). وقد يؤدي استخدام مقاييس FDG-PET/CT الكمية باستخدام حجم الورم الاستقلابي، ربما بالاشتراك مع المؤشرات الحيوية الأخرى، إلى تحديد أفضل للمجموعات الفرعية الإنذارية، وبالتالي تسهيل اختيار العلاج بشكل أفضل. وبعد العلاج الكيميائي، تكون استجابة FDG-PET/CT تنبؤية للحصيلة، وقد تحدد مجموعة فرعية تستفيد من العلاج الإشعاعي. أما العلاجات الجديدة، وخصوصاً المناعية، فتكون أنماط الاستجابة فيها مختلفة عن العلاج الكيميائي التقليدي، مما أدى إلى معايير استجابة معدلة تأخذ في الاعتبار مخاطر التلقيح الكاذب العابر. وفي حال اللمفوما الناكسة، فإن نتائج FDG-PET/CT بعد علاج الخط الثاني وقبل العلاج بالجرعة العالية ترتبط بقوة بالحصيلة، ويمكن استخدامها لتوجيه شدة العلاج المنقذ في لمفوما هودجكين. أما في المتابعة، فحالياً لا يوجد دور لتصوير FDG-PET/CT في المتابعة الروتينية بعد الاستجابة الاستقلابية التامة للعلاج، لكنه يبقى أداة قوية لاستبعاد النكس إذا عانى المرضى من ملامح سريرية توحى بنكس المرض (El-Galaly et al., 2018; Kumar et al., 2018; NCCN, 2023).

وفي سياق اللمفومات أيضاً، وعلى الطرف المقابل، هناك العديد من المحدوديات والمساوئ التي

تتصف بها تقانة FDG-PET/CT ومنها:

- تقانة PET باهظة الثمن، لا تتطلب فقط ماسح PET باهظ الثمن، وإنما تحتاج أيضاً إلى معدات باهظة الثمن وأفراد مدربين تدريباً عالياً لتوليد المستحضرات الشعاعية المستخدمة. ومع ذلك، فإن الآلاف من هذه

- الماسحات الضوئية في الخدمة في جميع أنحاء العالم (Griffeth, 2005).
- التعرض لكميات من الأشعاعات المؤينة، رغم قلتها، وخصوصاً لمريض مضعف المناعة بالعلاج الكيميائي (Kwee et al., 2008)، وعدم قدرة هذه التقانة على النقاط عمليات الورم الديناميكية على المستوى الجزيئي (عدم تجانس الورم والتطور النسيلى والتصنيف) (Sriram, Lakhotia, & Fenske, 2019).
 - يترافق استخدام FDG-PET في التحديد الأولي لمرحلة الورم (قبل بدء العلاج) عند مرضى DLBCL مع وضع الورم في مرحلة أعلى في نحو 15% منهم، وهو أقل حساسية لكشف إصابة نقي العظم عند هؤلاء بالمقارنة مع مرضى لمفوما هودجكن (Votin et al., 2020). والإيجابية الكاذبة التي يُظهرها PET/CT في قبط نقي العظم لا تدل دائماً على إصابة الأخير لأن هذا القبط قد يكون ناجماً عن فرط تصنع نقوي ارتكاسي (Kwee et al., 2008; Seam, Juweid, & Cheson, 2007). وتشاهد نتائج مماثلة في الطحال وبعد الأذنية الناجمة عن العلاج الكيميائي (Kwee et al., 2008). ومن محدوديات هذا الاستخدام أيضاً التعرف على إصابة بعض الأعضاء الشرهة لـ FDG مثل مثل المعدة والأمعاء والكليتين والمثانة والقلب والدماغ، وهي مواقع شائعة نسبياً للمفوما. قد تؤدي النسبة المنخفضة للقبط بين الورم وخلفيته في هذه الأعضاء إلى عدم كشف الإصابات للمفاوية، وخصوصاً إذا كانت شرهة الورم لـ FDG منخفضة (Juweid, Mueller, Alhourri, & A-Risheq, 2021; Kwee et al., 2008).
 - ومن الأسباب الأخرى للإيجابيات الكاذبة في مرحلة خط الأساس وجود العدوى والعمليات الالتهابية، فمن المستحيل، على سبيل المثال، تمييز DLBCL عن الساركويد sarcoidosis دون خزعة. وكذلك فإن بعض الإصابات العدوائية أمثلة على أمراض تحاكي المفوما على صور PET/CT وتعطي إيجابيات كاذبة تستدعي المزيد من التدقيق (Votin et al., 2020). والأمراض الخمجية (داء المتفطرات، الأخماج الفطرية والجراثومية، الساركويد، ذات الرئة الشعاعية) وحالات ما بعد العمل الجراحي (D'souza et al., 2013) والكثير من العمليات الالتهابية (Viglianti, Wong, Gross, & Wale, 2018) أمثلة عن أسباب هذه الإيجابيات الكاذبة. بالمقابل هناك نسبة عالية من السلبات الكاذبة مع هذه التقانة التصويرية ومن ذلك المرضى الذين يعانون من اضطرابات استقلابية كيميائية مثل الداء السكري أو أي تصرف يغير استقلاب الغلوكوز (كتناول

الطعام مثلاً)، والأورام التي تكون فيها فعالية تحلل السكر منخفضة مثل الأدينومات والكارسينوما القصبية السنخية Bronchoalveolar Carcinoma والمفوما منخفضة الدرجة low grade، والأورام صغيرة الحجم، والأورام المتوضعة بالقرب من مواقع القبط الحيوية السوية مثل القلب والمثانة والكبد والكلية (Chang et al., 2006; Long & Smith, 2011; Viglianti et al., 2018).

- تعطي تفريسات PET-CT خلال تقييم الاستجابة العلاجية، المرحلية والنهائية، للمفومات إيجابيات وسلبيات كاذبة (Schöder & Moskowitz, 2008). ومن أسبابها كل ما يزيد قبط FDG كالاغتيال للمفاوي الارتكاسي التالي للمعالجة الكيميائية والجراحية والشعاعية (بعد أشهر) (Viglianti et al., 2018)، والتخثر الشحمي البؤري في العقد للمفاوية بعد المعالجة الكيميائية (Kashyap et al., 2013). وفي الحالتين (التقييم المرحلي والنهائي)، ورغم القيمة التنبؤية السلبية العالية لنتائج تفريسات PET-CT (أي أن سلبية النتائج تنذر بالحصيلة العلاجية الجيدة) عند مرضى المفومات، بما فيها DLBCL، تبدو القيمة التنبؤية الإيجابية أقل قيمة (وقد تكون محدودة) وأكثر تنوعاً من القيمة التنبؤية السلبية، ولا يمكن الاعتماد عليها في التنبؤ بالحصيلة النهائية أو تغيير خطة العلاج أو إقرار استخدام العلاج الشعاعي (Adams & Kwee, 2019; Al-Ibraheem et al., 2020; Juweid et al., 2021; McCarten et al., 2019; NCCN, 2023; Voltin et al., 2020).

- لا توجد بيئة واضحة على فائدة PET-CT في تحسين الحصيلة النهائية عند استخدامه روتينياً للترصد والمتابعة والكشف عن النكس وتكثر فيه الإيجابيات والسلبيات الكاذبة (Adams & Kwee, 2019; Kallam et al., 2020)، ولا تتصح الدلائل الإرشادية الرئيسية بإجرائه لهذه الغاية، ومنها الدلائل الإرشادية الصادرة عن ESMO (الجمعية الأوروبية لعلم الأورام الطبي) (Tilly et al., 2015) وBCCA (وكالة كولومبيا البريطانية للسرطان) (Cheung et al., 2018) وتوصيات تصنيف لوغانو، وتحصر الجمعية الأمريكية لأمراض الدم ممارسته بأشكال المفوما العدائية (Cassel & Guest, 2012; Kallam et al., 2020).

الفصل (5) الدنا الحر الجوال البلازمي

Plasma Circulating Cell-Free DNA (cfDNA)

5.1 مقدمة: تعريف وتاريخ وأهمية

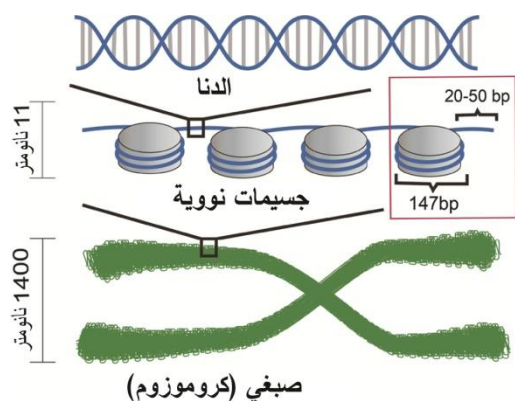
يصف مصطلح الدنا الحر الجوال أي شذفة من الدنا توجد في البيئة خارج الخلية بصرف النظر عما إذا كانت حرة تماماً أو تشكل معقدات مع البروتين أو توجد ضمن الحويصلات خارج الخلية (Pessoa, Heringer, & Ferrer, 2020). إنه ذاك الجزء من الحموض النووية الجوال والذي كشفه ماندل Mandel وميتيس Metais الفرنسيان ووصفاه في العام 1948 للمرة الأولى (Hu, Chen, Long, Li, & Gu, 2021; Mandel & Metais, 1948). ولكن هذا الاكتشاف لم يجذب الانتباه بسبب عدم معرفة بنية الدنا ووظيفته في ذلك الوقت (Hu et al., 2021). وجاءت الإشارة الأولى إلى أهمية هذا الاكتشاف في العام 1989 عندما أظهر فريق سترون أن الخلايا السرطانية ستطلق شذف الدنا الخاصة بها إلى دم مرضى السرطان (Stroun et al., 1989). وفي العام 1997 نشر الكيميائي الصيني دينيس لو Dennis Yuk Ming Lo وزملاؤه اكتشافهم بوجود الدنا الحر الجنيني في بلازما الأمهات الحوامل (Lo et al., 1997)، مما قاد إلى تطبيق استخدام cfDNA كطريقة غير باضعة للكشف عن الشذوذات الجنينية باستخدام عينة من دم الأم (Dennis Lo, 2020; Y. Luo et al., 2023; Pons-Belda, Fernandez-Uriarte, & Diamandis, 2021; Vermeesch, Voet, & Devriendt, 2016).

توالت بعدها الاكتشافات المتعلقة بارتفاع مستويات cfDNA في بلازما المصابين بالسرطان وأمراض أخرى كالأمراض الالتهابية والحمجية والمناعية الذاتية والقلبية الوعائية (Agiannitopoulos et al., 2020; Abel, Jacobus Bronkhorst, Ungerer, & Holdenrieder, 2019a; Burnham et al., 2018; García-Alegría et al., 2020; Hu et al., 2021; Swarup & Rajeswari, 2007; Thorsen, Moseholm, & Clausen, 2024; Timmermans, Kox, Scheffer, & Pickkers, 2016; Zill et al., 2018)، وبدأ إدراك إمكانية استخدام الدنا الحر سريرياً لتتعلق مفاهيم جديدة في مجال تدبير الأمراض مثل "الخزعة السائلة" liquid biopsy التي حظيت مؤخراً باهتمام واسع النطاق كونها تمثل منهجاً قادراً على تقديم وصف سريع غير باضع وقابل للتقييم للمجين genome عند مرضى السرطان. وبعبارة أبسط، يشير مصطلح الخزعة السائلة إلى التحاليل التي تستخدم سوائل

الجسم التي تحتوي على خلايا ورمية جائلة circulating tumour cells وشذف من الحموض النووية أو بروتينات مشتقة من مواقع الورم البدئي أو الثانوي لإجراء اختبارات عليها يمكن أن تعطي معلومات شاملة حول المجين الورمي والخصائص البيولوجية الأخرى للمرض. إضافة إلى ذلك يمكن أن تستخدم الخزعات السائلة لتقييم نجاعة المعالجة وتوفير دليل باكر على نكس المرض (Armakolas, Kotsari, & Koskinas, 2023; Abel J Bronkhorst et al., 2022; Burnham et al., 2018; Connal et al., 2023; Heitzer, Haque, Roberts, & Speicher, 2019; Hu et al., 2021; Matsuoka & Yashiro, 2024; Ponti et al., 2018; Wan et al., 2017).

5.2 خصائص الدنا الحر البلازمي ومصادره المفترضة

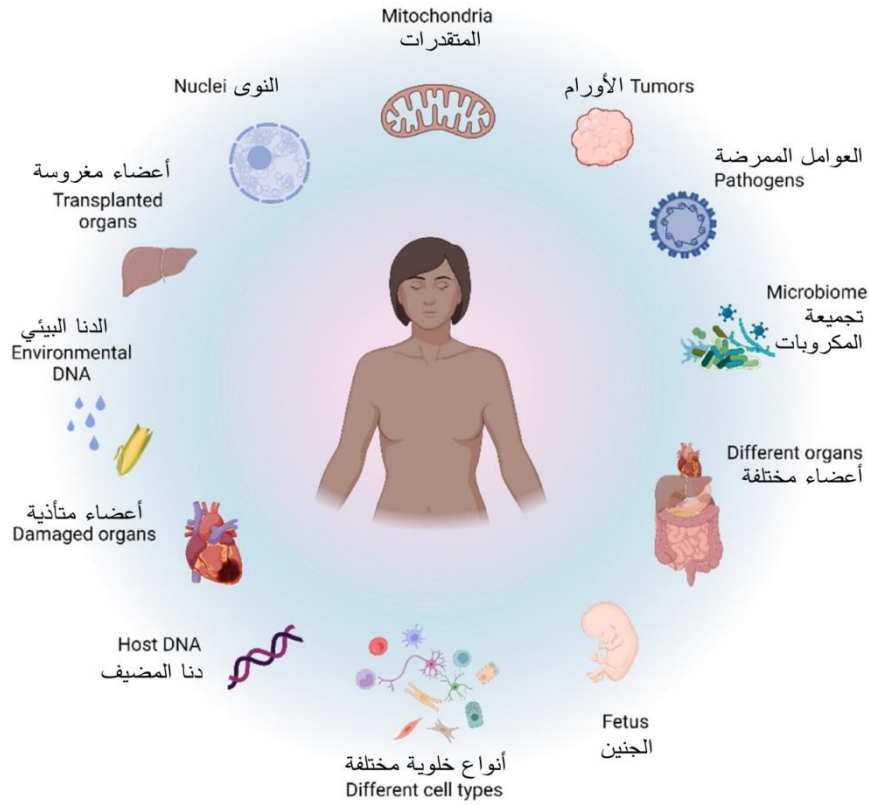
يوضح الشكل 16 بنية الصبغي على مستويات مختلفة، ويظهر فيه أن معظم الدنا في حقيقيات النوى يكون مرزوماً مع الهستونات ضمن بنى تسمى الجسيمات النووية nucleosomes. يتكون الجسيم النووي من لب من ثمانية هستونات تلف حوله شدة من الدنا تبلغ 147 زوج أساس (bp). ويسمى الدنا بين الجسيمات النووية باسم الدنا الرابط linker DNA ويبلغ طوله عموماً 20-25 زوج أساس (Hu et al., 2021). تسمح هذه الخصائص بفهم ما تشير إليه الدراسات من أن cfDNA البلازمي يبلغ طوله عموماً 160-180 زوج أساس، وغالباً ما يكون نحو 167 زوج أساس (Jiang et al., 2015). وهذا ما يشير إلى احتمال ارتباط شذف cfDNA مع الجسيم النووي لأن طوله يعادل تقريباً مجموع طول الدنا الملتف حوله مع طول الدنا الرابط (الشكل 16) (Hu et al., 2017; Markus et al., 2018; Siravegna, Marsoni, Siena, & Bardelli, 2021; Roschewski, Rossi, Kurtz, Alizadeh, & Wilson, 2022).



الشكل 16: بنية الصبغي على مستويات مختلفة مع ملاحظة علاقة بنية الجسيم النووي بطول الدنا الحر (Hu et al., 2021).

يتواصل باستمرار تجديد معظم سوائل الجسم البشري، بما في ذلك البلازما، ومن خلال شبكة معقدة من آليات الإطلاق والتصفية، بمجموعة متنوعة وراثياً من شذف الدنا الحر تأتي من مناشئ متنوعة يلخصها

الشكل 17 (Abel J Bronkhorst et al., 2022).



الشكل 17: منشئ cfDNA المحتملة المتنوعة عند البشر. من خلال السبل المختلفة لموت الخلية والتصفية والإطلاق المنظم، تدخل المجائن الكاملة أو الجزئية من منشئ مختلفة بشكل ثابت إلى سائل الجسم البشري على شكل شدة من الدنا الحر (Abel J Bronkhorst et al., 2022).

يتخرب الدنا الحر الجوال سريعاً بإنزيمات النوكلياز الموجودة في الدوران، وتتم تصفيته سريعاً من الدوران بواسطة الكبد والطحال والعقد اللمفاوية والكليتين (Roschewski et al., 2022). ولذلك توجد شدة الدنا الحر أيضاً في البول، ولكن أطوالها أقصر (تتمركز حول 82 زوج أساس) بسبب الفاعلية العالية نسبياً لإنزيمات النوكلياز في البول مقارنة بالدم (Burnham et al., 2018; Hu et al., 2021). ويتراوح عمر cfDNA النصف بين 16 دقيقة و2.5 ساعة (M. Chen & Zhao, 2019)، وهذا يعني إمكانية استخدام تحليل cfDNA لمراقبة المرض في الزمن الفعلي (Hu et al., 2021). ويعتمد هذا الزمن على عوامل متنوعة منها بنية الدنا الحر الجوال وفعالية حلمة الدنا وارتباط cfDNA مع معقدات جزيئية تعيق تحربه مثل ارتباطه ببروتينات البلازما (الألبومين والأضداد وحيدة النسيلة في الذئبة الحمامية الجهازية مثلاً) ونوع الورم ومرحلة الورم ونوع المعالجة الورمية. وفي الظروف السوية يكون لدى الأشخاص الأصحاء مستويات منخفضة من الدنا الحر الجوال بسبب التوازن بين

الاستماتة الخلوية وما يقابلها من تصفية (تنقية) سريعة للدنا الحر. وفي ظروف خاصة كالتمارين الشاقة أو الحالات الالتهابية، وفي الخباثات يؤدي الالتهاب المزمن أو موت الخلايا الزائد والنخر الخلوي والتصفية غير الكافية للدنا الحر الجوال إلى تراكمه بشكل يفوق تحمل نظام التصفية (Crowley, Di Nicolantonio, Loupakis, & Bardelli, 2013; Khier & Lohan, 2018; Kustanovich, Schwartz, Peretz, & Grinshpun, 2019).

تذكر معظم الدراسات أنّ الآليات المفترضة لإطلاق cfDNA في الدوران تتضمن آليات منفصلة (استماتة الخلية apoptosis ونخرها necrosis) وفاعلة (الإفراز الفاعل ضمن الحويصلات رغم عدم حدوث الموت الخلوي النخري أو الاستماتة) (Abel J Bronkhorst et al., 2022; Giacona et al., 1998; Grabuschnig et al., 2020; Hu et al., 2021; Stroun, Lyautey, Lederrey, Olson-Sand, & Anker, 2001; Wyllie, 1980).

وفي مراجعة تقويمية للنشريات الطبية، لخص فريق من الباحثين منشئ cfDNA المفترضة المتنوعة في جسم الإنسان، وشرح مصادر الدنا وأسباب إطلاقه إلى الدوران وتوصل إلى عدة استنتاجات (Aucamp, Bronkhorst, Badenhorst, & Pretorius, 2018):

1. يمكن استبدال مصطلح "منشئ cfDNA الرئيسة" بوصف "الأكثر غزارة" (أي، الدنا من آليات التدرك الخلوية، بما فيها الموت الخلوي) و"الأكثر وظيفية" (أي، الدنا المتحرر بآلية فاعلة). وهذا يوفر صورة أكثر وضوحاً لما يتعلق بمنشئ cfDNA.

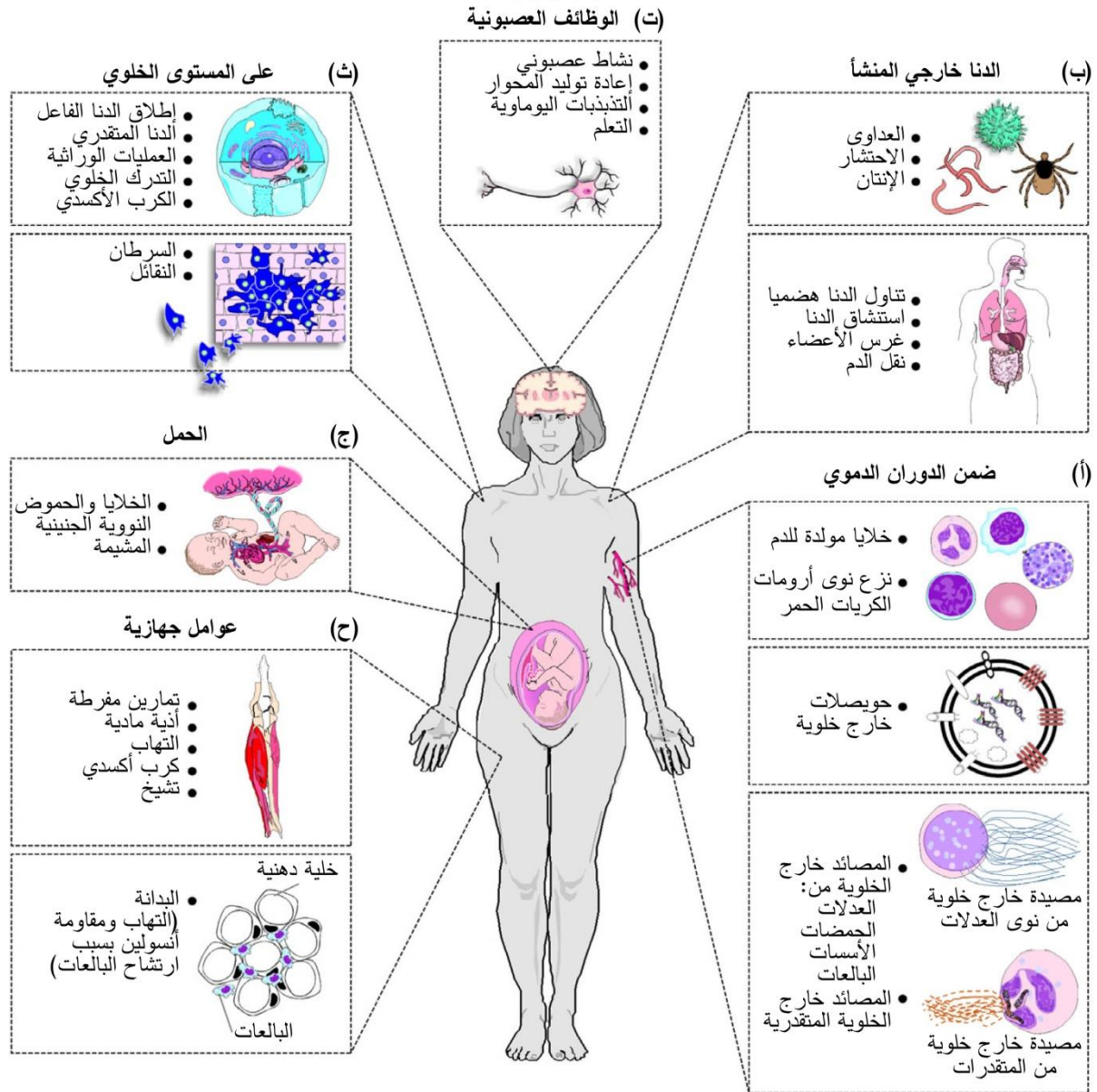
2. مصادر cfDNA وأسباب إطلاقه في أجسام الثدييات متنوعة، ومعظمها، إن لم يكن كلها، يمكن أن يطلق الدنا في الدوران باليتي التدرك والإطلاق الفاعل.

3. مصادر cfDNA وأسباب إطلاقه المتنوعة قابلة للتأثر فيما بينها لتنتج شلالاً من التأثيرات يقود إلى إطلاقه.

4. ليس من المحتمل أن ينشأ cfDNA من مصدر واحد، بل من توليفة من مصادر وأسباب متنوعة تعتمد على صحة الكائن الحي وعمره ونشاطاته وبيئته والحالة الفيزيولوجية المرضية لمرض أو اضطراب ما.

يعرض الشكل 18 ملخصاً لمنشئ cfDNA المفترضة في جسم الإنسان، ويحوي الملحق (1) جدولاً

للسمات البيولوجية والآليات المفترضة لتكون مصادر cfDNA أو أسباب إطلاقه (Aucamp et al., 2018).



الشكل 18: منشأ cfDNA المفترضة في جسم الإنسان. قد تتضمن مصادر cfDNA و/أو أسباب إطلاق الدنا إلى الدوران كلاً من: (أ) بُنى خلوية في الدوران تحوي الدنا أو تطلقه خلال النشاط السوي أو التطور أو الأذية أو الموت؛ (ب) الدنا الأجنبي/الخارجي الذي دخل إلى الجسم عن طريق هضم مصادر الطعام و/أو الاستنشاق و/أو نقل الأعضاء و/أو نقل الدم و/أو العدوى و/أو الاحتشار (عدوى الطفيليات)؛ (ت) الدنا المتحرر إلى الجملة العصبية المعدلة بالوظائف العصبونية؛ (ث) الفاعليات الخلوية وإطلاق الدنا إلى الدوران بشكل مقصود وهادف و/أو نتيجة للكرب أو التدرج والخطأ/التأقلم المورثي؛ (ج) إطلاق شدة من الدنا الجنيني إلى دوران الأم خلال الحمل؛ (ح) تأثيرات جهازية لفاعلية (كالتمارين) و/أو حالة (كالبدانة أو التشيخ) فيزيولوجية (Aucamp et al., 2018).

5. 2. 1 أشكال الدنا الحر في الدوران

يوضح الشكل 19 أشكال cfDNA المختلفة في الدم وسوائل الجسم ويربطها بآلية إطلاقه. إن الخصائص البنيوية والحيوية لتجميعات cfDNA في العينة الحيوية النموذجية شديدة التباين. ورغم شيوع بعض التقاطعات، غالباً ما تؤدي المصادر الخلوية وآليات المنشأ المختلفة إلى إنتاج أشكال متميزة فريدة من شدف cfDNA (كما سيرد أدناه). ويعتبر التصنيف الشامل للأنواع الفرعية المختلفة من cfDNA وتعزيز فهم العوامل التي قد تعدل خصائص cfDNA هذه من الخطوات الجوهرية نحو فهم دور (أدوار) cfDNA البيولوجية فضلاً عن توسيع فائدته السريرية (Grabuschnig et al., 2020). قد يوجد cfDNA على شكل شدف حرة غير مرتبطة بأي معقد أو سطح آخر، وهذه الشدف تكون عرضة أكثر من غيرها للحلمهة بإنزيمات الدناز بعد وقت قصير من إطلاقها. ولأن تراكيز هذه الإنزيمات تكون منخفضة في السرطانات التي تطلق مثبطات الدناز، يزداد تركيز cfDNA في هذه الحالات (Aarthy, Mani, Velusami, Sundarsingh, & Rajkumar, 2015). وقد يوجد الدنا على شكل حلقي كما هي الحال مع الدنا المتقدري وذاك الناجم عن عدم الثباتية الصبغية (Aarthy et al., 2015; Grabuschnig et

al., 2020). وربما يكون على شكل جسيم

نووي (الشكل 16)، وهو الغالب عندما تكون

الاستماتة الخلوية سبب إطلاقه والتي تتسبب

أيضاً بوجوده ضمن حويصلات (جسيمات

الاستماتة Apoptotic Bodies) هي واحدة من

أشكال أخرى من الحويصلات خارج الخلية

التي تحتوي على cfDNA مثل الحويصلات

الدقيقة microvesicles والجسيمات الإيماسية

exosomes (حويصلات مفرزة خارج خلوية)

وحسيمات التحول vitrosomes (Aarthy et

al., 2015; Aucamp et al., 2018; Abel J

Bronkhorst et al., 2022; Grabuschnig et

al., 2020; Hu et al., 2021; Kustanovich et

al., 2019; Stroun et al., 2001).

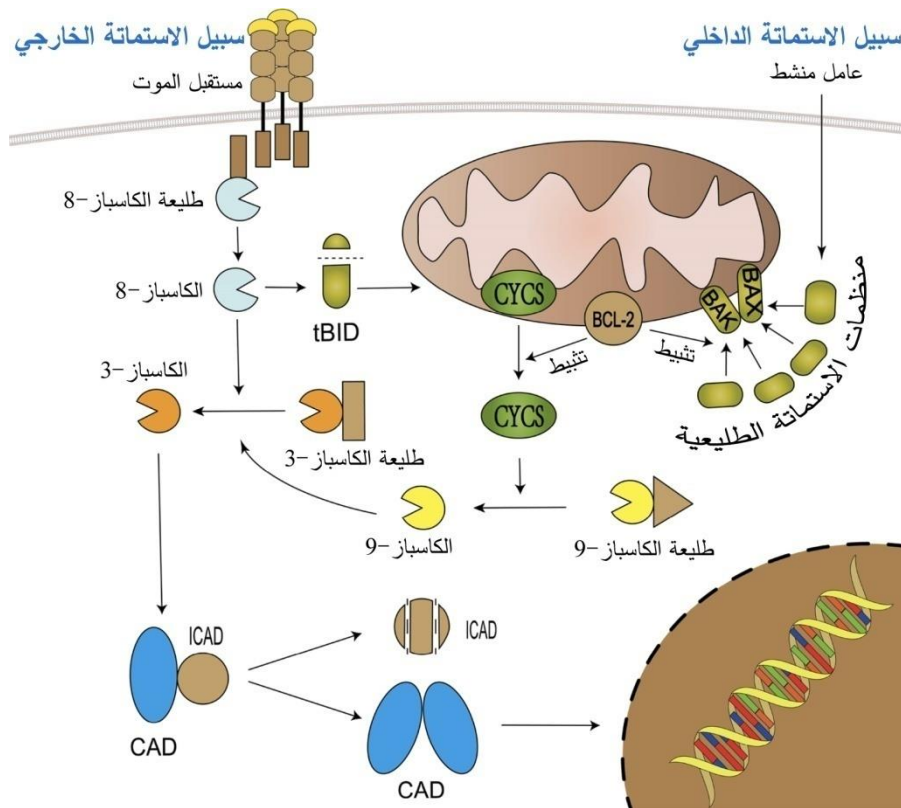


الشكل 19: أشكال cfDNA المختلفة في الجهاز الدوراني للإنسان (Grabuschnig et al., 2020).

5. 2. 2 الاستماتة الخلوية

بقيت العلوم نحو 20 عاماً تعتبر الاستماتة apoptosis المصدر الرئيس لما يحويه الدوران من cfDNA في الأصحاء والمرضى، مع الأخذ في الاعتبار أن نحو 50-70 مليار خلية تموت عن طريق موت الخلايا المبرمج في جسم الإنسان كل يوم (Grabuschnig et al., 2020). والاستماتة apoptosis هي شكل من أشكال موت الخلايا المبرمج programmed cell death يجري باستمرار بهدف صيانة التوازن الاستتبابي والتقلب الثابت المستقر للخلايا في الكائنات متعددة الخلايا لأنّ عدم التوازن بين تشكيل خلايا جديدة وإزالة الخلايا غير السوية أو الزائدة عن الحاجة يمكن أن يقود إلى مضاعفات خطيرة (Grabuschnig et al., 2020; Stejskal et al., 2023).

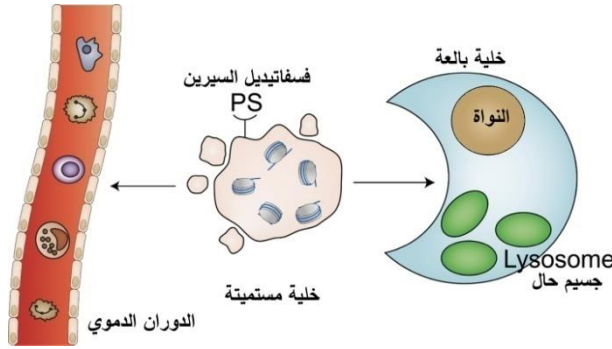
يتم تنشيط الاستماتة عبر واحد من سبيلين (الشكل 20): سبيل الاستماتة الداخلي (المتقديري) intrinsic apoptotic pathway (mitochondrial) وسبيل الاستماتة الخارجي extrinsic apoptotic pathway، ولكل منهما منشطاته وعوامله الخاصة التي تنفذه (Grabuschnig et al., 2020; Hu et al., 2021; Stejskal et al., 2023).



الشكل 20: سبل إشعار الاستماتة الخلوية. [BCL-2: بروتين لمفوما الخلية البائية الثاني؛ BAK: قاتل مناهض Bcl-2 الأول؛ BAX: البروتين X المرتبط بالبروتين Bcl-2؛ CAD: الدناز المفعّل بالكاسباز؛ CYCS: السيروتوكرومات C؛ ICAD: مثبط الدناز المفعّل بالكاسباز] (Hu et al., 2021).

يتنشط سبيل الاستماتة الداخلي (الشكل 20) بعوامل متنوعة مثل أشعة غاما والكرب الأوكسدي وأذية الدنا والأدوية المضادة للسرطان وغيرها، وكلها تقود إلى تفعيل منظمات الاستماتة الطبيعية pro-apoptotic regulators التي تقود بدورها صنفين من بروتينات لمفوما الخلية البائية-2 (Bcl-2) وهما BAX (البروتين X المرتبط بالبروتين Bcl-2) وBAK (قاتل مناهض Bcl-2 الأول Bcl-2 antagonist killer 1). يقوم البروتينان BAX وBAK بتعزيز إطلاق السيروتوكومات C (اختصاراً CYCS) من المتقدرات إلى العصارة الخلوية لتنشط تحول طليعة الكاسباز-9 إلى شكلها الفاعل الذي يقوم بدوره بتنشيط تحويل طليعة الكاسباز-3 إلى الكاسباز-3 الفاعلة، وهي الخطوة التي يلتقي عندها سبيل الاستماتة الداخلي مع سبيل الاستماتة الخارجي (Grabuschnig et al., 2021; Hu et al., 2020) الذي يبدأ بارتباط إشعارات خارج خلوية ("عوامل الموت") مع مستقبلاتها الموافقة ("مستقبلات الموت") فتتحول طليعة الكاسباز-9 إلى شكلها الفاعل الذي يقوم بدوره بتنشيط تحويل طليعة الكاسباز-3 إلى الكاسباز-3 الفاعلة (Hu et al., 2021). وكما يظهر في الشكل 20، فإن الكاسباز-3 تحرر الدناز المفعّل بالكاسباز (CAD) caspase-activated DNase من مثبطه ICAD لينتقل من الشبكة الهيولية الباطنة إلى النواة حيث يبدأ عملية تشديف دنا الجسيمات النووية الاستماتية من خلال شطر الدنا مضاعف الطاق الرابط بين الجسيمات النووية (الشكل 16) لتتولد شذفاً من الدنا النووي تكون بدايةً بطول 50-300 ألف زوج أساس ليتم بعد ذلك شطرها إلى وحيدات الجسيمات النووية (167 زوج أساس)، وهذا من العلامات الرئيسة المميزة للاستماتة (Earnshaw, 1995; Grabuschnig et al., 2020; Hu et al., 2021).

إضافة إلى تشديف الدنا، تترافق الاستماتة التي تنفذها إنزيمات الكاسباز 3 و6 و7 مع تثبيط الاستجابة الالتهابية والتقويض الإنزيمي لمكونات الخلية ونقل فسفاتيديل السيرين إلى سطح الخلية كإشعار يعني "تناولي eat me". تتعرف البالعات على هذا الإشعار وتبلع الخلايا الميتة لتعاملها الجسيمات الحالة وتحلمه محتوياتها من البروتين والدنا إلى حموض أمينية ونوكليوتيدات، على التوالي (Ballabio & Bonifacino, 2020). وفقط عندما يكون هناك عدد كبير من الخلايا الميتة أو تنشط عملية البلعمة لسبب ما، يمكن أن تصل شذف الدنا إلى الدوران الدموي حيث يتم تشكيل "فقاعات" غشائية ورزم حويصلات خارج خلوية extracellular vesicles من



الخلايا المستميتة (أجسام الاستماتة) وإطلاقها
بمحتوياتها إلى الدوران أو البلعمة (الشكل 21)
(Grabuschnig et al., 2020; Hu et al., 2021;)
(Jahr et al., 2001).

الشكل 21: مصير الخلية المستميتة. يكون غشاؤها
الخلوي سليماً ويشكل أجسام الاستماتة التي تحمل حطام
العضيات ووحدات الجسيمات النووية وتدخل الدم أو
تبتلعها البالعات (Hu et al., 2021).

5. 2. 3 النخر الخلوي

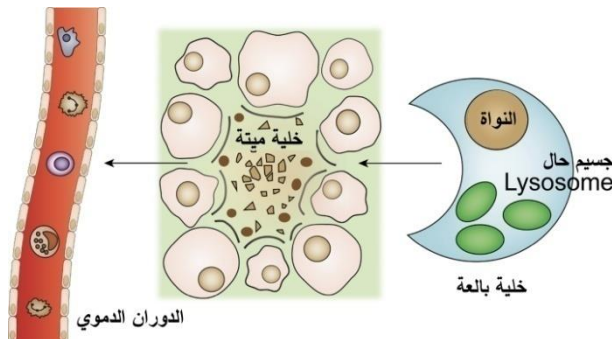
من المعروف أنّ النشاط المضاد للاستماتة
يكون أعلى عادةً في الخلايا السرطانية، وهو ما

يشير إلى وجود آليات أخرى لإطلاق cfDNA تكون هي المسؤولة عن زيادة مستويات cfDNA لدى مرضى
السرطان. ورغم عدم الفهم التام لسبيل النخر الدقيق، فقد وجد أنه هو أيضاً أحد مصادر cfDNA الجوال في الدم
(Jahr et al., 2001). والواقع يقول إنّ النخر غالباً ما يحدث بمستويات عالية في الكتل الورمية (Siravegna et
al., 2017). وعلى عكس الاستماتة، فإن كروماتين الخلايا المتتخرة لا ينكمش ثم يتكسر بشكل منتظم، بل يتم
تقويضه عشوائياً لتتولد شذف مختلفة الأحجام من الدنا، قد يزيد طول بعضها عن 10000 زوج أساس (Hu et
al., 2021; Jahr et al., 2001).

وأكثر من ذلك، ففي مرحلة النخر الأخيرة تتخرب بنية الغشاء في الخلايا الميتة ويتم تحرير العديد من

المواد داخل الخلوية إلى النسيج الخلالي بما

في ذلك شذف الكروماتين (Galluzzi, Kepp, Krautwald, Kroemer, & Linkermann, 2014). ومن الصعب بلعمة هذا الحطام
الخلوي بوساطة البالعات مما يسبب الالتهاب
في الأنسجة المحيطة (الشكل 22) (Gobeil, Boucher, Nadeau, & Poirier, 2001; Hu et
al., 2021).



الشكل 22: مصير الخلية المتتخرة. يتخرب الغشاء
الخلوي ليتم إطلاق محتويات الخلايا المتتخرة إلى النسيج
الخلالي مما يجعل بلعمتها صعبةً (Hu et al., 2021).

5. 2. 4 آليات أخرى لإطلاق الدنا الحر

إضافة إلى موت الخلية النخري والاستماتي، وُصفت عدة آليات لإطلاق الدنا بما في ذلك الورام (oncosis شكل من الموت الخلوي يتصف بانفتاح الخلية وتمزق غشائها ونواتها) والاستماتة الحموية pyroptosis والبلعمة والإفراز الفاعل وإطلاق مصيدة العدلات خارج الخلية (Abel Jacobus Bronkhorst et al., 2016; Che, Stanley, Jatsenko, Thienpont, & Vermeesch, 2022; Kemp, Reardon, Lindsey-Boltz, & Sancar, 2012; Kustanovich et al., 2019; Peters & Pretorius, 2011; Thierry, El Messaoudi, Gahan, Anker, & Stroun, 2016). وعلى عكس أشكال الموت الخلوي المختلفة، يحدث الإفراز الفاعل من الخلايا الحية العيوشة الوظيفية؛ ومن ذلك، على سبيل المثال، لفظ النوى خلال إنضاج أرومات الكريات الحمر (Moras, Lefevre, & Ostuni, 2017) وإطلاق المصائد خارج الخلية (Yipp et al., 2012) وابتزاز egestion الدنا المتقدي (Aucamp et al., 2018; Abel J Bronkhorst et al., 2022; Che et al., 2022; Grabuschnig et al., 2020; Hu et al., 2021; Ingelsson et al., 2018; Kustanovich et al., 2019; Matsuoka & Yashiro, 2024; Sansone et al., 2017; 4Stejskal et al., 2023; Thorsen et al., 202).

أ) **الاستماتة الحموية:** يشير هذا المصطلح إلى نوع التهابي من موت الخلايا المبرمج المعتمد على الكاسباز-1 والذي يؤدي إلى تنشيط السيتوكينات والإنترلوكينات الالتهابية ($IL-1\beta$ و $IL-18$) وموت الخلايا السريع الذي يتميز بتمزق الغشاء البلازمي وإطلاق المحتويات داخل الخلية من الطلائع الالتهابية. ولا تفقد هنا المتقدرات سلامتها ولا تطلق السيتوكروم C الذي ينشط كاسبازات الاستماتة (الشكل 20). ويشير هذا إلى أن الاستماتة الحموية لا تؤدي بشكل مباشر إلى إطلاق الدنا المتقدي في الدم ولا إلى شطر الدنا بين الجسيمات النووية كما هي الحال في الاستماتة. بدلاً من ذلك، من المحتمل أن تحدث تصفية المتقدرات بالبلعمة الذاتية وإطلاق الدنا المتقدي. ويتم الحفاظ على السلامة النووية ويحدث تكثيف نووي ملحوظ، ويتضمن تمزق الغشاء تكوين المسام التي تسمح بتدفق الماء وزيادة حجم الخلية (Aucamp et al., 2018).

ب) **المصائد خارج الخلية والدنا المتقدي:** يؤدي تنشيط العدلات إلى إطلاق الدنا النووي ليشكل مصائد العدلات خارج الخلية. ورغم وصفها لأول مرة في العدلات، فقد ظهر أيضاً أنها تحدث في الخلايا البدينة والأسسة والبلعمية. وتتكون المصائد من خيوط الدنا النووي مع بروتينات مضادة للبكتيريا مثل البيروكسيداز النقية myeloperoxidase والبنتراكسين 3 وإيلاستاز العدلات وغيرها). ويستغرق إطلاق المصائد هذه

ساعات عادةً، ويؤدي في النهاية إلى تحلل العدلات (المصائد الانتحارية). ومن ناحية أخرى، يمكن لجزء آخر من العدلات أن يفرز بسرعة مصائد حويصلية لتأمين استجابة فعالة وسريعة ضد البكتيريا. ولا يتم تحلل العدلات منزوعة النوى المتبقية ولكنها تحتفظ بالقدرة على الزحف وابتلاع البكتيريا (المصيدة الحيوية). ويمكن للصفائح الدموية أن تعرض على تشكيل هذه المصائد التي بدورها تعرض على توليد الثرومبين. ويمكن أيضاً للخلايا للمفاوية والوحيدات والعدلات إطلاق طيقان الدنا المتقدي في الدم مرتبطاً بجسيمات أو دونها. وتختلف شبكات الدنا المتقدي عن المصائد بغياب البروتينات التي تقتل الممرضات. ومع ذلك، يمكن ربط هذين النوعين من شبكات الدنا: يمكن أن يستقر الدنا المتقدي في المصيدة ويمكنه أيضاً أن يحفز تشكيلها (Aucamp et al., 2018; Abel J Bronkhorst et al., 2022; Grabuschnig et al., 2020; Kustanovich et al., 2019; Lou, Zhang, Deng, & Chen, 2024).

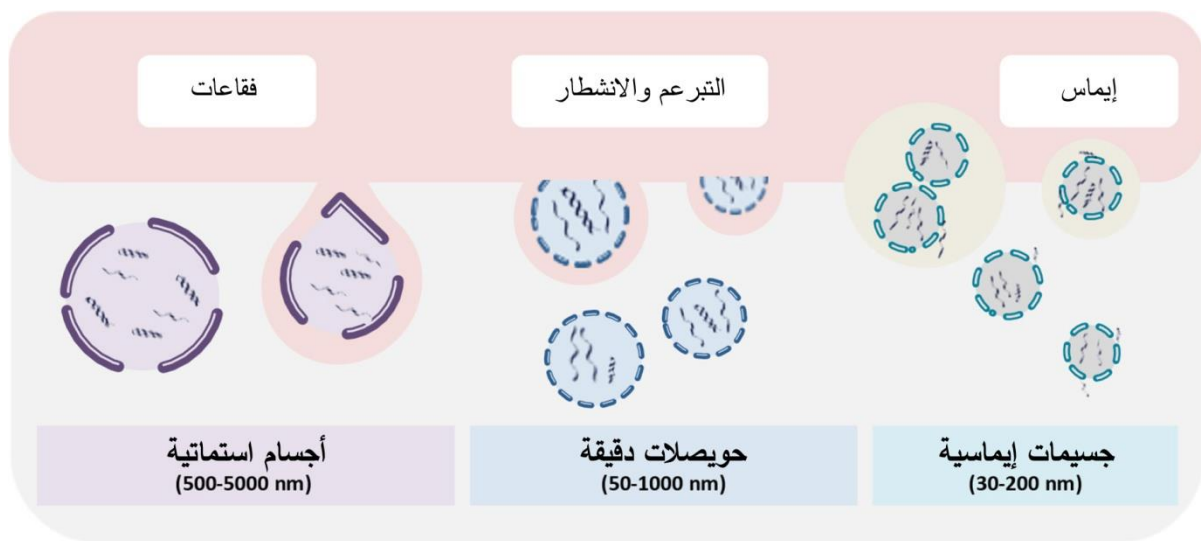
(ت) البنى الجزيئية الكبرى: يشير مصطلح جسيم التحول virtosome إلى المعقد البروتيني الشحمي الدنوي الرنوي الجوال الذي يتم إطلاقه بشكل فاعل من الخلايا الحية، وقد تم ذكره أول مرة في العام 2010 من قبل غاهان وسترون Gahan & Stroun. وقد تمت ملاحظة الإطلاق الفاعل للدنا لأول مرة في الخلايا للمفاوية المحفزة، ولكن الدراسات التالية أثبت وجوده حتى في الخلايا للمفاوية البشرية والفأرية غير المحفزة. علاوة على ذلك، لوحظ إطلاق الدنا الفاعل من أنواع مختلفة من الخلايا حقيقية النواة باستخدام الدراسات المختبرية وفي الجسم الحي. وكان الإطلاق معتمداً على تركيز المعقد في الوسط، حيث كانت التراكيز العالية منه في البيئة تثبط المزيد من الإطلاق. ورغم عدم معرفة آلية الإطلاق، توحى الدراسات بأنه يحدث في طور G0 أو G1 من دورة الخلية (Gahan & Stroun, 2010; Grabuschnig et al., 2020).

لقد أثبتت الدراسات اللاحقة أن الدنا في جسيم التحول يتم تخليقه من جديد لغرض تشكيل هذا الجسيم الذي يحوي أيضاً البروتينات والشحميات وفعالية الرناز (Grabuschnig et al., 2020). وتمت دراسة تركيب هذه الجسيمات في هيولى الخلية للمفاوية والسائل المحيط بها فوجد أن نسب الدنا والرنا والشحميات الفسفورية والبروتين في هذه المعقدات هي تقريباً، على التوالي، 3.45% و 35.09% و 19.90% و 41.01% في هيولى الخلية للمفاوية و 3.92% و 36.41% و 32.21% و 27.44% في السائل المحيط بها (Cataldi & Viola-Magni, 2016). كما لوحظ عدم وجود غشاء خاص بهذه المعقدات، وكانت أطوال

جزيئات الدنا فيها نحو 450-700 زوج أساس. كما وجد أنَّ الخلايا يمكن أن تقبض هذه المعقدات التي تطلقها أنواع مختلفة من الخلايا لتقوم جسيمات التحول بتعديل بيولوجيا الخلايا المستقبلية لها والخاضعة للانقسام مما يشير إلى أن هذه الجسيمات قد تساهم في سبل الإشعار بين أنواع الخلايا المختلفة أو في نقل المورثات أفقياً (Grabuschnig et al., 2020).

ث) الحويصلات خارج الخلوية: أول وصف لإطلاق هذه الحويصلات في حقيقيات النوى جاء من دراسة الصفيحات الدموية (Wolf, 1967)، وهي تتميز بكونها عضيات خارج خلوية ذات غشاء شحمي ثنائي الطبقة مع شكل كروي بسيط، وتوجد في السوائل الحيوية جميعها. وقد تم ذكر إطلاق هذه الحويصلات المستمر من خلايا طليعات النوى وحقيقياتها (Kalluri & LeBleu, 2020; Kim, Lee, Park, & Gho, 2015)، واعتُبرت جزءاً من الفيزيولوجيا السوية للخلايا كلها (Armakolas et al., 2023; Grabuschnig et al., 2019; Margolis & Sadovsky, 2019).

يمكن حالياً التمييز بين ثلاثة أنواع رئيسة من الحويصلات خارج الخلوية بناءً على حجمها وآليات توليدها الحيوي (الشكل 23): (1) أجسام الاستماتة Apoptotic bodies التي يبلغ قطرها 500-5000 نانومتر وتتشكل في سياق تحلل الخلايا خلال موت الخلايا المبرمج؛ (2) جسيمات برانية (انتبازية) ectosomes، وتشمل الجسيمات الدقيقة microparticles والحويصلات الدقيقة microvesicles والحويصلات



الشكل 23: أنواع الحويصلات خارج الخلوية المختلفة في جسم الإنسان. يمكن التفريق بين هذه الأنواع استناداً إلى طريقة إنتاجها وسبل انتبازها من الخلية وحجمها الإجمالي. كما يمكن تصنيف هذه الحويصلات خارج الخلوية حسب محتواها ووظيفتها (Grabuschnig et al., 2020).

الكبيرة بأقطار تتراوح بين 50 و1000 نانومتر، ويتم إطلاقها مباشرة من الغشاء البلازمي عبر التبرعم الخارجي والانشطار؛ (3) جسيمات إيماسية exosomes يبلغ قطرها 30-200 نانومتر، ويتم إطلاقها بعملية الإيماس exocytosis عن طريق اندماج الأجسام متعددة الحويصلات multivesicular bodies (MVBs) مع الغشاء البلازمي (الشكل 23)، وهو ما ظهر وصفه أول مرة في العام 1983 في الخلايا الشبكية عند الفئران (Armakolas et al., 2023; Grabuschnig et al., 2020; Kalluri & LeBleu, 2020; Meldolesi, 2021;) (Mohan et al., 2023).

أما ارتباط الحويصلات بالدنا مضاعف الطاق فقد جاء ذكره للمرة الأولى في 1990 في دراسة مختبرية عن حويصلات خارج خلوية تفرزها بروتستاتة الإنسان (Olsson & Ronquist, 1990)، ولم يتم تأكيد هذه النتيجة إلا بعد عشرين عاماً تقريباً (Ronquist, Ronquist, Carlsson, & Larsson, 2009). ثم توالى التقارير عن وجود الدنا في الحويصلات من دراسات حقيقيات النوى وطييعياتها على خلايا سوية ومرضية (Armakolas et al., 2023; Grabuschnig et al., 2020; Guescini, Genedani, Stocchi, & Agnati, 2010;) (Kalluri & LeBleu, 2016; Kim et al., 2015; Margolis & Sadovsky, 2019; Meldolesi, 2021).

5.3 الأدوار البيولوجية المحتملة للدنا خارج الخلوي

رغم إمكانية اعتبار الدنا خارج الخلوي مجرد حدث عابر منفعل مؤقت، أو حتى مجرد جزء من النفايات في سائل الجسم المجمع في حالات مرضية أو فيزيولوجية، إلا أنّ مجموعة كبيرة من الأبحاث دعمت فكرة أنّ cfDNA يلعب أدواراً فاعلة. والواقع هو أنّ cfDNA كيان معقد متغير يتضمن أنواعاً مختلفة من الدنا يمكن أن تظهر في أشكال مختلفة ويمكن تضمينها في معقدات متعددة الجزيئات. وقد يحدد نوع cfDNA الفرعي وتوزعه في الدم نشاطه ووظائفه الرئيسية التي تعرضها الأبحاث والدراسات ككيانات متميزة، لكنها بالتأكيد مترابطة (Kustanovich et al., 2019):

أ) **التعديل المناعي والاستجابات المناعية والعدوى والالتهاب المصاحب للأورام:** ويمكن هنا تذكر دور المصائد خارج الخلوية والدنا المتقدري والهيستونات والجسيمات النووية خارج الخلوية وما تسببه من زيادة

إنتاج وإطراح طلائع التهابية مثل $TNF-\alpha$ والإنترلوكينات 6 و 10 والبيروكسيداز النقوية (Kustanovich et al., 2019; Meldolesi, 2021; Mohan et al., 2023).

ب) صيانة الاستتباب الخلوي: إحدى وظائف إطلاق الدنا الفاعل هي إزالة الدنا المتأذي مثل الدنا المتقدي mtDNA المؤكسد الموجود في الحويصلات. إنَّ الدنا المتأذي ضارٌّ للخلايا ويتم طرده عبر الجسيمات الإيماسية للحفاظ على الاستتباب الخلوي ومنع الاستجابات المناعية الشاذة، وإفراز mtDNA المتأذي من خلال الجسيمات الإيماسية ضروريٌّ للحفاظ على توازن استقلاب mtDNA والمتقدرات (Kustanovich et al., 2019; Torralba et al., 2018).

ت) قابلية الاستحالة والتعديل الوظيفي للخلايا الأخرى: تم إثبات قدرة cfDNA على تحويل الخلايا عندما عولجت خلايا الفئران NIH3T3 بمصل مرضى سرطان القولون (Trejo-Becerril et al., 2012). وأدت ملاحظة أن cfDNA يمكن أن يندمج في مجائن الخلايا السليمة إلى تطوير فرضية النقلة المجينية (Garcia-Olmo, Garcia-Olmo, Ontanon, Martinez, & Vallejo, 1999; Trejo-Becerril et al., 2012). ومع ذلك، أظهرت دراسات أخرى أن قبط الحويصلات التي تحتوي على الدنا يعتمد على حالة الخلية المتلقية. وتبقى الاحتمالات قائمة ما بين اندماج الدنا الخارجي في المجين وما بين مجرد تأثير عابر على سلوك الخلية المتقبلة (Cai et al., 2013; Kustanovich et al., 2019; Lee et al., 2016). إضافة إلى ذلك، فنقل DNA المجيني أفقياً قد يتواسط التواصل بين الخلوي ويؤثر على وظائف الخلايا المصابة (Cai et al., 2013). وبالمعنى ذاته يمكن أن يتم نقل الدنا المتقدي من خلية إلى خلايا المجاورة (M. N. Islam et al., 2012). وقد تبين أنَّ نقل mtDNA الكامل بهذه الطريقة يعمل كإشعار مسرطن يحرض مقاومة العلاج الهرموني لبعض سرطانات الثدي (Kustanovich et al., 2019; Sansone et al., 2017).

ث) يمكن أن تلعب المصاد خارج الخلوية دوراً في نمو الورم والتأسيس للانتقالات (Kustanovich et al., 2019). كما تلعب جسيمات الإيماس دوراً مهماً في أمراض الكبد المزمنة وسرطانها (Mohan et al., 2023).

ج) تلعب الحويصلات خارج الخلوية دوراً مفتاحياً في الفيزيولوجيا السوية والإمراضية للدماغ مثل الأمراض

المناعية (كالتصلب المتعدد) والتنكسية العصبية وغيرها (Meldolesi, 2021).

(ح) تشير بعض الأبحاث إلى دور الجسيمات الإيماسية في إطلاق الأمراض الاستقلابية والقلبية الوعائية من

خلال نقل المستقلبات وتيسير التواصل بين الخلايا عبر تبادل الرنا الدقيق miRNA في هذه الجسيمات بين

الخلايا البنكرياسية بيتا والشحمية والعضلية الهيكلية والكبد عند الفئران والبشر (Guay & Regazzi, 2017;)

(Kalluri & LeBleu, 2020).

يلخص الشكل 24 دورة حياة cfDNA بدءاً من إطلاقه مروراً بأدواره الحيوية وصولاً إلى تصفيته.



الشكل 24: دورة حياة cfDNA الجوال، وتتضمن إطلاقه وأدواره وتصفيته. يلخص الشكل الآليات الموصوفة جيداً لكل مرحلة. ورغم أنّ cfDNA النووي غير المرتبط هو الذي يتم تحليله في معظم الأوضاع السريرية، فهو ينتقل بأشكال مختلفة في سوائل الجسم: الشكل الحر أو ضمن الجسيمات الإيماسية أو يكون مرتبطاً مع الهيستونات (جسيمات نووية) أو محمياً بعوامل انتساخ أو كجزء من المكونات المرتبطة بالمناعة (مثل مصائد العدلات خارج الخلوية). و cfDNA ليس مجرد واصل حيوي منفعل للحالات الفيزيولوجية المرضية، بل يلعب أدواراً مختلفة في عمليات متعددة كالتهاب وتعديل المناعة وتعزيز نمو الورم وغير ذلك (Kustanovich et al., 2019).

الفصل (6) الدنا الحر البلازمي كواصم جزيئي لتدبير السرطانات

Plasma cfDNA as a Molecular Marker for Cancer Management

1.6 مقدمة

كما مر في الفصل السابق، فمحتوى البلازما من cfDNA، كمعظم سوائل الجسم البشري، يتجدد باستمرار من خلال شبكة معقدة من آليات الإطلاق والتصفية، وهو يتصف بالتنوع الوراثي لأنه يأتي من مناشئ متنوعة (الشكل 17) (Abel J Bronkhorst et al., 2022). ومع أن الاكتشاف الأول لشدة الدنا الحر في دوران الإنسان (Mandel & Metais, 1948) بدا حينها دون قيمة تذكر (Abel Jacobus Bronkhorst, Ungerer, & Holdenrieder, 2019b)، بدأ استعراف أهمية cfDNA السريرية عندما لاحظ الباحثون فروقاً في خصائصه بين الأصحاء والمرضى حيث تم الإبلاغ عن ارتفاع تراكيز cfDNA لأول مرة عند مرضى المناعة الذاتية وبيضاض الدم (Koffler, Agnello, Winchester, & Kunkel, 1973; Tan, Schur, Carr, & Kunkel, 1966). وفي العقود اللاحقة، أظهرت العديد من الدراسات بشكل متقطع أن مستويات cfDNA عند مرضى السرطان أعلى عموماً منها عند الأصحاء (Fleischhacker & Schmidt, 2007)، وقد يصل مستواه عند مرضى السرطان نحو 50 ضعف مستواه عند الأصحاء (Z. Chen et al., 2023). وفي العام 1989، أثبت سترون وزملاؤه أن جزءاً من شدة cfDNA الموجودة في بلازما مرضى السرطان مشتق من الخلايا السرطانية (Stroun et al., 1989)، وبعد ذلك بوقت قصير اكتشفت مجموعة أخرى طفرات في البروتين الورمي p53 (اختصاراً: TP53 من tumor protein p53) في الدنا الحر الموجود في الراسب البولي لمرضى سرطان المثانة الغازي (Sidransky et al., 1991).

أكدت دراسات المتابعة اللاحقة أن الخلايا السرطانية تطلق كميات قابلة للكشف من cfDNA في الدم والسوائل الحيوية، وكشفت أن هذه الشدة تحمل التبدلات الوراثية والتخلقية المتوالية epigenetic الفريدة التي تميز الورم الذي نشأت منه، وأن فكرة استخدام الخزعة السائلة قد نضجت فعلاً (Abel Jacobus Bronkhorst et al., 2019b; Wan et al., 2017)، وأن cfDNA يُظهر إمكانات هائلة كواصم ورمي متعدد الاستخدامات، ويمثل

نقطة انطلاق جديدة في تطبيق الطرائق الجزيئية لتطوير اختبارات سريرية شاملة تعتمد على الطب الشخصي والدقيق غير الباضع (Abel Jacobus Bronkhorst et al., 2019b; Kowal-Wisniewska et al., 2024).

كما عقدت الدراسات الآمال على استخدام تقانات الدنا الحر والخزعة السائلة في معايير كشف السرطانات المتعددة المبكر (Connal et al., 2023; Farooq et al., 2024; H.-Y. Wang et al., 2024; Xu, Chen,) وفي المراحل المختلفة الأخرى من تدبير السرطانات المتنوعة ومنها، على سبيل المثال لا الحصر، الأورام الصلبة (Albitar et al., 2023; Cho et al., 2023; Sacdalan, Ul Haq, & Lok, 2024;)، بما فيها سرطانات الدماغ (Afflerbach et al.,)، والكبد (J. C. Thompson, Scholes, Carpenter, & Aggarwal, 2023) (Fan, Qiu, & Feng, 2024) والمعدة (Bardol, Pageaux, Assenat, & Alix-Panabières, 2024; L. Chen et al., 2024) (H.-Y. Wang et al., 2024) والبروستاتة (H. Chen, Xu, Fang, & Mao, 2023; Franceschini et al., 2024; He, Xiao,)، وأورام الدم بما في ذلك DLBCL بأنماطها المختلفة (Pushpanjali et al., 2023; Venetis et al., 2023) (Yan, Zhu, & Ren, 2023; Temilola et al., 2023) والرأس والعنق (Kowal-Wisniewska et al., 2024)، (Albitar et al., 2023; Bou Zerdan et al., 2023; Chua et al., 2024; Cirillo, Craig, Borchmann, & Kurtz,) (2020; Desmots et al., 2023; Diez-Feijóo et al., 2024; Figaredo et al., 2023; Miaomiao Li, Ding, et al., Talotta, Almasri, Cosentino, Gaidano, & Moia, 2023; Lv & Liu, 2021; Sagiraju, 2022; Soscia, 2023).

6.2 من الخزعة النسيجية إلى اختبارات الدنا الحر والخزعة السائلة

بما أن السرطان لا يزال أحد الأسباب الرئيسية للوفاة في جميع أنحاء العالم، تُبذل جهود متواصلة لتشخيص هذا المرض وتدبيره. ورغم أنَّ الخزعات النسيجية كانت أكثر الطرائق شيوعاً لتشخيص السرطان وتوصيف شاكلة profile الورم، إلا أنها ترتبط بالعديد من المحددات فهي عادةً ما تكون طريقة باضعة، وليس من السهل الحصول عليها في بعض المواقع التشريحية. كما أنها توفر صورة محدودة للتغاير الوراثي ضمن الورم ذاتها من جهة، وما بين النقايل من جهة أخرى، حيث أن الأورام كيانات متغايرة تحتوي على جمهرات فرعية مختلفة من الخلايا التي

تميز الإصابات المختلفة. علاوةً على ذلك، تخضع الخلايا السرطانية مع مرور الوقت لتغيرات مورثية وتخلقية متوالية، ويمكن أن تتطور ديناميكياً حسب المحفزات الموجودة في بيئتها الدقيقة والاصطفاء النسيجي clonal selection تحت ضغط أشكال المعالجة. يؤدي هذا إلى مزيد من تغايرية الورم مما يؤثر على مضبوطية accuracy الفحص والقرارات العلاجية المتخذة بناءً عليه (De Rubis, Krishnan, & Bebawy, 2019; Martins et al., 2021; Ulivi & Indraccolo, 2022). بالإضافة إلى ذلك، فهناك محدوديات أخرى للخزعات الجراحية ترتبط بالوقت وقابلية التكرار وعمر المريض والتكلفة، فضلاً عن احتمال أن تتسبب في مضاعفات سريرية مؤذية في بعض الأحيان (Yu et al., 2021). ولذلك، فهي ليست مناسبة لتسليط الضوء على الشاكلة العامة للورم ولا لتمييز آفات أخرى في مواضع مختلفة ولا لتحديد أي منها يجب استخدامها في المراقبة الطولية longitudinal monitoring بعيدة المدى للمرض (Xie, Li, Gong, Tan, & Ma, 2018).

يأتي حل المشكلات المذكورة أعلاه كلها من خلال الخزعات السائلة التي تكتسب تقدماً مستمراً في سياق التشخيص والإنذار ومراقبة ترقى المرض. والميزات التي تتصف بها هذه الطريقة، مقارنةً بالخزعة النسيجية، تضم الطبيعة الأقل غزواً والتكلفة الأقل والمعلومات عن حالة الورم في الوقت الحقيقي، فضلاً عن القدرة على التغلب على مشكلة تغايرية الورم (أو التبدلات النقيية المتعددة) في بعض الحالات (Yu et al., 2021).

تشمل الخزعات السائلة أخذ عينات سوائل الجسم وتحليلها. والسائل المختار عادةً هو الدم، إلا أنه يمكن استخدام مصادر أخرى مثل البول واللعاب والسائل الدماغي الشوكي CSF ونقي العظم (Alix-Panabieres & Pantel, 2021). ومن الناحية البيولوجية، يمكن تقسيم أهداف الخزعة السائلة إلى فئتين: (1) تشمل الفئة الأولى جزيئات كبيرة أو صغيرة دون خلايا أو دون بنية تحت خلوية في سوائل الجسم؛ وتشمل هذه الجزيئات كلاً من البروتينات والحموض النووية (الدنا الحر أو الرنا الحر) والشحميات والسكريات وغيرها من المستقلبات الصغيرة والأيونات المعدنية؛ (2) تشمل الفئة الثانية أهدافاً ذات هياكل خلوية أو تحت خلوية، بما في ذلك الخلايا السرطانية الجواله circulating tumor cells (CTCs) المفردة أو المجمعة والأرومات الليفية الجائلة المرتبطة بالسرطان والخلايا المناعية والحويصلات خارج الخلوية والمتقدرات (Alix-Panabieres & Pantel, 2021).

(Armakolas et al., 2023; Febbo et al., 2024).

وبما أنه يمكن الحصول على عينات cfDNA بطريقة متسلسلة من خلال إجراءات غير غازية (سحب الدم مثلاً)، فإنَّ تحديد شاكلة cfDNA تمثل كنزاً غير مسبوق من المعطيات المورثية في الزمن الحقيقي والتي يمكن استغلالها لأغراض تشخيصية وإنذارية وعلاجية واسعة النطاق (Abel J Bronkhorst et al., 2022).

لقد تم فعلياً إحراز تقدم ملحوظ في سياق استخدام cfDNA سريرياً من خلال تطوير معاييرته التي تتغلب على العديد من القيود المتأصلة في الطرائق التقليدية (الخزعة النسيجية وطرائق التصوير الشعاعي) وتعمل ببطء على تغيير الطرائق المتبعة في تشخيص الأورام الصلبة والشذوذات الوراثية الجينية ورفض الأعضاء المغروسة والالتهابات ومراقبتها وعلاجها. علاوةً على ذلك، فإنَّ تحديد شاكلة cfDNA من مجموعات العينات الحيوية التسلسلية يَعدُّ بإمكانية إحداث ثورة في توصيف ديناميات المجين الزمنية في مجموعة متنوعة من السياقات كطرائق تقييم مختلف نواحي بيولوجيا الورم، بما في ذلك الأمراض المتبقية والنقائل والتغيرات المورثية داخل الورم والاستجابات الوراثية للعلاج الكيميائي والشعاعي والآليات التي تكمن وراء ظهور مقاومة العلاج. والمعلومات المذكورة أعلاه جميعها، والتي يكاد يكون من المستحيل الحصول عليها من خلال الخزعات النسيجية، كانت ذات قيمة في توجيه الأنظمة العلاجية، وكان لها بالفعل تأثيرها الإيجابي الكبير على تدبير مرضى السرطان وُقياهم (Abel Jacobus Bronkhorst et al., 2019b; Abel J Bronkhorst et al., 2022; Salviano-Silva, Maire,)

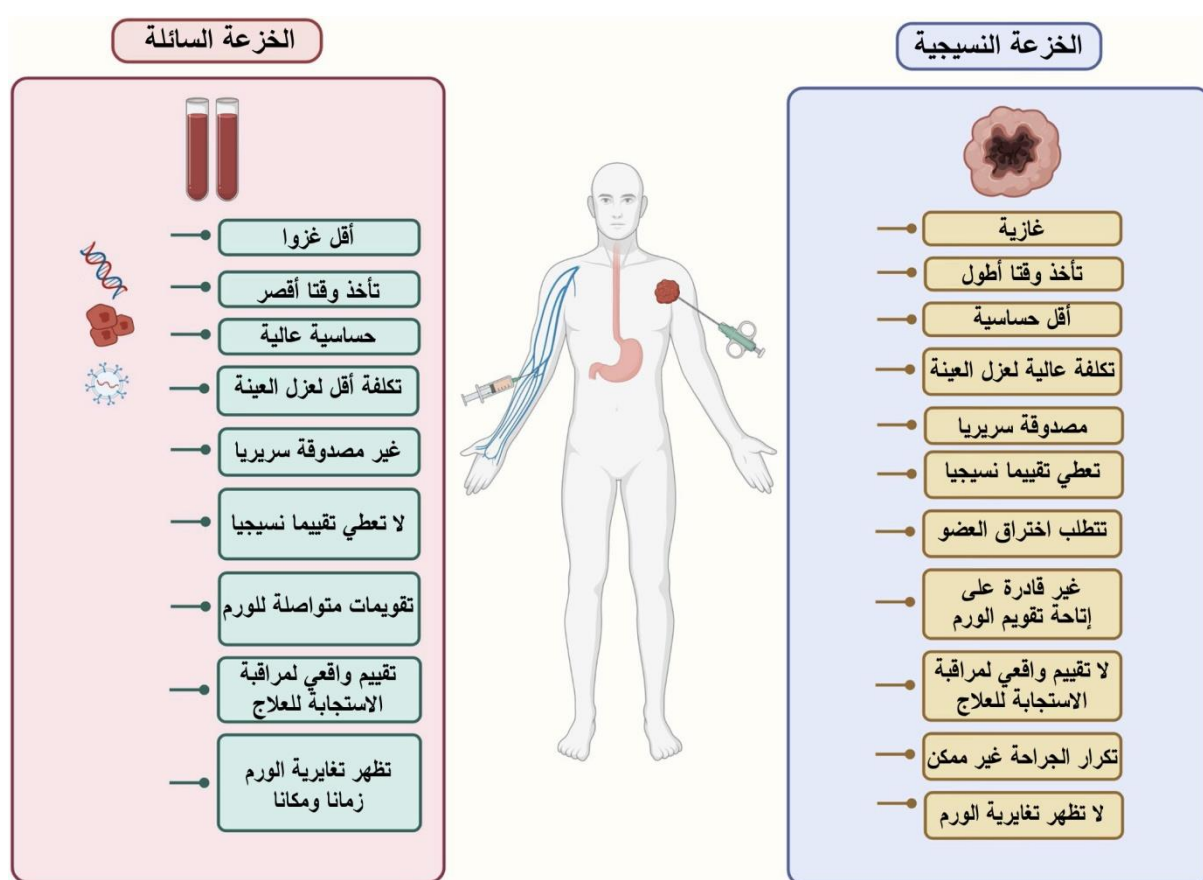
(Lamszus, & Ricklefs, 2022). وتشير هذه النجاحات إلى إمكانية كبيرة لتطوير اختبارات cfDNA تسلسلية لمراقبة العديد من الأمراضيات الأخرى (Abel J Bronkhorst et al., 2022):

- (1) قد توفر تحليلات cfDNA التسلسلية رؤية جديدة للعديد من الأمراض بطيئة الترقى أو المزمنة التي ارتبطت بوجود شاكلات cfDNA الشاذة كداء السكري والأمراض القلبية الوعائية والمناعية الذاتية والتنكسية العصبية؛
- (2) قد تكون تحليلات cfDNA التسلسلية مفيدة خصوصاً لرصد الأمراض المتقدمة أو السيناريوهات السريرية التي تتميز بعترات زمنية ضيقة إلى حد ما نحو التحول الخبيث السريع أو البداية المفاجئة للآثار الضارة مثل مرض باركنسون ومرض آلزهايمر والحمى والسكتة الدماغية والأذيات الرضية والآثار الضائرة للمعالجة المورثية؛

(3) قد تفيد تحليلات cfDNA التسلسلية في دراسة دور تجميعية مكروبات الأمعاء في صحة الإنسان وممرضه (Abel J Bronkhorst et al., 2022).

يعرض الشكل 25 مقارنةً بين الخزعة النسيجية التقليدية والخزعة السائلة والأفضلية التي تكتسبها الأخيرة في سياق تدبير السرطانات.

وفي هذا السياق، تُجرى حالياً تجارب سريرية باستخدام cfDNA في مرضى السرطان [104]، ومنها فحص طفرات مورثة الورم الأرومي الشبكي RB1 التي تحملها الحويصلات خارج الخلوية عند الأطفال المصابين بهذا السرطان (ClinicalTrials.gov identifier: NCT04164134)، واستخدام الحويصلات خارج الخلوية التي تحمل طفرة T790M المستمدة من خلايا سرطان الرئة ذي الخلايا غير الصغيرة لتقييم نجاعة علاج محتمل مضاد للورم (NCT03228277). كما يتم إجراء الأبحاث على دنا الحويصلات خارج الخلوية بغية التشخيص المبكر لسرطان الرئة (NCT04529915) وسرطان الغدة الدرقية (NCT04742608). وتم أيضاً استقصاء المصائد



الشكل 25: مقارنة الخزعة النسيجية التقليدية مع الخزعة السائلة (Lone et al., 2022).

خارج الخلوية في التجارب السريرية من أجل الكشف، على سبيل المثال، عن السرطانات الخفية لدى المرضى الذين يعانون من الخُثار الوريدي (NCT03781531) وتحديد الإنذار في المرضى الذين لديهم اختطار عالٍ للإصابة بالخُثار الوريدي كما هي الحال في سرطانة الخلايا الكبدية (NCT05040347) والأورام التكاثرية النقوية (NCT04177576) وسرطانات البنكرياس والمعدة والقولون (NCT04294589) وغيرها من التجارب السريرية التي يمكن التعرف عليها من خلال موقع <https://clinicaltrials.gov> (Salviano-Silva et al., 2022).

وفي دراسة حديثة أجريت في العام 2024، وجد الباحثون أنّ التراكيز العالية من cfDNA ميزت المصابين بسرطانة الخلايا الحشرقية squamous cell carcinoma في الرأس والعنق عن الأصحاء، وأنّ هذه التراكيز قد انخفضت تدريجياً مع الزمن بعد استئصال الورم جراحياً. إضافة إلى ذلك فقد اختلفت أطوال شذف الدنا الحر بين الأصحاء ومرضى الورم الأولي والحالات الناكسة (Kowal-Wisniewska et al., 2024). والنتائج هذه كانت مشابهة لنتائج بحث مشابه حول دور cfDNA في كشف سرطانة الخلايا الكبدية ومراقبتها (L. Chen et al., 2024).

ما يجدر ذكره هنا هو أنّ أحدث التوجهات حول استخدام cfDNA هو استخدامه كواصم حيوي في سياق الكشف المبكر عن عدة سرطانات multi-cancer detection في اختبار واحد وكذلك في التنبؤ بحصائل المعالجات المناعية immunotherapy outcomes prediction، وهو ما استعرضته عدة مراجعات ودراسات (Connal et al., 2023; Farooq et al., 2024; H.-Y. Wang et al., 2024; Xu et al., 2024).

الفصل (7) الدنا الحر البلازمي في لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة

Plasma cfDNA in DLBCL

7.1 مقدمة: مبررات التوجه نحو cfDNA

الواصمات الحيوية هي مؤشرات قابلة للكشف تعطي معلومات عن حالة المرض الحالية (أي، التشخيص والاستجابة للعلاج) أو توفر نظرة مسبقة حول حسيطة المرض في المستقبل (الإنذار) أو تنبؤ بالاستجابة لعلاج معين (الواصمات التنبؤية predictive biomarkers). وهذه الواصمات يمكن أن تُشتق مباشرة من خلايا المفوما أو من عمليات حيوية تتأثر بالمرض. وكشف هذه الواصمات يمكن أن يتم في الدم (الواصمات المستندة إلى الدم مثل LDH وحمض البول) أو السوائل الحيوية (الخزعات السائلة مثل cfDNA) أو من الخزعات النسيجية أو مما تعطيه طرائق التصوير الشعاعية (مثل PET-CT) من معلومات (Drees, 2024).

كما ورد سابقاً في الفصل الثاني، تتصف DLBCL، أكثر أنواع المفومات اللاهودجكينية، بأنها مجموعة متغايرة heterogeneous من الأورام التي تحمل شذوذات مورثية متنوعة وتستجيب بشكل متغير للخط الأول للمعالجات الحالية (R-CHOP) مما يجعل حصائل العلاج متغايرة أيضاً. وحتى الآن، فإن تشخيص هذه الأورام يعتمد الطريقة الغازية باستخدام الخزعة النسيجية التي تعتبر الآن "المعيار الذهبي"، ولا يتوافر من الواصمات الحيوية التي تتنبؤ بالحسيطة والاستجابة العلاجية والترقي إلا القليل، وهي، مع ذلك، ليست نوعية (Munoz, 2021; Regazzo et al., 2021; Deshpande, Rimsza, Nowakowski, & Kurzrock, 2024). وقد عُرضت محدوديات وسلبيات الخزعات النسيجية وطرائق التصوير الشعاعية، بما في ذلك PET-CT، في سياق تدبير DLBCL والسرطانات في الفصول السابقة (الثالث والرابع والسادس). ولتجاوز هذه العوائق والمحدوديات والسلبيات في تدبير DLBCL، تم طرح الخزعة السائلة كبديلٍ واعدٍ يتميز بكونه غير غازٍ وأقل تكلفةً ويسمح بسهولة بإجراء الاعتيان التسلسلي ومراقبة التبدلات الديناميكية المحتملة في الأورام في سياق المعالجة (Abel J Bronkhorst et al., 2017; Regazzo et al., 2021; Larrea et al., 2016; al., 2022). ورغم أنَّ الخزعة السائلة

ركزت في البدء على الخلايا الورمية الجوالّة، توجه الاهتمام الآن نحو الحموض النووية الجوالّة أو الحرة (cfRNA /cfDNA) لأنها الأيسر من جهة الاعتيان والتحليل (Abel J Bronkhorst et al., 2022; Regazzo et al., 2021; Siravegna et al., 2017). وتختلف كمية cfDNA بين المرضى وبين أنواع السرطانات، ويُعتقد أنها تعكس عبء المرض حيث توجد الكميات الأكبر عند المرضى ذوي الحالات الأكثر تقدماً أو في المراحل الأخيرة (Siravegna et al., 2017). كما أنّ cfDNA قد يحمل الطفرات النوعية للورم مما يعكس أرضية طفرات الورم الأولي، وبالتالي فهو يمثل وسائط مهمة لاعتيان الأورام دون الغزو الباضع الذي تتطلبه الخزعات النسيجية (Ignatiadis, Lee, & Jeffrey, 2015; Kowal-Wisniewska et al., 2024).

7.2 دور الدنا الحر البلازمي كواصم حيوي في تدبير لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة

كما ورد في الفصلين الأول والثاني، يوجد أكثر من 40 نوعاً فرعياً من اللمفوما استناداً إلى تصنيف منظمة الصحة العالمية (Freedman, Friedberg, et al., 2023). وكان كل من التشخيص السريع والكشف المبكر عن النكس تحدياً كبيراً حيث أنهما يتطلبان عينات من الأنسجة قد يكون الحصول عليها صعباً، وخصوصاً عندما يصعب الوصول إلى موقع الورم كما هي الحال، على سبيل المثال، في حالة لمفوما الجملة العصبية المركزية حيث يمكن أن تكون خزعة الدماغ محفوفة بالمخاطر وصعبة. ولذلك، كان هناك اهتمام كبير باستخدام الخزعة السائلة، على cfDNA مثلاً، كبديل عن الخزعة النسيجية أو متمم لها. وقد تمت دراسة العديد من جوانب الخزعة السائلة مع إمكانية تطبيقها في مراحل مختلفة من المرض (J. K. Lim, Kuss, & Talaulikar, 2021). عديدة هي الدراسات والمراجعات التي تناولت دور استخدام cfDNA كواصم يساهم في تدبير أورام الدم، بما في ذلك DLBCL، كشفها وتشخيصها وتحديد إنذارها واستجابتها للمعالجة وكشف أنواعها الناكسة والمقاومة للعلاج.

7.2.1 دور الدنا الحر البلازمي كواصم حيوي للكشف المبكر والتشخيص

جاء فريق سترون في العام 1989 بأول إثبات على زيادة تراكيز cfDNA في سرطانات متنوعة كان منها حالات من الالبيضاخ النقي الحاد واللمفاوي الحاد والمزمن (Stroun et al., 1989). ورغم أنّ الآلية الدقيقة ليست معروفة بعد في السرطان، يمكن تفسير ارتفاع تراكيز الدنا الحر فيه استناداً إلى أنّ مصادره الرئيسة في البلازما

هي الاستماتة والنخر والتكاثر والإفراز الفاعل (Hu et al., 2021; Rossi, Spina, Bruscaggin, & Gaidano, 2019). وبينما تبدي الخلايا السرطانية فعالية أكبر ضد حدوث الاستماتة، مما يقلل من أهميتها نظرياً كمصدر للدنا الحر من الخلايا الورمية، إلا أنّ هناك زيادة في النخر الخلوي والإفراز الفاعل في الحالة السرطانية (Hu et al., 2017; Siravegna et al., 2021; Ilkhani et al., 2021; al., 2021). فضلاً عن ذلك، فالاستجابة المناعية للجسم (كما هي الحال في تشكيل المصائد خارج الخلوية) تساهم أيضاً في زيادة إطلاق الدنا الحر من الخلايا المناعية والسرطانية على حد سواء (Siravegna et al., 2017; Stroun et al., 1989).

ومع إظهار العديد من الدراسات المتلاحقة ارتفاع تراكيز cfDNA في حالات DLBCL مقارنة بالأصحاء، وإيحاء بعضها بزيادة اختطار حدوث اللمفوما مع زيادة تركيز cfDNA (Bohers et al., 2018; Chamba & Mawalla, 2023; Diez-Feijóo et al., 2024; Eskandari, Manoochehrabadi, Pashaiefar, Zaimy, & Ahmadvand, 2019; Hohaus et al., 2009; Højlund et al., 2023; Kristensen et al., 2016; Mao Li, Jia, Xu, Cheng, & Xu, 2017; M Li & Xu, 2021; J. K. Lim et al., 2021)، إلا أنّ دور هذا الارتفاع في كشف DLBCL المبكر وتشخيصها وتمييزها عن أنواع اللمفوما والسرطانات الأخرى لا يزال محدوداً ويحتاج للمزيد من الدراسة والتعير لأن مجال ارتفاع تراكيز cfDNA كان شديد التباين بين الدراسات التي قارنت مرضى DLBCL مع الأصحاء والتي استخدمت طرائق مختلفة لاستخلاص cfDNA ومعايرته وأنماطاً مختلفة من المرضى، وإن كانت قيم متوسطات تراكيز cfDNA في الدراسات كلها عند المرضى ضعف قيمها على الأقل عند الأصحاء (Arzuaga-Mendez et al., 2019; J. K. Lim et al., 2021; Regazzo et al., 2021).

ومن ناحية أخرى، فإنّ cfDNA ليس نوعياً للسرطانات، فهو يرتفع أيضاً في عمليات فيزيولوجية وحالات مرضية التهابية وارتكاسية وفي سرطانات أخرى (كما ورد في الفصلين السابقين) (Chamba & Mawalla, 2023; J. K. Lim et al., 2021). فضلاً عن ذلك، فإنّ الدنا الحر الجوال في البلازما القادم من الخلايا الورمية (والذي يسمى الدنا الورمي الجوال (circulating tumor DNA)) لا يشكل إلا نسبة ضئيلة من مجموع cfDNA القادم من الخلايا الأخرى السوية في الجسم، وهو ما يعقد عملية تمييز ctDNA التي يتم حالياً تطوير العديد من التقانات لتحقيق هذا الفصل واختبارها بغية الوصول إلى أعلى حساسية ونوعية تتضمن الكشف عن

شاكلة الطفرات المرتبطة بنوع السرطان الرئيس والفرعي (Rossi et al., 2019). والتحدي الآخر الذي يواجه استخدام ctDNA، وخصوصاً في كشف السرطان، هو أنّ تركيزه في المراحل الباكرة أقلّ تقريباً بنحو ألف ضعف منه في المراحل المتقدمة، وهذا يستدعي وجود طرائق فائقة الحساسية لكشفه (Farooq et al., 2024; Fitzgerald,). ومع كل هذا، فمع حالات أورام اللمفوما الأولية التي يصعب الوصول إلى نسيجها، يمكن أن يكون cfDNA وسيلة مساعدة مهمة في كشف طفرات جسدية مفتاحية من عينة البلازما (أو السائل الدماغي الشوكي)، وبالتالي في توجيه مسار التشخيص، وخصوصاً في لمفوما الجملة العصبية المركزية، وفي توجيه المعالجات أحياناً (J. K. Lim et al., 2021).

7. 2. دور الدنا الحر البلازمي كواصم حيوي لتحديد مرحلة الورم والإنذار وتصنيف الاختطار

مع استخدام نظام R-CHOP العلاجي، تحسنت كثيراً معدلات بُقيا مرضى DLBCL في العقدين الأخيرين، إلا أنّ النكس والمرض المقاوم للعلاج يحدثان في نحو 30-40% من المرضى (Miyazaki, 2016; Roschewski,). وهذا يثبت الحاجة لتصنيف درجات اختطار مرضى DLBCL ممن يكبر عندهم احتمال عدم الاستجابة لهذا النظام العلاجي ولتطوير خيارات علاجية فردية، ويبقى حالياً استعراف المرضى ذوي اختطار DLBCL العالي وتحسين حصائلهم العلاجية جزءاً من التحديات في سياق تدبير هذه الأورام (Miaomiao Li, Mi, et al., 2022). ورغم أنّ IPI هو أكثر مؤشرات الإنذار معولية عند مرضى DLBCL، تبقى كفاءته وفاعليته غير مُرضية. وكذلك الأمر بالنسبة للملامح الجزيئية المكتشفة بوساطة الخزعة النسيجية، ورغم اعتبارها واصمات إنذارية ممتازة، تبقى خاضعة لمحدوديات الخزعة النسيجية بما في ذلك الصفة الغازية وتحيز الاعتيان (Chapuy et al., 2018). وفي الإطار ذاته، ورغم افتراض أنّ الطرائق الشعاعية هي المعيار الذهبي لتقييم الاستجابة والكشف المبكر عن النكس، فهي ليست حساسة ولا نوعية بما يكفي، فضلاً عن ارتباطها باختطار التعرض للأشعة (Cottreau et al., 2016; P. Islam, Goldstein, & Flowers, 2019). بناء عليه، فإن تطوير طرائق بديلة يمكن إتاحتها لتطبيق درجات الاختطار وتقييم الاستجابة واستعراف النكس الباكر أمرٌ بالغ الضرورة للتدبير الفعال للمرض.

توحي المقدمات النظرية وبعض الدراسات بارتباط cfDNA مع عبء المرض وإنذاره ودرجة اختطاره (استناداً إلى مؤشرات الإنذار المختلفة) وحصائل البُقا المتدنية في أنواع اللمفوما المختلفة، بما في ذلك DLBCL وأنماطها الفرعية (J. K. Lim et al., 2021). ومع ذلك، فموجودات الدراسات المختلفة تبدي بعض التناقضات ولا يمكن وضعها بسهولة في سياق استنتاجي واحد يقود إلى التطبيق التشخيصي (Arzuaga-Mendez et al., 2019; Chamba & Mawalla, 2023; J. K. Lim et al., 2021; Tavakkoli & Barta, 2023).

حاولت الدراسات استقصاء العلاقة بين مستويات cfDNA ومرحلة الورم وفق تصنيف آن آربر أو لوغانو (الجدول 4؛ ص: 25) وعلامات الإنذار السريرية المختلفة المعتمدة تقليدياً مثل حجم الورم (والمرض الكتلتي) ومؤشرات الإنذار المعتمدة [مثل مؤشر الإنذار العالمي المنقح من قبل الشبكة الوطنية الشاملة للسرطان IPI-NCCN ومكوناته كمرحلة الورم وحالة الأداء ونسبة LDH والعمر (الجدول 5؛ ص: 27)]. ففي دراسة فريق ماو لي Mao Li البحثي في العام 2017 لدور cfDNA الإنذاري، أوحث موجودات البحث بأن تراكيز الأخير العالية كانت مُنبأً بسوء الحصلة لأن نسبة البُقا لمدة سنتين دون ترقى المرض عند المرضى ذوي التراكيز العالية لم تتجاوز 44% مقابل 78% عند المرضى أصحاب التراكيز السوية (Mao Li et al., 2017). وكانت هذه النتائج متقاربة جداً مع نتائج أول دراسة أجريت في هذا السياق (في العام 2009) (F.-T. Wu, Lu, Xu, & Li, 2009) حيث كانت نسبة البُقا لمدة سنتين دون ترقى المرض عند المرضى ذوي التراكيز العالية لم تتجاوز 40% مقابل 88% عند المرضى أصحاب التراكيز السوية (Hohaus et al., 2009). بالمقابل، لم تجد دراسة أخرى أي ارتباط بين تراكيز cfDNA ومعدل البُقا الإجمالي لخمس سنوات (Kristensen et al., 2016).

كما ظهر ارتباط مستويات cfDNA في مرضى DLBCL مع واصمات الإنذار التقليدية مثل LDH وحرز IPI وعبء الورم الاستقلابي المُقاس بتقانة PET-CT في أكثر من دراسة (Bohers et al., 2018; Kurtz et al., 2015; J. K. Lim et al., 2021; Roschewski et al., 2015). وارتبطت أيضاً مستويات cfDNA العالية في مرضى DLBCL قبل المعالجة مع ضعف كل من معدل البُقا الإجمالي overall survival ومعدل البُقا دون أحداث مرضية event free survival في دراسة أخرى (Kurtz et al., 2018). ومن ناحية أخرى، لاحظت إحدى

الدراسات أنّ المرضى المقاومين للمعالجة كانت تراكيز cfDNA عندهم وقت التشخيص أعلى منها عند من وصلوا إلى الهدئة التامة complete remission. كما أظهرت هذه الدراسة ارتباط انخفاض مستويات cfDNA بعد المعالجة مع تحقيق الاستجابة التامة أو الجزئية للعلاج (M Li & Xu, 2017).

كما أظهرت دراسة إيلودي بوهرز Elodie Bohers الفرنسية وزملائها، فضلاً عن ارتفاع تراكيز cfDNA عند مرضى DLBCL، وجود ارتباط بين هذه التراكيز وكل من LDH وحرز IPI ولكن ليس مع مرحلة الورم (Bohers et al., 2018). وفي السياق ذاته، أوضحت موجودات دراسة إيرانية على مرضى DLBCL في العام 2019 بارتباط مستويات cfDNA العالية مع زمن بقيا إجمالي أقصر (الوسيط: 9 أشهر) مقارنة بأصحاب المستويات الأدنى. كما ارتبط في هذه الدراسة تركيز cfDNA مع العمر ووجود الأعراض B وحرز IPI والمراحل المختلفة من الورم (Eskandari et al., 2019).

وفي أحدث دراسة نُشرت في العام 2024 وشملت أنواعاً مختلفة من الللمفوما، بما فيها DLBCL، ارتبط تركيز cfDNA مع كل من النوع الفرعي من الللمفوما ونازعة هيدروجين اللاكتات وحرز IPI ومرحلة الورم وفق أن أربور والأعراض B. وفي 49 حالة من حالات LBCL، انخفض تركيز cfDNA بعد العلاج في الحالات التي حققت الاستجابة الكاملة (CR) في حين ارتفع هذا التركيز عند غير المستجيبين. كما كان وسيط تركيز cfDNA عند التشخيص في المرضى الذين حققوا الاستجابة الكاملة ثم تعرضوا للنكس لاحقاً أعلى بالمقارنة مع مستوياته عند أولئك الذين لم يتعرضوا للنكس (Diez-Feijóo et al., 2024).

وفي مراجعة قامت بها الباحثة جوليا ريغاتسو Giulia Regazzo وزملائها في إيطاليا في العام 2021، تمت دراسة 11 بحثاً ركزت على دور cfDNA كواسم حيوي تنبؤي محتمل في DLBCL. وكانت نتيجة هذه الدراسة أنّ تسعة أبحاث أظهرت أنّ cfDNA يبدي أثراً إنذارياً مستقلاً ذا أهمية إحصائية في حين فشل تحليل التحوف متعدد العوامل multivariate regression analysis في إظهار دور cfDNA الإنذاري. وتحليل المعطيات توصل الفريق البحثي إلى إمكانية استخدام تقييم cfDNA تكاملياً مع أدوات الإنذار الأخرى للحصول على تنبؤ مضبوط ودينامي ومُشخّص لحصيلة المريض (Regazzo et al., 2021).

7. 2. 3 دور الدنا الحر البلازمي كواصم حيوي لكشف الاستجابة العلاجية و/أو متابعة المرض

لاتزال الاستراتيجيات المستندة إلى التصوير، مثل FDG PET-CT، طرائق جذابة غير غازية لتقييم الاستجابة للعلاج مرحلياً Interim وفي نهاية الأشواط العلاجية وقياس المرض المتبقي الأدنى minimal residual disease (MRD) عند مرضى DLBCL في سياق تدبيرهم (Drees, 2024; Swarder & Kurtz, 2023)؛ ولكن التجارب تشير إلى فشل هذه التقنية في تقديم أي فائدة سريرية في هذا السياق نظراً لانخفاض نوعيتها وحساسيتها (Burggraaff et al., 2019; Dührsen et al., 2018; Eertink et al., 2021; Juweid et al., 2021; Kitajima et al., 2019; Swarder & Kurtz, 2023). كما أنّ عبء الإشعاع والخدمات اللوجستية يحظر حالياً إجراء عمليات مسح متكررة جداً (أي بعد كل دورة علاجية) لتصميم العلاج لكل مريض على حدة. وكذلك، ونظراً لأن آفات اللمفوما ليست فقط هي النشطة استقلابياً، فإن نوعية الورم والإيجابية الكاذبة قد يعيقان المراقبة المعتمدة على التصوير المقطعي بالإصدار البوزيتروني (Adams & Kwee, 2018; Barrington et al., 2019; B. D. Cheson et al., 2014; Drees, 2024). وأخيراً، فالدلائل الإرشادية لا تنصح بإجراء PET-CT من أجل التردد والمتابعة (ص52-53).

بالمقابل، ربما توفر الاستراتيجيات المعتمدة على الدم، بما في ذلك اختبارات cfDNA، العديد من الميزات الجذابة؛ فهي تتضمن مصادر يمكن الوصول إليها بسهولة فضلاً عن كونها غير غازية ومفضلة من قبل المرضى وأقل تكلفة اقتصادياً وتسمح بأخذ عينات متكررة في أثناء العلاج والمتابعة. ولذلك، فإمكانية استخدام هذه التقنيات عالية في مجال مراقبة العلاج وتوجيه تعديلات العلاج (Bou Zerdan et al., 2023; Drees, 2024). واحد من أهم تطبيقات cfDNA الأكثر إثارة في DLBCL هو إمكانية استخدامه لتقييم الاستجابة للعلاج (مرحلياً ونهائياً) ومراقبة النكس (Bingham & Spencer, 2020). وقد أوضحت عدة دراسات أهمية cfDNA في تقييم الاستجابة العلاجية المرحلية والنهائية ومتابعة المرضى. ومن هذه الدراسات دراسة استباقية في العام 2018 أثبتت أنّ إجراء الاختبارات على cfDNA من مرضى DLBCL مفيد كمقاربة غير غازية وواقعية وكطريقة متممة لتقانة PET التصويرية عند خط الأساس وخلال تقييم العلاج المرحلي والنهائي والمتابعة في سياق تدبير المرضى. وقد أظهرت الدراسة أنه يجب استقصاء إمكانية استخدام cfDNA في دراسات حشدية كبيرة لإقرار ما

إذا كان ممكناً استخدامهاً بشكل مستقل أم بشكل متمم لتقانات التصوير (Bohers et al., 2018).

وفي دراسة كورتز Kurtz وزملائه، تم استقصاء دور cfDNA في مراقبة الاستجابة العلاجية عند 117 من مرضى DLBCL حيث تم اعتيان الدم عند التشخيص وفي اليوم الأول من كل شوط علاجي. ووجد الباحثون أنّ تحقيق انخفاض بمقدار وحدتين لوغاريتيميتين في cfDNA بعد كل شوط علاجي ترافق مع تحسن في معدل البقيا الخالي من الإحداث لمدة 24 شهراً في المرضى الذين تلقوا معالجة الخط الأول أو الصيانة salvage على حد سواء (Kurtz et al., 2018).

وهناك أيضاً دراسات عديدة استباقية واستعادية أخرى أظهرت فائدة استخدام اختبارات cfDNA و ctDNA في البلازما لمراقبة العلاج المرحلي والنهائي وكشف النكس (Bingham & Spencer, 2020; Diez-Feijóo et al., 2024; Højlund et al., 2023; Kurtz et al., 2018; Miaomiao Li, Mi, et al., 2022; Rossi et al., 2019; Sworder & Kurtz, 2023; F.-T. Wu et al., 2019).

7. 2. دور الدنا الحر البلازمي المحتمل في مراقبة المرض المتبقي الأدنى

يُعرّف المعهد الوطني للسرطان (NCI) في الولايات المتحدة المرض المتبقي الأدنى MRD بكونه مفهوم يصف عدداً قليلاً جداً من الخلايا السرطانية يبقى في الجسم خلال المعالجة أو بعدها. ولا يمكن كشف هذا العدد من الخلايا إلا بطرائق مخبرية شديدة الحساسية تستطيع كشف خلية سرطانية واحدة بين مليون من الخلايا السوية. وقد يساعد كشف MRD في التخطيط للمعالجة أو تقييم نجاحها ونجاعتها أو كشف نكس السرطان أو وضع إنذاره. وأكثر ما يُستخدم اختبار MRD في سرطانات الدم كالمفومات والابيضاضات (NCI, 2024). ورغم أنها لم تُنفذ بعد روتينياً في الممارسة السريرية، فإنّ العديد من التجارب السريرية على مختلف أنواع اللمفوما أثبتت قيمة مراقبة MRD من حيث أنها يمكن أن تساعد في تغيير الأرضية المستقبلية للمرض من خلال المساعدة في تحديد الإنذار (ترقي المرض والبقيا الإجمالية ودون مرض) وفي توجيه استراتيجيات المعالجة وشخصنتها وفي الكشف المبكر للنكس (Cuzzo, Lipsky, & Chheng, 2023).

تتدرج تحت طرائق كشف MRD تقانات وطرائق قابلة لقياس المرض الموجود بمعدل أقل من حساسية الأدوات التقليدية المستخدمة عادة، وتنقسم إلى ثلاث فئات: (1) اختبارات البيولوجيا الجزيئية؛ (2) التعداد الخلوي

الانسيابي flow cytometry؛ (3) تقانات التصوير (Soscia, 2023).

لأن الطرائق التقليدية لا تستطيع كشف MRD عند مرضى DLBCL حيث تقع تحت مستوى حساسية تقانة PET التصويرية (F.-T. Wu et al., 2019)، حاولت العديد من الدراسات اختبار cfDNA و ctDNA لمراقبة النكس و MRD عند مرضى DLBCL وغيرها من السرطانات (Cuzzo et al., 2023; Dogliotti, Drandi, 2017; Genuardi, & Ferrero, 2018; Galimberti et al., 2019; Herrera & Armand, 2017). وفي هذا السياق، أظهرت دراسة فلوريان شيرير Florian Scherer وزملاؤه أن متوسط الزمن الذي ينقضي بين أول كشف لوجود cfDNA بعد الهدأة التامة ووقت ظهور النكس السريري كان 188 يوماً، وكان المرضى الخاضعين للدراسة كلهم خالين من المرض مع سلبية cfDNA بعد 24 شهراً من المتابعة (Scherer et al., 2016). كما أظهرت دراسة أخرى على مرضى DLBCL حققوا الهدأة التامة أن القدرة التنبؤية الإيجابية والسلبية لوجود cfDNA على نكس المرض كانت 88% و 98%، على التوالي، وأن وسيط زمن الظهور هو 105 أيام (Roschewski et al., 2015). قام فريق كورتز Kurtz باختبار دنا البلازما عند 7 مرضى DLBCL حققوا الهدأة التامة وفق نتائج PET/CT بعد أربعة أشواط من المعالجة، وكانت النتائج متوافقة بين عدم كشف الدنا الحر وعلامات الهدأة في التصوير (Kurtz et al., 2015).

وعلى العموم، لا يزال هذا الموضوع قيد الدراسة وإن كانت المعطيات تفترض نظرياً أن الخزعة السائلة على الدنا الحر البلازمي في نهاية معالجة DLBCL قد تكون قادرة على تقسيم مرضى الهدأة التامة (المحددة بناء على PET-CT) إلى مجموعات فرعية إضافية لإنجاز تصنيف اختطار أكثر مضبوطة للنكس. وهذا يحتاج إلى المزيد من التقصي والدراسات (F.-T. Wu et al., 2019).

ثانياً: الدراسة العملية

الفصل (8) المشكلة البحثية للدراسة

Study Research Problem

لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة DLBCL مجموعة من الأمراض المتغايرة heterogeneous من الناحية السريرية والبيولوجية والمورثية والحصيلة العلاجية، وهي أكثر أنماط المفوما الفرعية شيوعاً حيث تشكل نحو 40% من حالات المفوما اللاهوجينية في العالم. وهي بذلك تفرض عبئاً اقتصادياً واجتماعياً كبيراً على المرضى والمحيطين بهم والمجتمع والدولة.

إنَّ طريق تدبير هذه الأورام طويلةٌ ومُرْهَقَةٌ ومُكَلِّفَةٌ، وتتضمن الكثير من الطرائق (النسجية والمخبرية والشعاعية والجراحية) التي تستهدف التحري والتشخيص وتحديد المرحلة والإنذار والمعالجة وتقييم الاستجابة للمعالجة وكشف النكس. وأهم هذه الطرائق هي الخزعات النسيجية والتصوير المقطعي المحوسب CT والمسح المقطعي للانبعاث البوزيتروني Positron emission tomography (PET) scan مع CT أو دونه.

تتصف الطرائق السابقة، كلها أو بعضها، بكونها باضعة (غازية) وباهظة الثمن وتعرّض الجسم أحياناً إلى جرعات عالية من الإشعاع، ولا تتوافر دائماً في الأوضاع الصحية محدودة الموارد فضلاً عن عدم منطقية تكرار الخزعة لتقييم المعالجة وسير المرض وعدم إمكانية الوصول إلى الورم أحياناً للحصول على الخزعة. أضف إلى ذلك افتقار تقانة PET إلى النوعية للأورام، وعدم قدرة هذه التقانة على التقاط عمليات الورم الديناميكية على المستوى الجزيئي، وإعطائها الكثير من حالات السلبية أو الإيجابية الكاذبة وخصوصاً خلال تقييم الاستجابة العلاجية.

ولذلك، وجب التفكير بطرائق بديلة أو متممة لتجاوز هذه المحددات المفروضة في الطرائق التقليدية

المتبعة حالياً في تدبير DLBCL، وقياس cfDNA هو أحد الخيارات في هذا السياق.

الفصل (9) مبررات الدراسة وأهدافها

Study Justifications and Aims

9.1 مبررات الدراسة

- محدوديات طرائق تدبير DLBCL التقليدية (الخزعة النسيجية والتصوير المقطعي بالإصدار البوزيتروني والتصوير الطبقي المحوسب) تفرض البحث عن طرائق بديلة أو متممة تفيد في الوصول إلى أمثل طريقة تدبير وأفضل حصيلة علاجية للمرضى، وتجنبهم الكثير من الحالات غير المبررة التي تسببها تلك المحدوديات كالتعرض للإشعاع والسلبيات والإيجابيات الكاذبة والتكاليف الباهظة وتأخر الكشف عن النكس وتقييم العلاج وتغيير خطته.
- يمكن أن يشكل قياس الدنا الحر cfDNA البلازمي الجوال في الدوران هذا البديل المحتمل الذي يساعد أو يتم هذه الطرائق أو يحل مكانها.
- تتصف اختبارات cfDNA بخصائص تجعلها بديلاً أو متمماً محتملاً في خطوات تدبير DLBCL، وخصوصاً التشخيص والمتابعة وتقييم نجاعة المعالجة. ومن هذه الخصائص الطبيعة الأقل غزواً والتكلفة الأقل والمعلومات عن حالة الورم في الوقت الحقيقي، فضلاً عن القدرة على التغلب على مشكلة تباينية الورم (أو التبدلات النقيية المتعددة) في بعض الحالات وحل مشكلة عدم القدرة على الوصول إلى موقع الورم لأخذ الخزعة. كما يمكن الحصول على عينات cfDNA بطريقة متسلسلة من خلال إجراءات غير غازية (سحب الدم مثلاً)، ولذلك فإنّ تحديد شاكلة cfDNA تمثل كنزاً غير مسبوق من المعطيات المورثية في الزمن الحقيقي والتي يمكن استغلالها لأغراض تشخيصية وإنذارية وعلاجية واسعة النطاق.

9.2 أهداف الدراسة

تهدف الدراسة الحالية إلى:

1. مقارنة مستويات cfDNA بين مجموعة من الأصحاء وعينة من مرضى DLBCL السوريين.

2. دراسة علاقة مستويات cfDNA عند المرضى بمرحلة الورم (وفق تصنيف آن آربور وتصنيف لوغانو)

ومحددات إنذاره (المؤشر الإنذاري العالمي IPI للشبكة العالمية الشاملة للسرطان NCCN).

3. دراسة تبدلات مستويات cfDNA خلال التقييم المرحلي للمعالجة (بعد 3 أشواط من المعالجة حسب

البروتوكول المتبع في المشفى) ودراسة علاقة هذه التبدلات مع التبدلات المخبرية والتبدلات الشعاعية.

ويهدف ذلك كله إلى استكشاف الدور المحتمل للمعايرة الكمية للدنا الحر البلازمي (الجائل في الدوران) cfDNA

كمعايرة روتينية أقل كلفة وغير باضعة بديلة أو متممة للإجراءات المعتمدة حالياً في تشخيص DLBCL وتحديد

مرحلتها وإنذارها ومتابعة علاجها ونكسها.

الفصل (10) طرائق الدراسة

Methods of the Study

10.1 تصميم الدراسة وزمانها

الدراسة رقابية من نمط الحالات والشواهد case-control study. وقد تم إجراؤها في الفترة ما بين شهري كانون الثاني 2019 ونيسان 2023.

10.2 إجازة الدراسة ومكان إجرائها

تمت إجازة إجراء هذه الدراسة من قبل مجلس جامعة دمشق بعد موافقة مجلس قسم الطب المخبري ومجلس كلية الطب البشري. وتم اختيار المشاركين في هذه الدراسة من مشفى البيروني الجامعي بدمشق (وزارة التعليم العالي والبحث العلمي). جرى جمع ما يعني الدراسة من المعلومات الشخصية والسريية والتشخيصية الشعاعية والنسجية والمخبرية المتوفرة في أضاير المشفى بعد موافقة إدارتها والمرضى المشاركين. كما تم إجراء الاختبارات المتبقية من قبل الباحثة التي أجرت القياسات الكيميائية الحيوية والبيولوجية الجزيئية في مخابر كلية الطب البشري بجامعة دمشق (شعبة الكيمياء الحيوية والسريية بقسم الطب المخبري ومخبر البحوث والدراسات الوراثية) ومخابر هيئة الطاقة الذرية.

10.3 حجم العينة ومجموعات الدراسة

تم اللجوء إلى موقع برمجيات OpenEpi (<http://www.openepi.com/SampleSize/SSMean.htm>) لحساب حجم العينة بعد إدخال البيانات المطلوبة لهذا الحساب وهي مجال الموثوقية والقوة الإحصائية وقيمتي المتوسط mean والانحراف المعياري لكل مجموعة. وباستخدام معطيات دراسة حديثة (2017) عرضت نتائجها على شكل وسيط median ومتوسط mean ومجال range (Mao Li et al., 2017)، تم تقدير قيمة الانحراف المعياري المطلوبة لحساب حجم العينة باللجوء إلى معادلة العلاقة بين المجال والانحراف المعياري والتي تنص على أن الأخير

openepi.com/SampleSize/SSMean.htm

Start	Enter	Results	Examples	Help
Sample Size For Comparing Two Means				
Input Data				
Confidence Interval (2-sided)	90%			
Power	80%			
Ratio of sample size (Group 2/Group 1)	2			
	Group 1	Group 2	Difference*	
Mean	222.5	1407.6	-1185.1	
Standard deviation	89	3520		
Variance	7921	12390400		
Sample size of Group 1	28			
Sample size of Group 2	56			
Total sample size	84			
*Difference between the means				

الشكل 26: حساب حجم العينة استناداً موقع برمجيات OpenEpi
<http://www.openepi.com/SampleSize/SSMean.htm>

يساوي تقريباً ربع الفرق بين الحد الأعلى والحد الأدنى من المجال (Taylor, 2019).

كانت قيم cfDNA (بالنانوغرام/مل) في مجموعة الأسوياء في الدراسة المذكورة كالتالي: الوسيط: 209؛ المتوسط: 222.5؛ المجال:

100-456؛ وبالتالي فقيمة الانحراف المعياري المقدرة

وفق المعادلة المذكورة أعلاه هي $(100 - 456) \div 4$ وتساوي: 89. أما قيم cfDNA في مجموعة مرضى اللمفوما فكانت كالتالي: الوسيط: 686؛ المتوسط: 1407.6؛ المجال: 100-14180؛ وبالتالي فقيمة الانحراف المعياري المقدرة وفق المعادلة المذكورة أعلاه هي $(100 - 14180) \div 4$ وتساوي: 3520. تم بعد ذلك إدخال المعطيات السابقة مع مجال الموثوقية (90%) والقوة الإحصائية (80%) وفق افتراضات برمجيات OpenEpi (الشكل 26) مع مضاعفة حجم عينة المرضى مقارنة بعينة الأصحاء، فكان الحد الأدنى المطلوب لحجم العينة هو 28 شخصاً في مجموعة الأسوياء (الشواهد) و56 شخصاً في مجموعة مرضى DLBCL (الشكل 26). وفي النهاية تم إشراك 92 شخصاً (39 أنثى و53 ذكراً) في هذه الدراسة، وتم توزيعهم على مجموعتين:

(1) **المجموعة الأولى:** وهي المجموعة القياسية أو مجموعة الشواهد control، وقد ضمت 28 شخصاً من الأسوياء ظاهرياً (13 أنثى و15 ذكراً)، والمقاربين لمجموعة المرضى من حيث العمر والجنس. وقد تم تطبيق معايير الاستبعاد المذكورة أدناه.

(2) **المجموعة الثانية:** وهي مجموعة مرضى DLBCL، وتألّفت من 26 أنثى و38 ذكراً ليصبح مجموع

المشاركين فيها 64 مريضاً. وكان الشرط الأساسي في اشتغال المريض هو التشخيص الشعاعي والنسجي الحديثين ولأول مرة دون تناول أي علاج.

10. 4 معايير الاستبعاد

بدء المعالجة حتى ولو بشوط واحد فضلاً عن وجود أي قصة سابقة أو حالة مرافقة لأي من الأورام الأخرى أو الداء السكري أو الأمراض القلبية الوعائية أو القصور القلبي أو الكبدى أو الكلوي أو الحمل أو الحالات الالتهابية أو أمراض المناعة الذاتية أو الحمى مجهولة السبب (J. Wu et al., 2019).

10. 5 جمع المعطيات وقياس المتغيرات

بعد الحصول على موافقة إدارة مشفى البيروني، ومن خلال المتابعة والزيارات الدورية للمشفى، تمت دراسة أضاير المرضى للتأكد من توافق حالتهم مع معايير الاشتغال والاستبعاد الموضوعية في البحث. وعندما يتم اختيار مريض للمشاركة كانت الباحثة تتواصل معه للحصول على موافقته على المشاركة في البحث بعد إطلاعه (قراءة أو سماعياً) على الموافقة المستنيرة الخاصة بهذا البحث والتي توضح عنوانه وأهدافه وفوائده والمخاطر المحتملة (الملحق (2)). كذلك تم التوضيح لكل مشارك بأنه لن يتقاضى أي تعويض لقاء مشاركته وأنه يمكنه الانسحاب من الدراسة في أي وقت دون أن يؤثر ذلك على مستوى رعايته الصحية.

تم بعد ذلك الحصول على معلومات المشارك الشخصية ونتائج الإجراءات التشخيصية الشعاعية والنسجية من إضارة المريض. وبعدها تم إجراء باقي القياسات والاختبارات المطلوبة وفق مخطط البحث. وقد تم جمع كل هذه المعطيات في استمارة خاصة بكل مريض معروضة في الملحق (3) وتشمل ما يلي:

1. المعلومات الشخصية: تم الحصول عليها من المقابلة الشخصية مع المريض و/أو إضارته، وتشمل

الاسم والعمر والجنس ورقم الهاتف والرقم التسلسلي الخاص الذي أعطي لكل مشارك في الدراسة.

2. القصة السريرية الحالية والسابقة: وكانت الغاية منها الحصول على المعطيات الخاصة بوجود

DLBCL وتوقيت تشخيصه وكونه التشخيص الأول والنظام العلاجي المقرر فضلاً عن التأكد من عدم

- تلقي أي علاج بعد. ومن ثم تقصي وجود إحدى حالات الاستبعاد أو غير ذلك من الأمراض المرافقة.
3. معطيات التصوير الشعاعي والخزعة النسيجية المتعلقة بالتشخيص وتحديد مرحلة الورم (وفق تصنيف أن بور وتصنيف لوغانو) وإنذاره (وفق أحرار IPI-NCCN) ووجود المرض الكلي.
4. المعطيات المخبرية التي تتضمن تراكيز الكرياتينين وحمض البول والواصم الورمي نازعة هيدروجين اللاكتات LDH ونسبة LDH. كما تضمنت تركيز cfDNA البلازمي الذي تم قياسه بطريقتين هما : مقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب وتقانة التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي qPCR بالزمن الفعليّ real-time qPCR باستخدام صبغة السيانيين الخضراء SYBR Green.

10. 5. 1 معطيات التشخيص وتحديد مرحلة الورم وإنذاره

استناداً إلى الدلائل الإرشادية للشبكة العالمية الشاملة للسرطان (NCCN, 2023):

1. تم اعتماد التشخيص النسيجي المجرى على الخزعة الجراحية الكتلية أو الاستئصالية التي تم أخذها من الكتلة الورمية المثبتة بالتصوير الشعاعي الطبقي المحوري المحوسب، ولم يتم الاعتماد على خزعة الإبرة الدقيقة.
2. تم تحديد مرحلة الورم وفق تصنيف لوغانو (الجدول 4؛ ص: 25)
3. تم اعتماد نظام IPI-NCCN لتحديد إنذار الورم (الجدول 5؛ ص: 27)، وهو يتضمن المحددات التالية:
 - a. مرحلة الورم الثالثة أو الرابعة
 - b. نسبة LDH (وهي حاصل قسمة تركيز LDH عند المريض على القيمة العليا لمجال LDH المرجعي الخاص بالمخبر)
 - c. عمر المريض
 - d. وجود إصابة خارج عقدية
 - e. حالة الأداء (PS) performance status (PS) باعتماد مقياس زوبرود Zubrod (ص 29).
4. تم اعتبار المرض كتلياً إذا كانت العقد اللمفاوية بقطر 7.5 سم فأكثر.

10. 5. 2 اعتيان الدم

بعد صيام ليلة كاملة (12 ساعة على الأقل) للشواهد (28 مشاركاً) والمرضى (64 مشاركاً)، وقبل بدء أي علاج

للمرضى، تم سحب عينة من الدم الوريدي (6 مل) من كل مشارك وتوزيعها بالتساوي في أنبوبين كما يلي:

أ. أنبوب للحصول على المصل (دون أية إضافات) لإجراء الاختبارات الكيميائية (الكرياتينين وحمض

البول وLDH).

ب. أنبوب يحوي مضاد التخثر K₃EDTA (ثلاثي بوتاسيوم رباعي حمض خل الإيثيلين ثنائي الأمين

(tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid) للحصول على البلازما اللازمة لاستخلاص cfDNA

البلازمي ومعايرته.

تم تكرار الاعتيان بالطريقة والشروط ذاتها، إنما للمرضى فقط ممن تمت متابعتهم (41 مريضاً) وذلك

قبل البدء بالنشوط الرابع من المعالجة.

بقيت الدراسات المنشورة لفترة طويلة لا تحوي على تفصيل واضح يحدد أفضلية المصل أو البلازما

لاختبار cfDNA ومعايرته (Elshimali, Khaddour, Sarkissyan, Wu, & Vadgama, 2013). إلا أن مراجعة

منهجية حديثة (Trigg, Martinson, Parpart-Li, & Shaw, 2018) ودراسات عديدة أخرى (Kubackova,

Vrabel, Sedlarikova, Besse, & Sevcikova, 2017; J. K. Lim et al., 2021; Pittella-Silva et al., 2020;

Schroers-Martin et al., 2023; Talotta et al., 2023) أوضحت أنه من المفضل استخدام البلازما (EDTA) بدلاً

من المصل في قياس cfDNA واختباره مع ضرورة البدء بعملية استخلاصه خلال فترة لا تتجاوز 4 ساعات من

سحب الدم. ومن مبررات تفضيل هذه البلازما أن محتوى المصل من cfDNA، ومصدره الرئيس هو خلايا الدم،

يصل إلى 2-24 ضعفاً من محتوى البلازما منه مما يجعل تركيزه في المصل شديد التباين مقارنة بالبلازما. كما

أن هذا التركيز العالي يخفف كثيراً من نسبة تراكيز الدنا الحر ذي المنشأ الورمي ويغير خصائصه البيولوجية

(مثل شاكلة أطوال شدف cfDNA). وتعود هذه الزيادة إلى التلوث بالدنا المجيني الذي ينشأ من تحلل كريات الدم

البيض خلال التخثر عند تحضير المصل. ومما يُذكر هنا هو أن EDTA يخفف تخرب الدنا (Frickhofen et

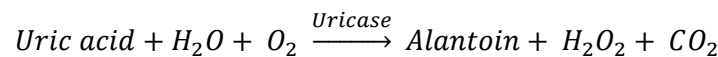
al., 1997).

10. 5. 3 القياسات المخبرية الكيميائية

طريقة معايرة حمض البول

تمت معايرة حمض البول في المصل باستخدام طقم كواشف جاهز من شركة بيوسيسستم BIOSYSTSEMS الإسبانية والذي يعتمد على الطريقة الإنزيمية اللونية (Fossati, Prencipe, & Berti, 1980). تم تنفيذ التعليمات الواردة في نشرة طقم الكواشف لمعايرة حمض البول وفق المبدأ التالي:

يقوم إنزيم اليوريكاز uricase، بوجود الماء والأكسجين، بتحويل حمض البول إلى الألاتونين alantoin وثاني أكسيد الكربون CO₂ والماء الأكسجيني H₂O₂:



يحفز إنزيم البيروكسيداز peroxidase تفاعل H₂O₂ مع 4- أمينو أنتيبيرين 4-aminoantipyrine وثنائي كلور سلفونات الفينول (DCFS) dichlorophenolsulfonate ليتشكل إيمين الكوينون quinoneimine الملون والذي تتناسب شدة لونه (عند طول الموجة 520 nm) مع تركيز حمض البول في العينة:



طريقة معايرة الكرياتينين

تمت معايرة الكرياتينين في المصل بتنفيذ التعليمات الواردة في نشرة طقم كواشف جاهز من شركة بيوسيسستم BIOSYSTSEMS الإسبانية. وهو يعتمد الطريقة وفق المبدأ التالي:

يتفاعل الكرياتينين في العينة مع حمض البيكريك picric acid في الوسط القلوي (هيدروكسيد الصوديوم NaOH) ليتشكل معقد ملون (طريقة جافيه Jaffe). ويتم قياس معدل تشكيل المعقد خلال مدة قصيرة تجنباً للتداخلات (Bartels & Bohmer, 1971; Fabiny & Ertingshausen, 1971; Weber & Van Zanten, 1991). وبناء عليه يتم قياس الكثافة الضوئية للون الناتج (عند طول الموجة 500 nm) بعد 30 و 90 ثانية من إضافة العينة إلى الكواشف ويُحسب الفرق بينهما ليستخدم، بالمقارنة مع فرق الكثافة الضوئية للعياري، في معرفة تركيز كرياتينين العينة.

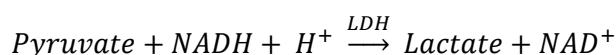
طريقة معايرة نازعة هيدروجين اللاكتات وحساب نسبتها

تمت المعايرة بالطريقة الحرائكية الأنزيمية باستخدام طقم كواشف جاهز من شركة توليب Tulip الهندية وفق

المبدأ التالي (Scientific_Committee, 1982):

تحفز نازعة هيدروجين اللاكتات LDH إرجاع البيروفات pyruvate بالتميم $NADH + H^+$ ليتشكل

اللاكتات lactate ويتأكسد التميم إلى NAD^+ :



ويمكن قياس التركيز التحفيزي من معدل نقص التميم NADH مُقاساً عند طول الموجة 340 nm في درجة الحرارة

37 مئوية. يتم قياس الامتصاصية الصفيرية بعد دقيقة من إضافة المصل إلى الكواشف ومن ثم كل دقيقة لمدة

ثلاث دقائق حتى الحصول على متوسط فرق الامتصاصية بالدقيقة $\Delta A/min$ (طرح كل قياس من القياس الذي

قبله وأخذ متوسط الفروقات). وفعالية LDH (وحدة دولية/ل) $\Delta A/min =$ مضروباً بالعامل 8095 كما هو

موضح في نشرة طقم الكواشف.

أما حساب نسبة LDH فتم بتقسيم تركيزها عند المريض على قيمة الحد الأعلى للمجال المرجعي

(NCCN, 2023)، وقد كان المجال المرجعي المذكور في نشرة طقم الكواشف 230-460 وحدة دولية/ل في

درجة الحرارة 37 مئوية.

10.5.4 استخلاص الدنا الحر البلازمي ومعايرته

أولاً: تحضير البلازما

تمت معالجة عينة الدم خلال ثلاث ساعات من سحبها للحصول على البلازما الخاصة باستخلاص cfDNA. تم

تثقيل عينة الدم بسرعة 1600 دورة/دقيقة، ثم نقل ما مجموعه 1.5 مل من كل عينة بلازما إلى أنابيب إيبندورف

الدقيقة بسعة 1.5 مل. ولإزالة أية أحياز دموية متبقية، تم تثقيل البلازما الناتجة بسرعة 13000 دورة/دقيقة. وقد

تم التثقيل في درجة الحرارة 4 مئوية لمدة 10 دقائق (Jeon et al., 2019). ثم تم نقل المادة الطافية النهائية إلى

أنابيب إيبندورف دقيقة نظيفة واستخدامها مباشرة لاستخلاص cfDNA يدوياً من البلازما (200 مكل).

ثانياً: استخلاص الدنا الحر البلازمي

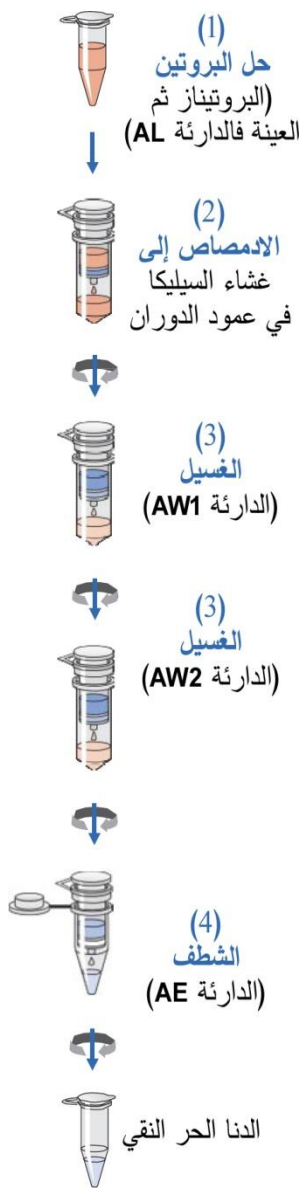
تم استخلاص cfDNA يدوياً مباشرة من البلازما المحضرة (200 مكل) باستخدام طقم الكواشف الجاهز QIAamp DNA Mini Kit (50) من شركة كياج Qiagen الألمانية وحفظ الدنا المستخلص في الدرجة -20 مئوية حتى وقت معايرة cfDNA. تم ذلك بتطبيق تعليمات المصنع المنشورة في كُتيب الشركة QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook (الطبعة الخامسة) (Qiagen, 2016).

أ) محتويات طقم الكواشف QIAamp DNA Mini Kit والمتطلبات الأخرى

يحتوي طقم الكواشف على المكونات التالية:

- أعمدة الدوران الدقيقة (Mini Spin Columns) تسمح بإجراء مراحل تنقية الدنا ضمنها (الشكل 27) باستخدامها في مثقلة قياسية.
- أنابيب الجمع (Collection Tubes) (2 مل).
- 5 أنواع من الدوائر buffers: AL (دائرة حل lyse البروتين) وATL (دائرة حل الأنسجة tissue lyse) وAW1 وAW2 (دارتتان للغسيل washing) وAE (دائرة الشطف elution).
- البروتيناز K (Proteinase K) وهي أحد إنزيمات بروتياز السيرين يُشتق من أحد الفطريات (Engyodontium album). وقد أعطي اسمه الحرف K لأنه يستطيع هضم (حلمة) بروتين كيراتين keratin الشعر .

يمكن تخزين جميع مكونات طقم الكواشف بدرجة حرارة الغرفة (15-25 درجة مئوية) لمدة سنة دون أي تأثير على أدائها. ويمكن أيضاً إطالة صلاحية كاشف البروتيناز K بوضعها بدرجة الحرارة 2-8 درجة مئوية.



الشكل 27: مراحل استخلاص
الدنا الحر في الأعمدة المغزلية
الدقيقة (Qiagen, 2016).

يتطلب الاستخلاص أيضاً كلاً من الإيثانول المطلق (100%) وأنابيب تنفيل 1.5 مل ومثقلة دقيقة microcentrifuge يمكن استخدام أنابيب 2 مل فيها ورجاجة مازجة vortexer ومحم مائي (56 °C).

(ب) تحضير الكواشف

كان كاشف البروتيناز K ودائرة الحل AL جاهزين للاستخدام، أما الدائرتان AW1 و AW2 فقد تم تحضيرهما بإضافة الكحول المطلق (25 مل و 30 مل، على التوالي) إلى المحلول الخزين الموجود في طقم الكواشف كما هو مكتوب على لصاقة كل منهما.

(ج) مبدأ الاستخلاص

تتألف طريقة تنقية الدنا باستخدام كواشف كيامب QIAamp من أربعة مراحل تجري في أعمدة الدوران الدقيقة (الشكل 27): (1) حل البروتينين بإنزيم البروتيناز K وبوجود الدائرة AL؛ (2) ربط الدنا (adsorption) مع غشاء السيليكا في عمود الدوران؛ (3) الغسيل على مرحلتين باستخدام الدائرتين AW1 ثم AW2؛ (4) شطف elution الدنا باستخدام الدائرة AE للحصول على الدنا المنقى purified DNA الحر.

(د) خطوات العمل

وفق تعليمات المصنع، تم وضع عينة البلازما المحضرة والكواشف المحضرة وتمت عمليات التنفيل كلها بدرجة حرارة الغرفة (15-25 درجة مئوية). أما المحم المائي فقد تم ضبطه قبل العمل ليصل إلى درجة الحرارة 56 مئوية. وفيما يلي مراحل العمل التي تم اتباعها:

1. وضع 20 مكل من البروتيناز K في قعر أنبوب تنفيل 1.5 مل.
2. إضافة 200 مكل من البلازما المحضرة إلى أنبوب التنفيل.
3. إضافة 200 مكل من دائرة الحل AL إلى العينة ثم المزج لمدة 15 ثانية باستخدام الرجاجة النبضية. وقد تم المزج بعناية وهدوء حتى الحصول على محلول متجانس لضمان كفاءة الحل.
4. حضن المزيج لمدة 10 دقائق بدرجة الحرارة 56 مئوية (محصول الدنا يصل حده الأعظمي بعد 10 دقائق من الحل ولا تؤثر زيادة وقت الحضن على محصول الدنا المنقى أو جودته).

5. تشغيل الأنبوب قليلاً لإزالة القطيرات عن باطن الغطاء.
 6. إضافة 200 مكل من الإيثانول المطلق إلى العينة والمزج ثانية لمدة 15 ثانية باستخدام الرجاجة النبضية. ومن ثم تشغيل الأنبوب قليلاً لإزالة القطيرات عن باطن الغطاء.
 7. نقل المزيج الذي تم الحصول عليه في الخطوة السادسة بعناية فائقة إلى عمود الدوران الدقيق (في أنبوب الجمع 2 مل) دون ترطيب حافته، ومن ثم إغلاق الغطاء والتثقيب (8000 دورة/دقيقة) لمدة دقيقة واحدة. وبعد التثقيب، تم وضع عمود الدوران في أنبوب جمع نظيف (2 مل) والتخلص من أنبوب الجمع القديم المحتوي على الرشاحة.
 8. فتح عمود الدوران بحذر وإضافة 500 مكل من دائرة الغسيل AW1 إليه دون ترطيب حافته، ومن ثم إغلاق الغطاء والتثقيب (8000 دورة/دقيقة) لمدة دقيقة واحدة. وبعد التثقيب، تم وضع عمود الدوران في أنبوب جمع نظيف (2 مل) والتخلص من أنبوب الجمع القديم المحتوي على الرشاحة.
 9. فتح عمود الدوران بحذر وإضافة 500 مكل من دائرة الغسيل AW2 إليه دون ترطيب حافته، ومن ثم إغلاق الغطاء والتثقيب (13000 دورة/دقيقة) لمدة 3 دقائق.
 10. بعد التثقيب، تم وضع عمود الدوران في أنبوب جمع جديد (2 مل) والتخلص من أنبوب الجمع القديم المحتوي على الرشاحة ومن ثم التثقيب بالسرعة القصوى لمدة دقيقة واحدة.
 11. وضع عمود الدوران في أنبوب تثقيب نظيف 1.5 مل والتخلص من أنبوب الجمع القديم المحتوي على الرشاحة. ومن ثم فتح عمود الدوران بحذر وإضافة 200 مكل من دائرة الشطف AE إليه وحضنه لمدة دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ثم تثقبه (8000 دورة/دقيقة) لمدة دقيقة واحدة.
- تم تقسيم الرشاحة الناتجة (الدنا الحر) من كل عينة بين أنبوبي إيبندورف وحفظهما في درجة الحرارة -20 مئوية لحين إجراء المعايرة الكمية.

ثالثاً: قياس تركيز الدنا الحر ونقاوته بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب

تم إجراء القياس الكمي لتركيز الدنا في العينة المستخلصة (2 مكل) باستخدام جهاز قياس التراكيز النانوي



(النانودروب) نانو فيو بلس NanoVue Plus (رقم: MBBD5-L7-NVP) من شركة GE Healthcare UK Limited البريطانية. يوجد هذا الجهاز في هيئة الطاقة الذرية بدمشق، ويستند إلى مبدأ قياس الطيف الضوئي بأطوال موجات الأشعة فوق البنفسجية UV.

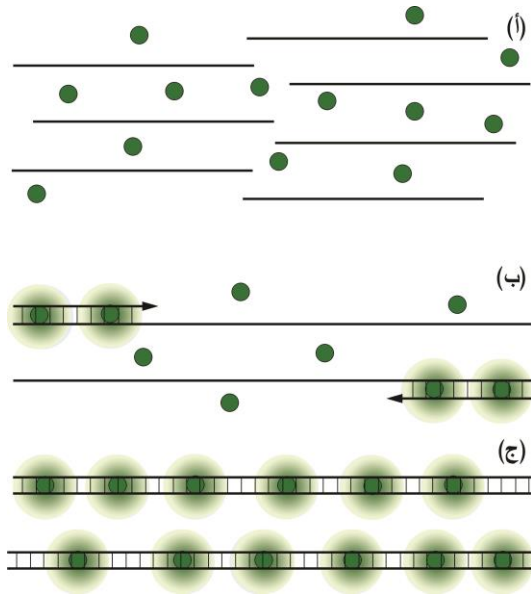
وفق إرشادات شركة كياج، تم استخدام الماء المقطر كناسع blank وجرى قياس الكثافة الضوئية عند طول الموجة 260 nm لحساب تركيز cfDNA. تم أيضاً قياس الكثافة الضوئية عند طول الموجة 280 nm ومن ثم تقسيم قيمة الامتصاص الأولى (260 nm) على قيمة الامتصاص

الثانية (280 nm) لتحديد مدى نقاوة الدنا (Qiagen, 2016). وتعتبر البحوث أنَّ حاصل هذه القسمة بين 1.7 و2.0 يكون مقبولاً كدليل على نقاوة الدنا مع كون النسبة المثالية هي 1.8، وأنَّ القيم الأقل تشير إلى التلوث بالبروتين أو الفينول (Bruijns, Hoekema, Oomens, Tiggelaar, & Gardeniers, 2022)؛ وقد جاءت قيم هذه النسبة مقبولة في كل عينات الدراسة. وأخيراً تم ضرب قيمة الامتصاصية عند طول الموجة 260 nm بالعامل 50 للحصول على تركيز الدنا الحر في العينة (مكغ/مل) استناداً إلى كون محلول الدنا النقي ذي التركيز 50 مكغ/ل يعطي الكثافة البصرية الأعلى (قيمة الامتصاصية = 1.0) عبر مسار في خلية طولها 10 مم (Desjardins & Conklin, 2010).

رابعاً: قياس تركيز الدنا الحر بالتفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي qPCR بالزمن الفعلي

(أ) مبدأ بروتوكول qPCR بالزمن الفعلي

يستند PCR الكمي على مبدأ أن عدد جزيئات الدنا يتضاعف بعد كل دورة في الظروف المثلى. والنموذجي هو قياس كمية الدنا الموجودة بعد كل دورة من دورات PCR في الزمن الفعلي على شكل مقدار التآلق fluorescence الصادر من صبغة التآلق التي ترتبط بالدنا مضاعف الطاق الناتج. وهكذا تزداد شدة التآلق بالتناسب مع تركيز



الشكل 28: دور صبغة التآلق (أخضر سايبير) في PCR الكمي (Glick & Patten, 2017).

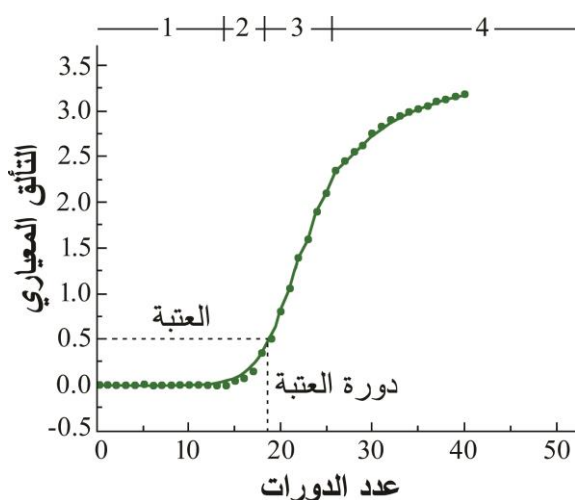
الدنا مضاعف الطاق الناتج. أحد أنواع هذه الصبغات هي تلك التي أنتجتها شركة سايبير SYnergy BRands, Inc. (SYBR)، وتسمى أخضر سايبير SYBR green. تختلف الصبغات في حساسيتها تجاه أنواع الحموض النووية وعدد الطيقان، لكنها عموماً لا ترتبط بالدنا أحادي الطاق [(أ) في الشكل 28]، بل تبدأ بالارتباط بينما يتم تخليق الدنا مضاعف الطاق [(ب) في الشكل 28]، وترتبط مع الدنا المضخم مضاعف الطاق [(ج) في

الشكل 28]، ولا تُصدرُ التآلق إلا عندما ترتبط بالدنا مضاعف الطاق (Glick & Patten, 2017).

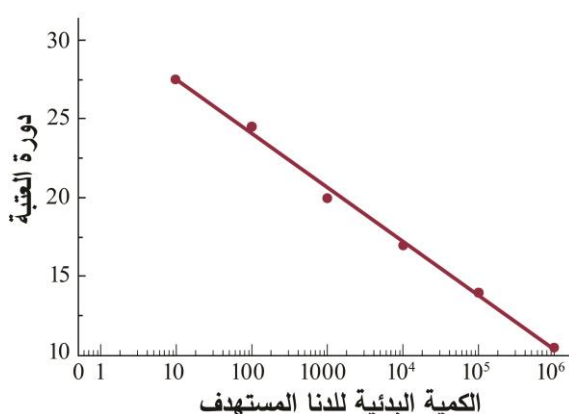
ويجري PCR في الزمن الفعلي على أربعة أطوار (الشكل 29) (Glick & Patten, 2017):

(1) الطور الأول أو الخطي الذي يستمر نحو 10-15 دورة عموماً، ولا يزداد انبعاث التآلق في كل دورة فوق مستواه في الخلفية، وبالتالي لا يمكن التعويل على قياسه.

(2) الطور الثاني أو الأسّي المبكر: يكون قد تم إنتاج كمية من الدنا مضاعف الطاق تكفي لزيادة كمية التآلق فوق مستوى العتبة، أي أعلى بشكل مهم من مستواه في الخلفية. ويُطلق على الدورة التي يحدث فيها ذلك اسم دورة العتبة (threshold cycle (C_T)).



الشكل 29: أطوار التألق الأربعة في PCR الكمي (Glick & Patten, 2017).



الشكل 30: المنحنى المعياري المستخدم لحساب كمية نواتج PCR من التألق (Glick & Patten, 2017).

تتناسب قيمة C_T عكساً مع كمية الدنا المُستهدف في العينة الأصلية، ويتم الاستناد إليها في رسم المنحنى المعياري (الشكل 30) الذي يساعدنا على تحديد تركيز الدنا المُستهدف في العينة.

(3) **الطور الثالث أو الأسّي:** تستمر كمية التألق في التضاعف مع استمرار تضاعف كمية الدنا المضخم في كل دورة، ويفيد قياس التألق هنا في تحديد تركيز الدنا المُستهدف في العينة الأصلية.

(4) **الطور الرابع أو طور الهضبة المنبسطة:** تصبح مكونات التفاعل محدودة، ولذلك لا يكون قياس شدة التألق مفيداً في تحديد تركيز الدنا المُستهدف في العينة.

ولقياس كمية الدنا المُستهدف في العينة، يتم أولاً توليد المنحنى المعياري (الشكل 30) بإجراء

التخفيف المتسلسل لعينة الضبط (عدد معروف من نسخ الدنا المُستهدف). يتم رسم المنحنى من قيم C_T لكل تخفيف مقابل الكمية البدئية المعروفة للدنا. ويمكن بعد ذلك تحديد عدد نسخ الدنا المُستهدف في عينة الاختبار من خلال الحصول على قيمة C_T لعينة الاختبار واستقراء الكمية البدئية من المنحنى المعياري.

ب) الأجهزة والكواشف ومكوناتها وتحضيرها

تمت معايرة cfDNA البلازمي المستخلص بتقانة التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمية بالزمن الفعلي لمورثة الغلوبين بيتا **globin-β Gene** باستخدام صبغة السيانيين الخضراء SYBR Green (أخضر سايبير) في مختبر الدراسات والبحوث الوراثية بكلية الطب – جامعة دمشق حيث أجريت التفاعلات جميعها في جهاز

Techne Quantica Real Time PCR System من شركة Barloworld Scientific Ltd (المملكة المتحدة) مع استخدام:

1. طقم كواشف سايبير ماستر للتفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي qPCR SybrMaster من شركة جينا بيوسينس Jena Bioscience الألمانية والذي يحوي الكاشف الرئيس (جاهز للعمل) وماء PCR الخاص، ويمكن حفظهما بعيداً عن الضوء لفترة طويلة بدرجة الحرارة -20 مئوية وثلاثة أشهر فقط بدرجة الحرارة 4 مئوية:

- مزيج سايبير ماستر qPCR المصمم للقياس الكمي للدنا في العينات بالزمن الفعلي. وهو يحوي جميع الكواشف المطلوبة في qPCR عدا الدنا المرصاف template والمشرعين primers على شكل محلول جاهز للاستخدام. ويتكون هذا المحلول من:

- بوليميراز الدنا الذي يكون مشبّطاً بالأضداد antibody-blocked hot-start polymerase بدرجة الحرارة العادية ويزول هذا التثبيط ويبدأ البوليميراز عمله فقط في درجة الحرارة المرتفعة (95 درجة مئوية).
- أنواع النوكليوتيدات منزوعة الأكسجين الأربعة (dATP و dCTP و dGTP و dTTP).
- أملاح كلور البوتاسيوم KCl وكبريتات الأمونيا $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ وكلور المغنيزيوم MgCl_2 .
- صبغة أخضر السايبر القابلة للإقحام في الدنا SYBR® Green DNA intercalator dye. وهي صبغة من السيانين لا تتألق إلا عندما ترتبط مع الدنا مضاعف الطاق (الشكل 28) مع خاصيتي الثباتية العالية وعدم القدرة على تثبيط عملية PCR. وتتناسب شدة التألق مع تركيز الدنا في عينة البلازما.
- بعض الإضافات والمواد الحافظة التي تعمل على استقرار المزيج.

- ماء PCR الخاص فائق النقاوة والعقيم والخالي من إنزيمات الرناز RNase والدناز DNase والبروتيناز.

2. مشرعان 2 primers أحادي الطاق يُخاصران مورثة الغلوبين بيتا globin-β Gene. وقد تم شراؤهما من شركة Alpha DNA الكندية: المشرع المتقدم forward، وتسلسله 5'-TGCACGTGGATCCTGAGAACT-3' والمشرع العكسي reverse، وتسلسله 5'-AATTCTTTGCCAAAGTGATGGG-3' (Ireng, Robert, & Gala, 2005). وقد تم تحضيرهما وفق التعليمات المذكورة من المصنع:

- تحضير محلول المشرع الخزين: تم أولاً مزج المسحوق على الرجاجة ومن ثم التثقيب لترسيب كامل الكمية

في القعر وإزالة أي جزء عالق بالغطاء. وُضع بعد ذلك المسحوق في الثلج وتمت، وبعبارة فائقة، إضافة الماء النقي الخاص بالمشرع إلى مسحوق المشرع في الأنبوب (يكون هذا الماء خالياً من إنزيمات الرناز والدناز والبروتيناز؛ ويتم حساب كمية الماء المطلوبة إضافتها بضرب عدد نانومولات المشرع في الأنبوب بالعدد 10):

- كانت كمية المشرع في مسحوق المشرع المتقدم 55618 بيكومول (وتساوي 55.618 نانومول) ولذلك وجبت إضافة 556 مكل ماء للحصول على المحلول الخزين للمشرع المتقدم الذي يحوي 100 مكمول.
- كانت كمية المشرع في مسحوق المشرع العكسي 73730 بيكومول (وتساوي 73.730 نانومول) ولذلك وجبت إضافة 737 مكل ماء للحصول على المحلول الخزين للمشرع العكسي الذي يحوي 100 مكمول.
- ترك المحلول الخزين بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق.
- تحضير محلول العمل: مزج المحلول الخزين جيداً ومن ثم تخفيفه بالماء الخاص بنسبة 1 إلى 10 في أنابيب ابيندورف معقمة للحصول على محلول العمل الذي يحوي 10 مكمول من المشرع.
- توزيع محلول العمل في أنابيب بحيث يحتوي كل منها على ما يكفي لإجراء 20 اختبار qPCR (20 مكل مع إضافة 2 مكل تجنباً للفقدان خلال العمل).
- تفريز المحلولين (الخزين والعمل) في درجة الحرارة -20 مئوية حتى استخدامهما.

ج) الإجراءات العملي

تم إجراء qPCR للعينات (عند التشخيص وبعد 3 أشواط من المعالجة) على ثلاث دفعات (17 عينة و 79 عينة و 45 عينة) مع 5 عينات عيارية معروفة التركيز في كل دفعة (المنحنى المعياري والنتائج للدفعات الثلاث معروضة في الملحق 4).

تم إجراء تفاعلات PCR لكل عينة في مزيج qPCR الرئيس qPCR master mix بحجم 20 مكل [10 مكل من مزيج سايبير ماستر و 1 مكل من كل مشرع و 3 مكل من ماء PCR فائق النقاوة و 5 مكل من العينة المستخلصة (تحتوي المرصاف template)]. ومن أجل ذلك تمت التحضيرات التالية:

- بعد إحضار الكواشف والعينات إلى درجة حرارة الغرفة، تم تحضير مزيج qPCR الرئيس بحجم يفيض عما يكفي للعينات بحيث تضاف كمية لازمة لعينة واحدة مقابل كل 12 عينة. ويتكون المزيج لكل عينة من 10 مكل من مزيج سايبير ماستر و 1 مكل من كل مَشْرَع و 3 مكل من ماء PCR فائق النقاوة (15 مكل).
- إضافة 15 مكل من المزيج السابق إلى كل من آبار الصفيحة الخاصة.
- إضافة 5 مكل من العينة والعياريات إلى الآبار.
- المزج بهدوء وبشكل جيد.
- إغلاق الصفيحة بلاصق معقم خاص.
- تقليل المزيج للتأكد من تجميع المحلول كاملاً في القعر.
- بدء التفاعلات في الجهاز وفق الجدول التالي [50 درجة مئوية لمدة دقيقتين ثم 95 درجة مئوية لدقيقتين (التمسيخ الابتدائي وتفعيل البوليميراز) ثم 40 دورة PCR بدرجة حرارة 95 مئوية لمدة 15 ثانية (تمسيخ) و 60 مئوية لمدة 60 ثانية (بلمرة)]:

Program Details

Stage:	New Stage							
Function	Status	Set To	Step Number	Temperature	Hold Time	Ramp Rate	Inc/Dec Temp	Inc/Dec Time
Stage Type	Stepped		1	50°C	00:02:00	MAX		
Heated Lid	On	105°C	2	95°C	00:02:00	MAX		
Number of Cycles	1							
Final Hold	Off							
Number of Reads	0							

Stage:	New Stage							
Function	Status	Set To	Step Number	Temperature	Hold Time	Ramp Rate	Inc/Dec Temp	Inc/Dec Time
Stage Type	Stepped		1	95°C	00:00:15	MAX		
Heated Lid	On	105°C	2	60°C	00:01:00	MAX		
Number of Cycles	40							
Final Hold	Off							
Number of Reads	1							

(يحتوي الملحق 4 المنحنيات المعيارية والنتائج الخاصة بكل دفعة من الدفعات الثلاث)

10. 6 التحليل الإحصائي

تم عرض النتائج بعرض المتوسط $\pm$ الانحراف المعياري SD للمتغيرات المستمرة والعدد (النسبة المئوية) للمتغيرات الفئوية. ومن ثم تم إجراء الاختبارات الإحصائية باستخدام الإصدار 22.0 من برمجيات SPSS (شركة IBM Inc، شيكاغو، الولايات المتحدة الأمريكية Chicago, Illinois) حيث تمت مقارنة قيم المتوسطات باستخدام اختبار اختبار t-test والمتغيرات الفئوية باستخدام اختبار مربع كاي Chi-square. وتم تقييم الارتباطات correlations بين المتغيرات باستخدام تقنية ارتباط بيرسون Pearson's correlation technique متبوعاً بتحليل التحوف الإمدادي الثنائي logistic binary regression (لحساب نسبة الأرجحية odds ratio). بالإضافة لذلك، فقد تم استخراج مساحة المنطقة الواقعة أسفل منحنى (AUC) خاصية تشغيل المستقبل receiver operating characteristic curve (ROC). كما تم استخدام خطية بلاند-ألتمان Bland-Altman plot لتقييم مدى توافق نتائج النانودروب مع نتائج qPCR والفروق بينهما. وفي كل الحالات تم اعتبار قيمة P الأقل من 0.05 ذات دلالة إحصائية. وتم رسم مخططات التباين والارتباطات باستخدام الإصدار الثامن من برمجيات GraphPad Prism (GraphPad software Inc.).

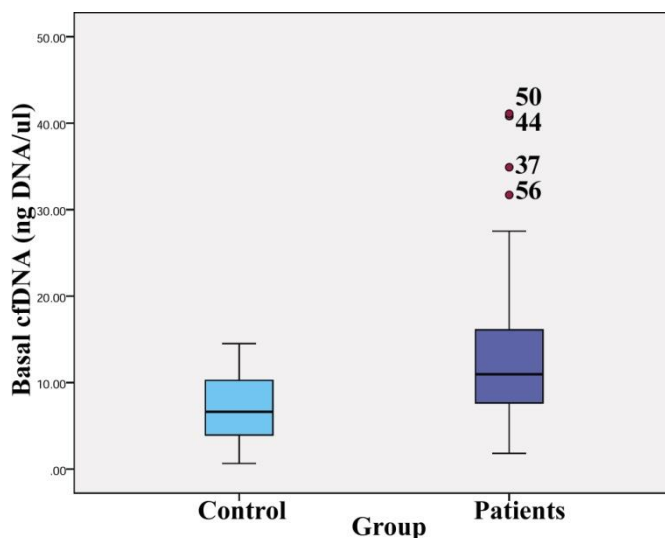
الفصل (11) نتائج الدراسة

Study results

1.1. 1 الاعتيان والمشاركون

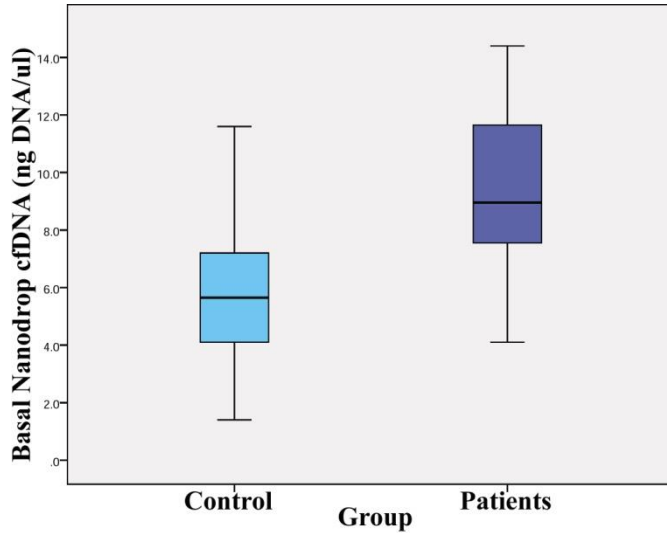
تم اعتيان الدم من 28 شاهداً و67 مريضاً عند التشخيص و45 مريضاً وقت متابعة العلاج (المجموع: 140 عينة). تم إجراء الاختبارات الكيميائية الروتينية، ومن ثم قياس كمية cfDNA لجميع العينات على ثلاث دفعات: 17 ثم 79 ثم 45، بما مجموعه 141 عينة (الملحق 4) حيث تم تكرار إحدى العينات فاستُخدم متوسط القياسين لهذه العينة في التحليل الإحصائي لاحقاً. وبعد تجميع النتائج، وقبل إجراء التحليل الإحصائي، لم تعط إحدى العينات أي نتيجة بتحليل qPCR فتم حذفها وعدم إدخالها في التحليل الإحصائي. ثم تم حذف النتائج الكاملة لثلاثة مرضى (تشخيص خطأ أو اكتشاف ورم آخر) عند التشخيص والمراقبة (6 عينات qPCR). وكذلك تم حذف نتيجة أحد المرضى عند المراقبة بسبب عدم التمكن من الحصول على التصوير الشعاعي له بعد الشوط الثالث. وبذلك فقد أصبح عدد تحاليل qPCR المحذوفة 8 وعدد تحاليل qPCR الداخلة في التحليل الإحصائي 133 تحليلاً [28 شاهداً و64 مريضاً عند التشخيص (خط الأساس) و41 مريضاً بعد 3 أشواط من المعالجة].

1.1. 2 كشف القيم الناشئة في معطيات نتائج qPCR والنانودروب ودراسة توزيعها



الشكل 31: النواشر في معطيات نتائج qPCR.

كما يتضح في الشكل 31، أظهرت نتائج التحليل الإحصائي (تحليل ← إحصائيات وصفية ← استكشاف) وجود 4 قيم ناشئة (نواشر outliers) في نتائج qPCR للمرضى كانت قيمها 31.70 (العينة 56) و34.90 (العينة 37) و40.90 (العينة 44) و41.10 (العينة 50).



الشكل 32: غياب النواشر في معطيات نتائج النانودروب.

ومن ناحية أخرى، لم يظهر التحليل الإحصائي وجود أية قيمة ناشرة في نتائج النانودروب (الشكل 32).

إحدى طرائق التعامل مع النواشر هي إضافة القيمة واحد إلى قيمة الحالة الأقرب لأصغر قيمة شاذة ووضع الناتج كقيمة بديلة للنواشر (B. Barton & Peat, 2014). كانت قيمة الحالة الأقرب

لأصغر قيمة شاذة في الدراسة 27.5 نانوغرام/مكل، وبإضافة القيمة 1 تصبح النتيجة 28.5، وهي التي وضعت كقيمة بديلة لجميع النواشر الأربعة.

ومع إمكانية إجراء الاختبارات الإحصائية المتثابتية للعينات التي يتجاوز عددها 25 عينة، تمت دراسة توزيع معطيات الدراسة بعد تصحيح النواشر، وبدا هذا التوزيع نظامياً أو قريباً من النظامية مما يسمح بعرض نتائج قياسات المتثابتات على شكل متوسط (M) mean وانحراف معياري (SD) standard deviation، وبإجراء الاختبارات المتثابتية (t-test) والأنوفا واختبار بيرسون للارتباطات ومربع كاي) في التحليل الإحصائي لنتائج الدراسة (B. Barton & Peat, 2014).

11. 3 عرض إجمالي النتائج

يعرض الجدول 10 خصائص المرضى المختلفة المتعلقة بالمرض، أما الجدولان 11 و12 فيعرضان نتائج الدراسة الأنثروبومترية والمخبرية، الإجمالية وحسب الجنس، على التوالي، لكل مجموعة من مجموعتي الدراسة. كما يعرض الجدول 13 مقارنة بين قيم المعطيات الشعاعية والمخبرية عند المرضى عند التشخيص (خط الأساس) وقبل بدء الشوط الرابع من المعالجة (تقييم المعالجة).

الجدول 10: عرض الخصائص السريرية لمرضى DLBCL المشاركين في الدراسة، وكان نظام R-CHOP هو العلاج المستخدم عندهم جميعاً.

الخاصية	العدد (%)	الخاصية	العدد (%)
مرحلة الورم (آن آر بور):		مرحلة الورم (لوغانو):	
I	8 (12.50)	محدود	27 (42.19)
II	21 (32.81)	متقدم	37 (57.81)
III	11 (17.19)	حز حالة الأداء:	
IV	24 (37.50)	1-0	25 (39.06)
حز إنذار IPI-NCCN (الاختطار):		3-2	33 (51.56)
1 - 0 (منخفض)	10 (15.63)	4	6 (9.38)
3 - 2 (متوسط - منخفض)	13 (20.31)	المرض الكتلي:	
5 - 4 (متوسط - مرتفع)	30 (46.88)	لا	51 (79.69)
6 فأكثر (مرتفع)	11 (17.18)	نعم	13 (20.31)

الجدول 11: مقارنة متوسطات المتغيرات المدروسة بين مجموعتي الدراسة عند التشخيص (خط الأساس).

المعطيات	المجموعة 1 (الشواهد)				المجموعة 2 (مرضى DLBCL)				الاعتداد
المشاركون	الإجمالي				28				64
	إناث (عدد/ %)				13 (46.4%)				26 (40.6%)
	ذكور (عدد/ %)				15 (53.6%)				38 (59.4%)
المتابعة	M	SD	الدنيا	الغظمي	M	SD	الدنيا	الغظمي	P
العمر (بالسنوات)	46.75	18.01	20	75	51.31	15.45	21	77	NS
الكرياتينين (ملغ/دل)	0.87	0.17	0.52	1.21	1.09	0.23	0.48	1.60	****
حمض البول (ملغ/دل)	5.57	1.06	3.9	7.9	5.51	0.86	3.9	7.8	NS
LDH (وحدة دولية/ل)	284.4	42.7	179	365	441.2	188.7	221	850	****
نسبة LDH	0.62	0.09	0.39	0.79	0.96	0.41	0.48	1.85	****
الدنا الحر cfDNA (نغ/دنا/مكل)									
بتقانة qPCR	7.07	3.76	0.64	14.50	12.71	7.20	1.81	28.50	****
مقياس الطيف الضوئي (النانودروب)	5.98	2.83	1.4	11.6	9.33	2.68	4.1	14.4	****

cfDNA: الدنا الحر البلازمي؛ DLBCL: لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة؛ LDH: نازعة هيدروجين اللاكتات؛ M: قيمة المتوسط؛ qPCR: تفاعل البوليميراز السلسلي الكمي؛ SD: الانحراف المعياري.

[قيمة p حسب الاختبار t: NS: أكثر من 0.05 (غير معتد بها إحصائياً)؛ ****: أقل من 0.0001].

الجدول 12: مقارنة متوسطات المتثابتات المدروسة وفق الجنس ضمن كل من مجموعتي الدراسة عند التشخيص (خط الأساس) واعتداد الفرق بينها (P) وفق الاختبار t (t-test).

المتثابتة	المجموعة 1 (الشواهد)					المجموعة 2 (مرضى DLBCL)				
	إناث (13)		ذكور (15)		قيمة	إناث (26)		ذكور (38)		قيمة
	SD	M	SD	M	P	SD	M	SD	M	P
العمر (بالسنوات)	19.80	45.69	16.96	47.67	NS	15.21	50.12	15.77	52.13	NS
الكرياتينين (ملغ/دل)	0.17	0.82	0.15	0.92	NS	0.24	1.01	0.21	1.15	*
حمض البول (ملغ/دل)	0.73	5.15	1.18	5.93	*	0.95	5.62	0.80	5.44	NS
LDH (وحدة دولية/ل)	46.6	278.9	40.0	289.1	NS	207.7	420.7	176.1	455.2	NS
نسبة LDH	0.10	0.61	0.09	0.63	NS	0.45	0.91	0.38	0.99	NS
حجم أكبر كتلة/عقدة (ملم)	- -	- -	- -	- -	NS	35.92	48.96	32.08	52.68	NS
الدنا الحر cfDNA (نغ/دنا/مكل)										
بتقانة qPCR	4.24	6.59	3.38	7.48	NS	6.70	12.51	7.61	12.84	NS
مقياس الطيف الضوئي (النانودروب)	3.35	5.94	2.42	6.01	NS	2.89	8.75	2.48	9.72	NS

cfDNA: الدنا الحر البلازمي؛ DLBCL: لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة؛ LDH: نازعة هيدروجين اللاكتات؛ M: قيمة المتوسط؛ qPCR: تفاعل البوليميراز السلسلي الكمي؛ SD: الانحراف المعياري. [قيمة p حسب اختبار t المزدوج: NS: أكثر من 0.05 (غير معتد بها إحصائياً)؛ *: أقل من 0.05].

الجدول 13: مقارنة قيم متوسطات المتثابتات المدروسة عند التشخيص (خط الأساس) وتقييم المعالجة (بعد ثلاثة أشواط من المعالجة الكيميائية) في مجموعة مرضى DLBCL الذين تمت متابعتهم (41 مريضاً).

الاعتداد (P)	عند تقييم المعالجة				عند التشخيص				
	الدنيا	SD	M	الغظمي	الدنيا	SD	M	الغظمي	
NS	1.70	.60	0.25	1.10	1.55	0.48	0.22	1.07	الكرياتينين (ملغ/دل)
NS	7.30	3.90	0.81	5.73	7.8	3.9	0.84	5.51	حمض البول (ملغ/دل)
NS	899	217	176.0	433.2	850	238	184.3	439.4	LDH (وحدة دولية/ل)
NS	1.95	0.47	0.38	.94	1.85	0.52	0.40	0.96	نسبة LDH
****	88.0	4.0	15.64	17.27	130.0	14.0	32.76	49.93	حجم أكبر كتلة/عقدة (ملم)
الدنا الحر cfDNA (نغ/دنا/مكل)									
****	7.81	0.01	1.99	3.19	28.5	1.81	6.74	12.33	بتقانة qPCR
****	9.70	1.20	2.02	4.69	14.1	5.0	2.44	9.27	مقياس الطيف الضوئي (النانودروب)

cfDNA: الدنا الحر البلازمي؛ DLBCL: لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة؛ LDH: نازعة هيدروجين اللاكتات؛ M: قيمة المتوسط؛ qPCR: تفاعل البوليميراز السلسلي الكمي؛ SD: الانحراف المعياري. [قيمة p حسب اختبار t المزدوج: NS: أكثر من 0.05 (غير معتد بها إحصائياً)؛ ****: أقل من 0.0001].

11. 4 مقارنة المعطيات بين المجموعتين وحسب الجنس

11. 4. 1 الجنس والعمر

أظهر الاختبار الإحصائي توافق المجموعتين من حيث الجنس، حيث تقاربت نسبنا الإناث إلى الذكور بين مجموعة الشواهد (15/13) ومجموعة مرضى DLBCL (38/26) وكانت قيمة $P < 0.05$ (الجدول 11). وكما يتضح من الجدول 11 أيضاً، فقد كانت المجموعتان (الشواهد ومرضى DLBCL) متوافقتين من حيث العمر (بالسنوات) أيضاً (18.01 ± 46.75 مقابل 15.45 ± 51.31 ، على الترتيب)، وكانت قيمة $P < 0.05$.

11. 4. 2 حمض البول والكرياتينين

يعرض الجدول 14 معطيات حمض البول والكرياتينين في مجموعتي الشواهد والمرضى، وهو يُظهر تقارب قيم حمض البول بين مجموعتي الدراسة حيث أظهر اختبار t-test عدم وجود فرق يُعتد به إحصائياً بين المتوسطين ($P < 0.05$). أما الكرياتينين فقد تباين بين المجموعتين المدروستين بشكل يُعتد به إحصائياً ($P > 0.0001$) حيث كانت قيمه (متوسط $\pm$ انحراف المعياري؛ ملغ/دل) أعلى في مجموعة المرضى (0.23 ± 1.09) مقابل الشواهد (0.17 ± 0.87).

أظهرت المقارنة بين الإناث والذكور ضمن كل مجموعة أن قيم حمض البول والكرياتينين أعلى عند الذكور مقابل الإناث باستثناء قيم حمض البول في مجموعة المرضى التي كانت أعلى عند الإناث مقابل الذكور. ومع ذلك، لم يكن الفرق معتدلاً به إحصائياً إلا في قيم حمض البول عند الشواهد ($P > 0.05$) والكرياتينين عند المرضى ($P > 0.05$) (الجدول 12).

الجدول 14: مقارنة متوسطات قيم الاختبارات الكيميائية بين مجموعتي الدراسة عند التشخيص (خط الأساس).

الاعتداد	المجموعة 2 (مرضى DLBCL)				المجموعة 1 (الشواهد)				المتأينة
	الغظمى	الدنيا	SD	M	الغظمى	الدنيا	SD	M	
NS	7.8	3.9	0.86	5.51	7.9	3.9	1.06	5.57	حمض البول (ملغ/دل)
****	1.60	0.48	0.23	1.09	1.21	0.52	0.17	0.87	الكرياتينين (ملغ/دل)

DLBCL: لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة؛ M: قيمة المتوسط؛ SD: الانحراف المعياري. [قيمة p حسب الاختبار t : NS: أكثر من 0.05 (غير معتد بها إحصائياً)؛ ****: أقل من 0.0001].

الجدول 15: مقارنة متوسطات قيم LDH ونسبتها بين مجموعتي الدراسة عند التشخيص (خط الأساس).

الاعتداد	المجموعة 2 (مرضى DLBCL)				المجموعة 1 (الشواهد)				المتابطة
	الغظمي	الدنيا	SD	M	الغظمي	الدنيا	SD	M	
****	850	221	188.7	441.2	365	179	42.7	284.4	LDH (وحدة دولية/ل)
****	1.85	0.48	0.41	0.96	0.79	0.39	0.09	0.62	نسبة LDH

DLBCL: لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة؛ LDH: نازعة هيدروجين اللاكتات؛ M: قيمة المتوسط؛ SD: الانحراف المعياري. [قيمة p حسب الاختبار t : ****: أقل من 0.0001].

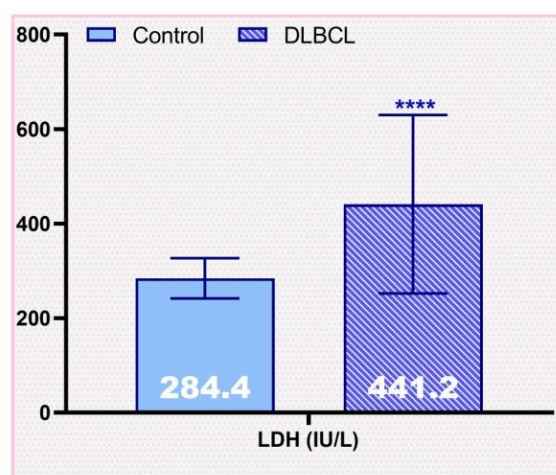
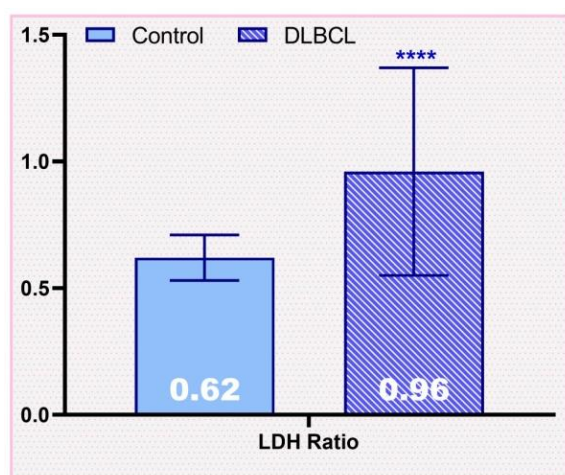
11. 4. 3 نازعة هيدروجين اللاكتات ونسبتها

كانت قيمتا متوسطي كل من نازعة هيدروجين اللاكتات LDH ونسبتها أعلى عند مجموعة المرضى (441.2 ± 188.7 و 0.41 ± 0.96 ، على التوالي) مقارنة بالشواهد (284.4 ± 42.7 و 0.09 ± 0.62 ، على التوالي)، وكان الفرق ذا اعتداد إحصائي ($P > 0.0001$ في الحالتين) (الجدول 15 والشكل 33). ولم يظهر التحليل الإحصائي تأثيراً للجنس على مستوى LDH ونسبتها في مجموعتي الدراسة ($P < 0.05$) (الجدول 12).

11. 4. 4 الدنا الحر البلازمي المُقاس بتقانة التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي و بمقياس الطيف

الضوئي باستخدام جهاز النانودروب

كما هو معروض في الجدول 16 وفي الشكل 34، أظهر الاختبار الإحصائي (t -test) أن قيم الدنا الحر cfDNA البلازمي (نغ/دنا/مكل) المقاسة بتقانة التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي qPCR بالزمن الفعلي عند



الشكل 33: مقارنة متوسطات قيم نازعة هيدروجين اللاكتات LDH (وحدة دولية/ل) ونسبتها LDH Ratio بين مجموعة الشواهد control ومجموعة مرضى لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة DLBCL عند التشخيص (خط الأساس). [****: قيمة p حسب الاختبار t أقل من 0.0001]

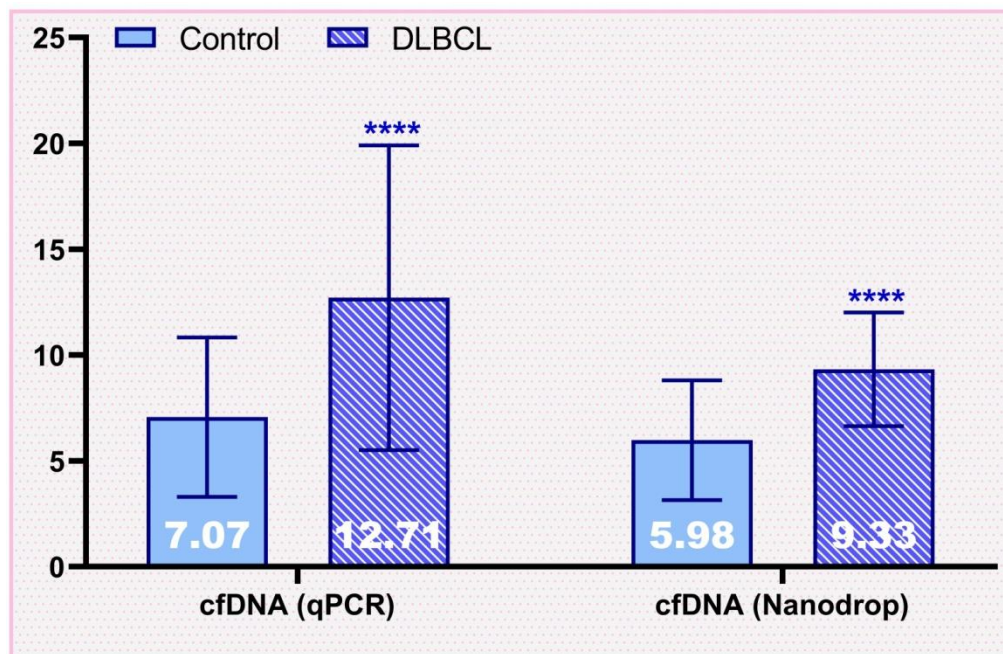
المرضى (7.20 ± 12.71 ؛ المجال: $1.81 - 28.50$) أعلى بشكل معتد به إحصائياً ($P > 0.0001$) بنحو ضعف منها عند الشواهد (3.76 ± 7.07 ؛ المجال: $0.64 - 14.50$). وبالمثل، فقد كانت قيم cfDNA البلازمي (نغ/دنا/مكل) المُقاسة بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب عند مرضى DLBCL (2.68 ± 9.33 ؛ المجال: $4.1 - 14.4$) أعلى بشكل معتد به إحصائياً ($P > 0.0001$) من القيم عند الشواهد الأسوياء ظاهرياً (2.83 ± 5.98 ؛ المجال: $1.4 - 11.6$) (الجدول 16 والشكل 34). ولم تُظهر مقارنة قيم متوسطات cfDNA البلازمي المُقاس بتقانة التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي qPCR وبمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب بين الإناث والذكور ضمن كل من المجموعتين فرقاً معتداً به إحصائياً ($P < 0.05$) (الجدول 12).

الجدول 16: مقارنة متوسطات قيم الدنا الحر cfDNA البلازمي (نغ/دنا/مكل)، المُقاس بتقانة التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي qPCR و بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب ، بين مجموعتي الدراسة عند التشخيص (خط الأساس).

الاعتداد	المجموعة 2 (مرضى DLBCL)				المجموعة 1 (الشواهد)				المتابطة
	الغظمي	الدنيا	SD	M	الغظمي	الدنيا	SD	M	
****	28.50	1.81	7.20	12.71	14.50	0.64	3.76	7.07	بتقانة qPCR
****	14.4	4.1	2.68	9.33	11.6	1.4	2.83	5.98	النانودروب

DLBCL: لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة؛ M: قيمة المتوسط؛ SD: الانحراف المعياري.

[قيمة p حسب الاختبار t : NS: ****: أقل من 0.0001].



الشكل 34: مقارنة متوسطات قيم الدنا الحر cfDNA البلازمي (نغ/دنا/مكل)، المُقاس بتقانة التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي qPCR و بمقياس الطيف الضوئي (النانودروب) Nanodrop، بين مجموعة الشواهد control ومجموعة مرضى لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة DLBCL عند التشخيص (خط الأساس).

11.5 مقارنة المعطيات المخبرية عند المرضى وقت التشخيص وفق الخصائص السريرية

يعرض الجدول 17 نتائج التحليل الإحصائي لمقارنة متوسطات حمض البول ونسبة LDH و cfDNA (بتقانة qPCR) حسب الخصائص المختلفة للورم (مرحلته وفق آن بور ووفق لوغانو، ووجود المرض الكتلي، وحرز الإنذار وفق IPI-NCCN) وحسب حرز

حالة الأداء.

الجدول 17: مقارنة المعطيات المخبرية وفق خصائص الورم في مجموعة مرضى DLBCL عند التشخيص (خط الأساس).

مرحلة/ قيمة		حمض البول (ملغ/دل)		نسبة LDH		cfDNA (نغ/مكل)	
العدد	مرحلة/ قيمة	M	SD	M	SD	M	SD
مرحلة الورم (آن آر بور)							
8	1	5.70	0.76	1.08	0.38	12.67	9.42
21	2	5.23	0.60	1.01	0.46	13.63	7.15
11	3	5.27	0.63	0.94	0.41	14.02	7.82
24	4	5.80	1.08	0.88	0.38	11.31	6.35
قيمة P:		أكبر من 0.05					
مرحلة الورم (لوغانو)							
27	محدود	5.29	0.61	1.04	0.45	13.66	7.86
37	متقدم	5.67	0.98	0.90	0.38	12.01	6.70
قيمة P:		أكبر من 0.05					
حرز حالة الأداء							
25	1	5.44	0.74	1.05	0.43	12.26	7.11
28	2	5.47	1.00	0.97	0.43	14.32	8.02
5	3	5.82	0.86	0.82	0.20	7.19	3.18
6	4	5.73	0.77	0.64	0.21	11.62	2.80
قيمة P:		أكبر من 0.05					
حرز الإنذار (IPI-NCCN)							
10	0 – 1	5.61	0.80	1.08	0.40	16.04	7.99
13	2 – 3	5.18	0.65	1.06	0.46	9.73	5.43
30	4 – 5	5.49	0.98	0.93	0.41	13.01	7.66
11	6 فأكثر	5.85	0.72	0.82	0.35	12.37	6.39
قيمة P:		أكبر من 0.05					
المرض الكتلي							
51	لا	5.34	0.77	0.94	0.42	13.23	7.26
13	نعم	6.19	0.91	1.02	0.39	10.64	6.86
قيمة P:		أقل من 0.05		أكبر من 0.05			

cfDNA: الدنا الحر البلازمي؛ DLBCL: لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة؛ IPI-NCCN: المؤشر الإنذاري العالمي IPI المنقح من قبل الشبكة الوطنية الشاملة للسرطان NCCN؛ LDH: نازعة هيدروجين اللاكتات؛ M: قيمة المتوسط؛ SD: الانحراف المعياري.

وكما يتضح من الجدول، لم يظهر التحليل الإحصائي اختلافاً معتداً به إحصائياً ($P < 0.05$) في قيم حمض البول ونسبة LDH و cfDNA (بتقانة qPCR) بين مراحل الورم المختلفة (آن بور ولوغانو) وأحرار حالة الأداء (وفق مقياس زوبرود) وأحرار الاختطار (وفق IPI-NCCN). وكانت النتائج في السياق ذاته بالنسبة لوجود المرض الكتلي باستثناء الارتفاع المعتد به إحصائياً ($P > 0.05$) في متوسط تركيز حمض البول عند المرضى ذوي الآفة الكتلية (العدد: 13؛ القيمة: 6.19 ± 0.91 ملغ/دل) مقابل المرضى الآخرين (العدد: 51؛ القيمة: 5.34 ± 0.77 ملغ/دل).

11. 6 عرض ارتباطات الدنا الحر البلازمي المُقاس بتقانة qPCR مع باقي المتغيرات

تمت دراسة ارتباط كل من نسبة LDH و cfDNA المُقاس بتقانة qPCR مع المتغيرات الأخرى في كل من المجموعتين وفي مجموع المشاركين بالدراسة عند خط الأساس.

الجدول 18: قيم معامل ارتباط بيرسون (r) والاعتداد الإحصائي لارتباط cfDNA المُقاس بتقانة qPCR ونسبة LDH مع المتغيرات المدروسة الأخرى في المجموعة الأولى (الشواهد) والثانية (مجموعة مرضى DLBCL) والثالثة (مجموع المشاركين في الدراسة) عند خط الأساس.

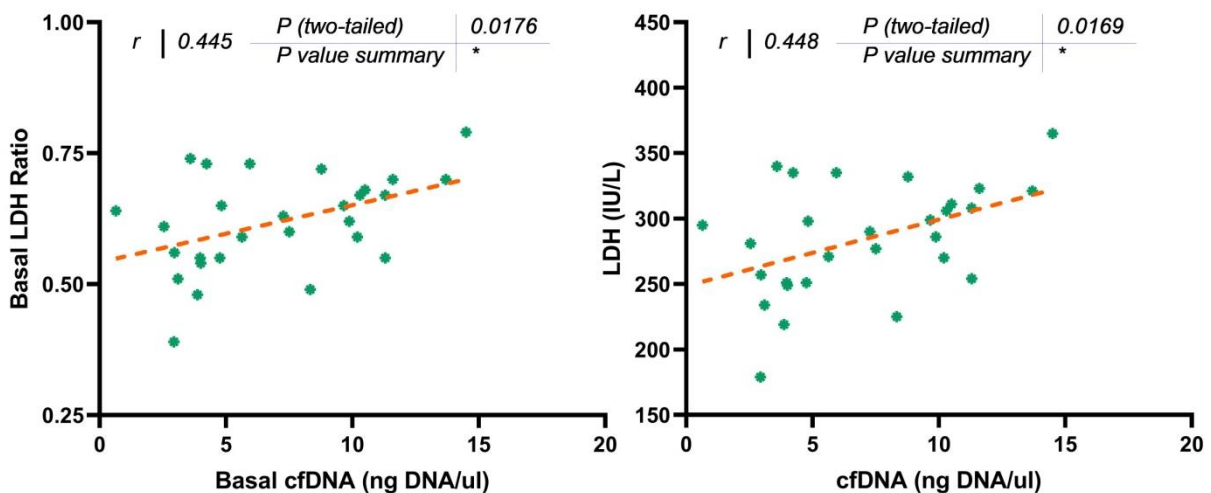
المجموعة (العدد)	الشواهد (28)	المرضى (64)	المجموع (92)	المتباينة
cfDNA	نسبة LDH	cfDNA	نسبة LDH	cfDNA
+0.242	+0.127	-0.030	-0.002	+0.72
+0.243	+0.294	-0.123	-0.011	+0.103
- -	- -	+0.357**	+0.622***	- -
-0.086	+0.186	-0.046	+0.46	-0.058
+0.448*	- -	+0.442**	- -	+0.508***
+0.448*	- -	+0.442**	- -	+0.508***

cfDNA: الدنا الحر البلازمي؛ DLBCL: لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة؛ qPCR: التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي. [الاعتداد الإحصائي: الارتباط معتد به عند مستوى 0.05 (*) أو 0.01 (**) أو 0.001 (***).]

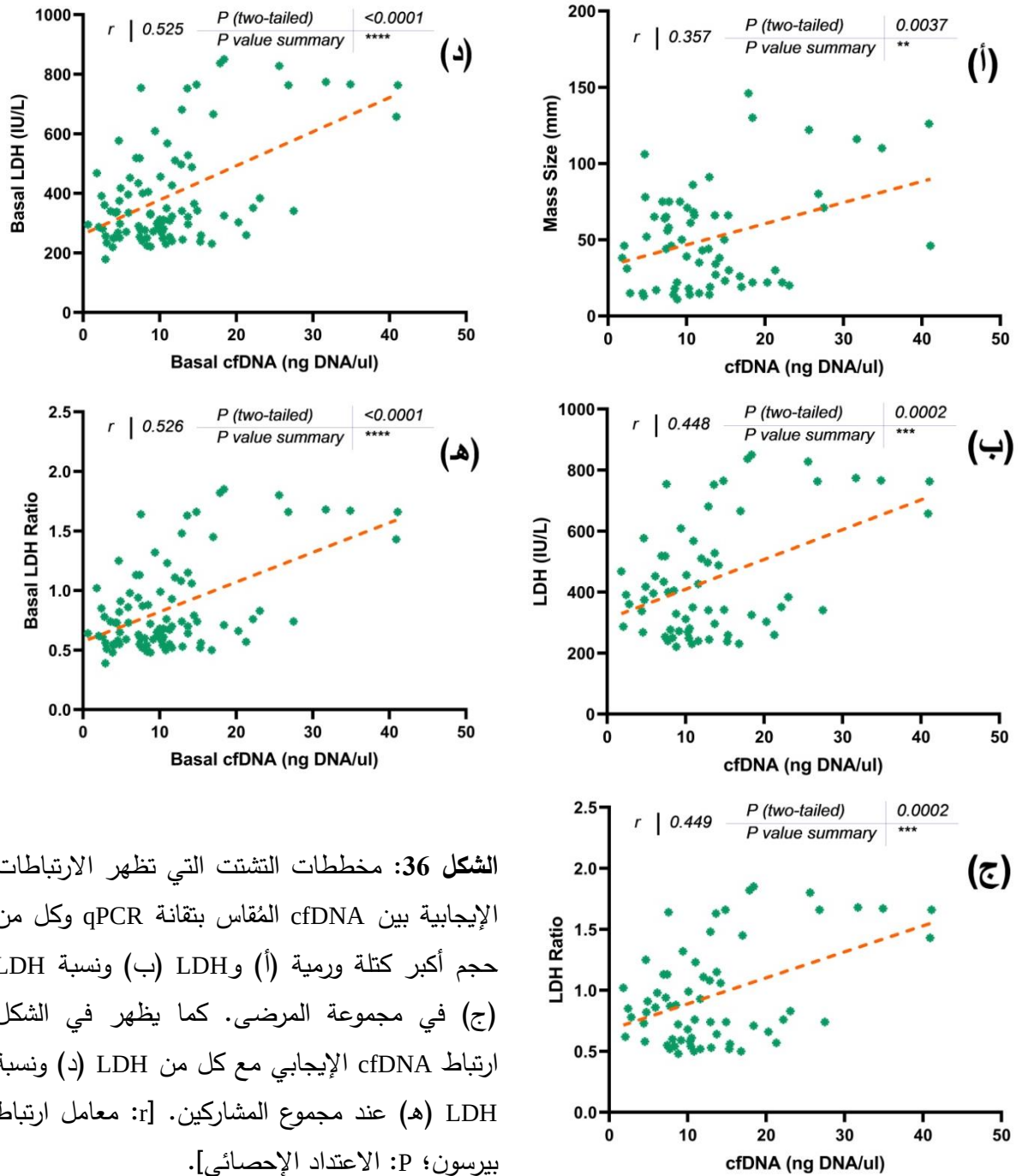
أظهرت النتائج (الجدول 18 والشكلان 35 و 36) أن ارتباطات cfDNA المعتد بها إحصائياً شملت فقط

ارتباطه مع كل من حجم أكبر كتلة ورمية في مجموعة المرضى ($r = 0.357$ ؛ $P > 0.01$) و LDH ونسبة LDH في

مجموعة الشواهد ومجموعة المرضى ومجموع المشاركين.



الشكل 35: مخططا التشتت اللذان يظهران ارتباط cfDNA المُقاس بتقانة qPCR الإيجابي مع LDH ونسبة LDH في مجموعة الشواهد. [r: معامل ارتباط بيرسون؛ P: الاعتداد الإحصائي].



الشكل 36: مخططات التشتت التي تظهر الارتباطات الإيجابية بين cfDNA المقاس بتقانة qPCR وكل من حجم أكبر كتلة ورمية (أ) وLDH (ب) ونسبة LDH (ج) في مجموعة المرضى. كما يظهر في الشكل ارتباط cfDNA الإيجابي مع كل من LDH (د) ونسبة LDH (هـ) عند مجموع المشاركين. r : معامل ارتباط بيرسون؛ P : الاعتداد الإحصائي].

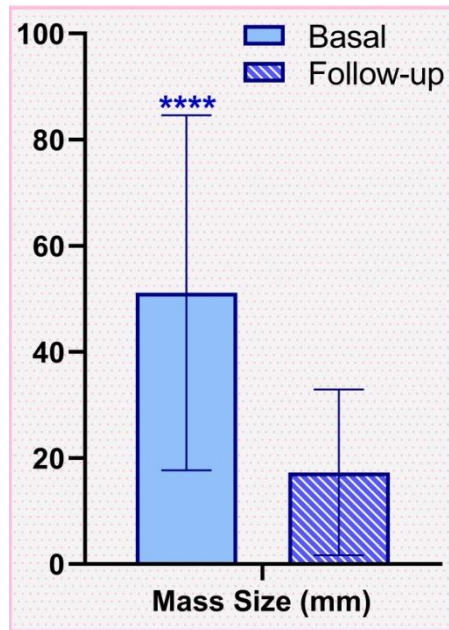
ومن ناحية أخرى، وإضافة إلى ارتباطها المذكور أعلاه مع cfDNA، اقتصر الارتباط المعتد به

إحصائياً لنسبة LDH على ارتباطها مع حجم أكبر كتلة ورمية في مجموعة المرضى ($r = 0.622$; $P > 0.001$)

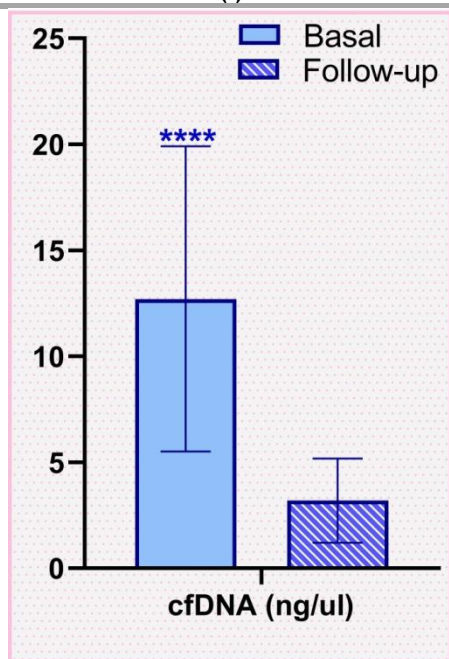
(الجدول 18). أما باقي الارتباطات المعروضة في الجدول 18 فكانت كلها دون الاعتداد الإحصائي.

11.7 مقارنة المعطيات في مجموعة المرضى بين التشخيص والمتابعة

عرض الجدول 13 نتائج مقارنة قيم متوسطات المتتابعات المدروسة عند التشخيص (خط الأساس) والمتابعة في



(أ)



(ب)

الشكل 37: مقارنة متوسط قيم كل من حجم كتلة الورم الكبرى (أ) و cfDNA (ب) بين خط الأساس Basal (عند التشخيص) والمتابعة follow-up (قبل بدء الشوط الرابع من المعالجة الكيميائية) عند 41 مريضاً تمت متابعتهم. [****: $P > 0.0001$].

مرضى DLBCL الذين تمت متابعتهم (41 مريضاً) باستخدام اختباري t للعينات المستقلة independent والمزدوجة paired samples test. يظهر من الجدول 13 غياب الاعتداد الإحصائي لتبدلات متوسطات قيم الكرياتينين وحمض البول و LDH ونسبة LDH بين التشخيص ووقت تقييم المعالجة.

بالمقابل، انخفض مستوى كل من حجم أكبر كتلة (من 32.76 ± 49.93 إلى 15.64 ± 17.27 مم) و cfDNA (من 6.74 ± 12.33 إلى 1.99 ± 3.19 نغ/مكل)، واتصف هذان التبدلان بعد 3 أشواط علاجية بالاعتداد الإحصائي ($P > 0.0001$) (الجدول 13 والشكل 37).

تم بعد ذلك حساب النسب المئوية لتبدلات حجم أكبر كتلة ورمية ونسبة LDH المصلية (وهي من المتتابعات المستخدمة عادة لتقييم الاستجابة المرحلية للعلاجية) فضلاً عن حساب النسبة المئوية للتغير في قيم cfDNA بين وقت التشخيص ووقت المتابعة (قبل

بدء الشوط 4 من المعالجة) عند مرضى DLBCL الذين تمكنت الباحثة من متابعتهم (41 مريضاً). وهذه التبدلات معروضة، مع قيم cfDNA، في الجدول 19.

الجدول 19: قيم cfDNA وقت التقييم والنسب المئوية لتبدلات المتغيرات المهمة في مراقبة الاستجابة العلاجية وقت تقييم مرضى DLBCL (41 مريضاً) مقارنة بخط الأساس (عند التشخيص).

المتغيرات	M	SD
الدنا الحر بتقانة qPCR (نغ/مكل)	3.19	1.99
انخفاض cfDNA (%)	69.64	21.39
نقصان حجم الورم (%)	62.07	17.58
انخفاض نسبة LDH (%)	11.21-	56.45

cfDNA: الدنا الحر البلازمي؛ DLBCL: لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة؛ LDH: نازعة هيدروجين اللاكتات؛ M: قيمة المتوسط؛ qPCR: تفاعل البوليميراز السلسلي الكمي؛ SD: الانحراف المعياري.

وبدراسة الارتباطات فيما بين هذه النسب

المئوية للتبدلات فضلاً عن قيم cfDNA وقت تقييم

المعالجة، ظهر أن النسبة المئوية لانخفاض حجم

كتلة الورم البدئية ارتبطت ارتباطاً إيجابياً ذا اعتداد

إحصائي مع قيم cfDNA عند المتابعة (معامل

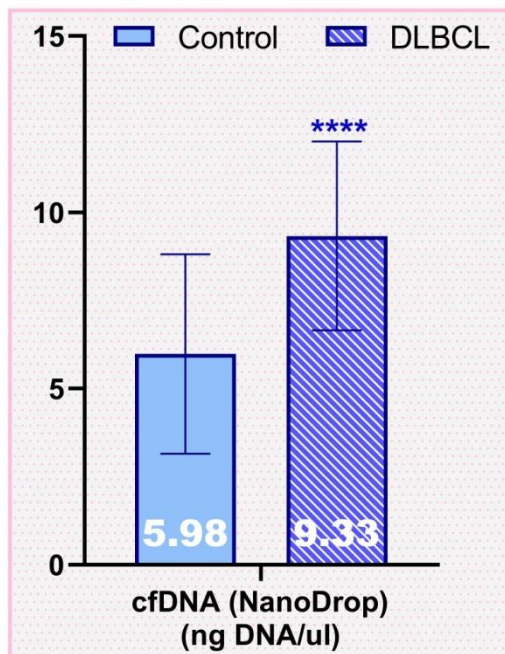
بيرسون "r": 0.421؛ $P > 0.01$) ولكن ليس مع

النسبة المئوية لانخفاض cfDNA (r: -0.269؛

$P > 0.089$) ولا النسبة المئوية لانخفاض نسبة LDH (r: -0.262؛ $P > 0.064$).

11. 8 عرض نتائج cfDNA البلازمي المقاس بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب وارتباطاتها

11. 8. 1 قيم cfDNA البلازمي المقاس بجهاز النانودروب عند خط الأساس



الشكل 38: مقارنة متوسط قيم cfDNA المقاس بجهاز النانودروب عند التشخيص بين مجموعة الشواهد control والمرضى DLBCL. [****]: $P > 0.0001$.

أظهر الاختبار الإحصائي t-test ارتفاع متوسط قيم

cfDNA المقاس بجهاز النانودروب عند مرضى

DLBCL وقت التشخيص (9.33 ± 2.68 ؛ المجال:

4.1 – 14.4) بشكل معتد به إحصائياً ($P > 0.0001$)

مقارنة بمجموعة الشواهد الأسوياء (5.98 ± 2.83 ؛

المجال: 1.4 – 11.6) (الجدول 11 والشكل 38).

أما فيما يتعلق بارتباطات قيم cfDNA المقاس

بجهاز النانودروب مع قيم المتغيرات الأخرى في

مجموعتي الدراسة ومجموع المشاركين فقد جاءت

متوافقة مع ارتباطات قيم cfDNA بتقانة qPCR فضلاً

عن ارتباطهما معاً ارتباطاً إيجابياً معتداً به إحصائياً في

المجموعات الثلاث (الجدول 20).

الجدول 20: قيم معامل ارتباط بيرسون (r) والاعتداد الإحصائي لارتباط cfDNA المقاس بتقانة qPCR والمقاس بجهاز الناندروب Nanodrop (نغ/مكل) مع المتغيرات الرئيسية المدروسة الأخرى في المجموعة الأولى (الشواهد) والثانية (مجموعة مرضى DLBCL) والثالثة (مجموع المشاركين في الدراسة) عند خط الأساس.

المجموعة (العدد)	الشواهد (28)	المرضى (64)	المجموع (92)	المتغيرات
qPCR	الناندروب	qPCR	الناندروب	qPCR
+0.873***	– –	+0.299*	– –	+0.505***
+0.242	+0.303	–0.030	+0.21	+0.166
– –	– –	+0.334**	+0.775***	– –
–0.086	–0.116	–0.046	–0.008	–0.054
+0.448*	+0.519**	+0.442**	+0.558***	+0.599***
+0.448*	+0.519**	+0.442**	+0.558***	+0.599***

cfDNA: الدنا الحر البلازمي؛ DLBCL: لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة؛ qPCR: التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي. [الاعتداد الإحصائي: الارتباط معتد به عند مستوى 0.05 (*) أو 0.01 (**) أو 0.001 (***)].

ولم تظهر مقارنة قيم cfDNA بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز الناندروب بين الجنسين في المجموعتين أية فروق معتد بها إحصائياً ($P < 0.05$) (الجدول 12). وكذلك، وكما هي حال نتائج qPCR (الجدول 17)، لم تظهر التحليلات الإحصائية اختلافاً معتداً به إحصائياً ($P < 0.05$) في قيم متوسطات cfDNA بجهاز الناندروب بين مراحل الورم المختلفة وأحراز حالة الأداء وأحراز الاختطار ووجود المرض الكتل من عدمه (الجدول 21).

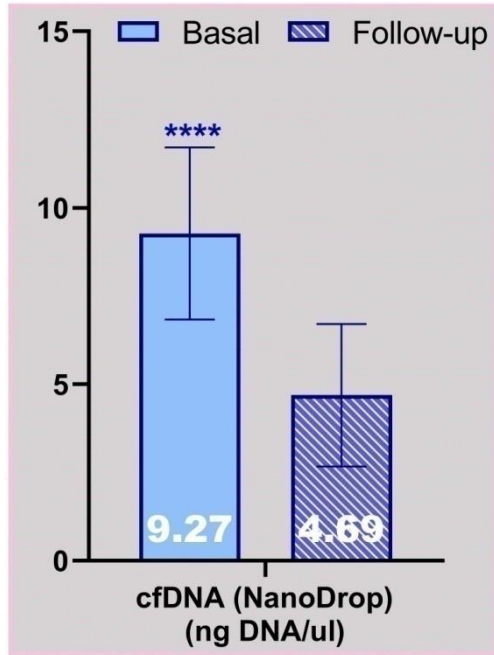
الجدول 21: مقارنة قيم cfDNA المقاس بجهاز الناندروب وفق خصائص الورم في مجموعة مرضى DLBCL عند التشخيص (خط الأساس).

cfDNA بالناندروب (نغ/مكل)				cfDNA بالناندروب (نغ/مكل)			
مرحلة/قيمة	العدد	متوسط	انحراف معياري	مرحلة/قيمة	العدد	متوسط	انحراف معياري
مرحلة الورم (آن آر بور)				مرحلة الورم (آن آر بور)			
1	8	9.88	2.83	1	8	9.88	2.83
2	21	9.72	2.74	2	21	9.72	2.74
3	11	8.93	2.48	3	11	8.93	2.48
4	24	8.98	2.75	4	24	8.98	2.75
قيمة P: أكبر من 0.05				قيمة P: أكبر من 0.05			
مرحلة الورم (لوغانو)				مرحلة الورم (لوغانو)			
محدود	27	9.81	2.81	محدود	27	9.81	2.81
متقدم	37	8.97	2.56	متقدم	37	8.97	2.56
قيمة P: أكبر من 0.05				قيمة P: أكبر من 0.05			
حز حالة الأداء				حز حالة الأداء			
2-0	53	9.51	2.80	2-0	53	9.51	2.80
قيمة P: أكبر من 0.05				قيمة P: أكبر من 0.05			

cfDNA: الدنا الحر البلازمي؛ DLBCL: لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة؛ IPI-NCCN: المؤشر الإنذاري العالمي IPI المنقح من قبل الشبكة الوطنية الشاملة للسرطان NCCN؛ M: المتوسط؛ SD: الانحراف المعياري.

11. 8. 2 مقارنة قيم cfDNA البلازمي المُقاس بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب بين

خط الأساس ووقت المتابعة



الشكل 39: مقارنة متوسط قيم cfDNA المُقاس باستخدام جهاز النانودروب بين وقت التشخيص Basal والمتابعة Follow-up في مجموعة مرضى DLBCL. [****: $P < 0.0001$]

عرض الجدول 13 نتائج مقارنة قيم متوسطات المتثابرات المدروسة عند التشخيص (خط الأساس) وتقييم المعالجة (قبل بدء الشوط الرابع من المعالجة الكيميائية) في مجموعة مرضى DLBCL الذين تمكنت الباحثة من متابعتهم (41 مريضاً). ويظهر من الجدول 13 انخفاض مستوى cfDNA المُقاس بجهاز النانودروب (من 2.44 ± 9.27 وقت التشخيص إلى 2.02 ± 4.69 نغ/مكل بعد 3 أشواط علاجية)، واتصف هذا التبدل بالاعتداد الإحصائي ($P > 0.0001$) (الجدول 13 والشكل 39).

وبدراسة الارتباطات فيما بين النسب المئوية لتبدلات المتثابرات بين وقت التشخيص ووقت المتابعة (قبل بدء الشوط 4 من المعالجة) عند مرضى DLBCL

الذين تمكنت الباحثة من متابعتهم (41 مريضاً)، فضلاً عن قيم cfDNA المُقاسة بجهاز النانودروب وقت تقييم المعالجة (الجدول 22)، ظهر أنَّ النسبة المئوية لانخفاض حجم كتلة الورم البدئية ارتبطت ارتباطاً إيجابياً ذا

الجدول 22: قيم cfDNA المُقاس بجهاز النانودروب وقت التقييم والنسب المئوية لتبدلات المتثابرات المهمة في مراقبة الاستجابة العلاجية وقت تقييم مرضى DLBCL (41 مريضاً) مقارنة بخط الأساس (عند التشخيص).

المتثابرة	M	SD
cfDNA جهاز النانودروب (نغ/مكل)	4.69	2.02
انخفاض cfDNA (%)	46.73	27.07
نقصان حجم الورم (%)	62.07	17.58
انخفاض نسبة LDH (%)	11.21-	56.45

cfDNA: الدنا الحر البلازمي؛ DLBCL: لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة؛ LDH: نازعة هيدروجين اللاكتات؛ M: قيمة المتوسط؛ SD: الانحراف المعياري.

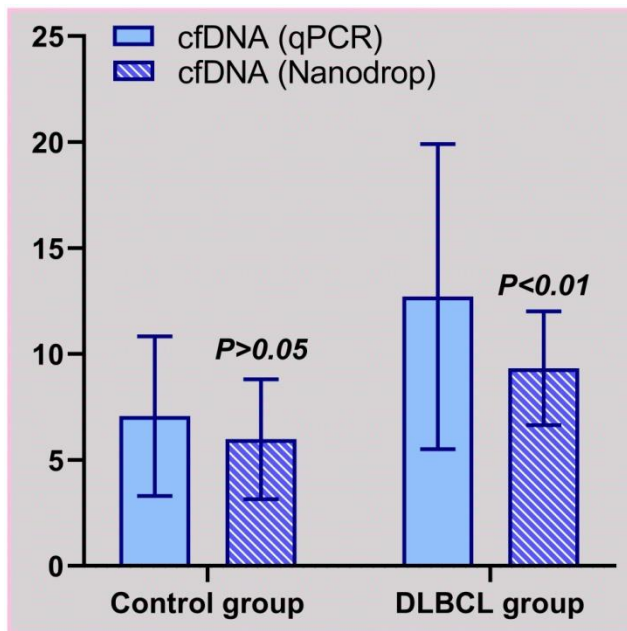
اعتداد إحصائي مع قيم cfDNA المُقاسة بجهاز النانودروب عند المتابعة (معامل بيرسون "r": $P > 0.05$) ولكن ليس مع النسبة المئوية لانخفاض cfDNA ($r: -0.179$; $P: 0.264$). وهي نتائج مقارنة لمثيلاتها الخاصة بقيم cfDNA المُقاس بتقانة qPCR (ص: 132).

11. 8. 3 مقارنة قيم cfDNA البلازمي بين تقانة التفاعل البوليميرازي السلسلي و مقياس الطيف الضوئي

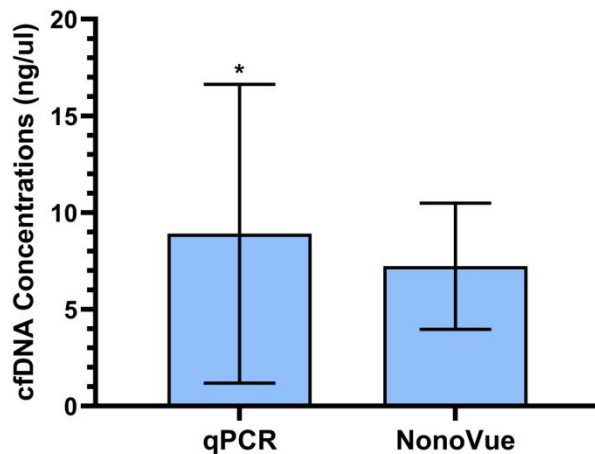
الجدول 23: مقارنة بين طريقتي قياس الدنا الحر cfDNA البلازمي في المجموعات المدروسة.

المجموعة	التقانة		qPCR		نانودروب	
	P	SD	M	SD	M	P
الشواهد (28)	0.05 <	2.83	5.98	3.76	7.07	
مرضى DLBCL عند التشخيص (64)	0.01 >	2.68	9.33	7.20	12.71	

DLBCL: لمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة؛ qPCR: التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي.



الشكل 40: مقارنة متوسط قيم cfDNA المُقاسة بتقانة qPCR وجهاز النانودروب في مجموعة الشواهد control والمرضى DLBCL.



الشكل 41: مقارنة متوسط قيم cfDNA المُقاسة بتقانة qPCR وجهاز النانودروب في عينات الدراسة كلها (133 عينة). [* : P > 0.05].

باستخدام جهاز النانودروب

تمت مقارنة متوسطات قيم cfDNA

المُقاس بتقانة qPCR و بمقياس الطيف

الضوئي باستخدام جهاز النانودروب في

مجموعتي الشواهد ومرضى DLBCL

عند التشخيص، وأظهرت نتائج هذه

المقارنة أنَّ قيم النانودروب كانت أقل في

مجموعة الشواهد دون اعتداد إحصائي

(P < 0.05) وفي مجموعة المرضى عند

التشخيص مع اعتداد إحصائي (P > 0.01)

(P) بالمقارنة مع قيم qPCR (الجدول 23؛

الشكل 40). وبمقارنة قيم cfDNA

المُقاسة بتقانة qPCR وجهاز النانودروب

في عينات الدراسة كلها (133 عينة من

28 شاهداً و 64 مريضاً عند التشخيص

و 41 مريضاً عند المتابعة)، كانت

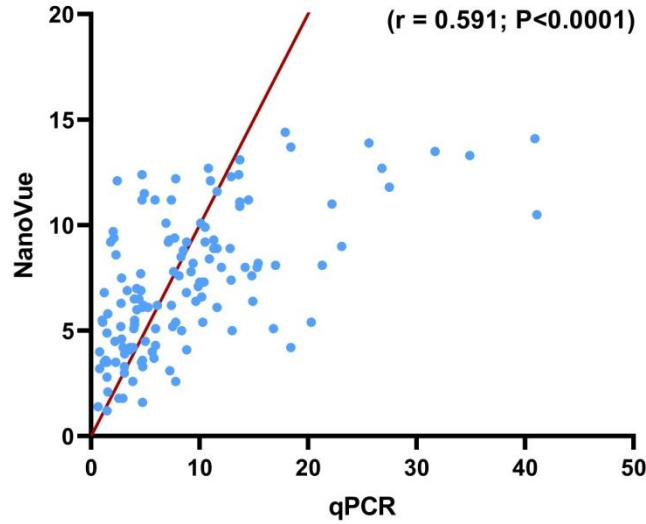
قياسات qPCR (7.72 ± 8.91 نغ/مكل)

أعلى من قياسات النانودروب (7.23 ±

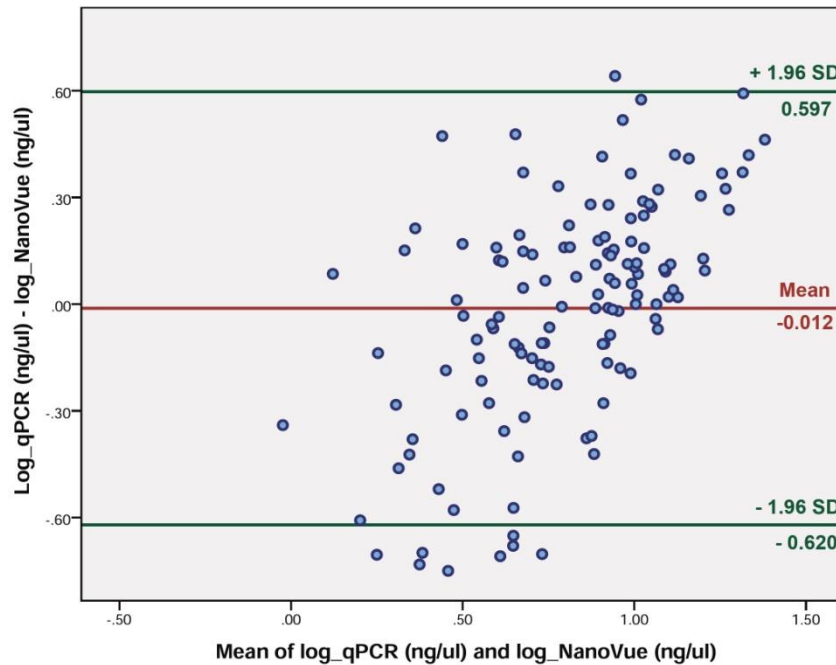
3.26 نغ/مكل) بشكل معتد به إحصائياً

حيث كانت قيم P > 0.05 (الشكل 41).

ولقياس مدى التوافق بين طريقتي قياس cfDNA، تم استخدام اختبار بيرسون لكشف الارتباط (الشكل 42) واختبار خطية بلاند-ألتمان Bland-Altman plot (الشكل 43). وقد أظهر الاختباران التوافق بين قيم الطريقتين وإمكانية استخدامهما تبادلياً.



الشكل 42: مخطط تشتت يظهر الارتباط الإيجابي بين قيم cfDNA المقاسة بتقانة التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي qPCR وجهاز النانودروب بجهاز NanoVue في 133 عينة. [r: معامل ارتباط بيرسون؛ P: الاعتداد الإحصائي].



الشكل 43: تحليل بلاند-ألتمان للمقارنة بين تقديرات cfDNA المقاسة بتقانة qPCR وجهاز النانودروب في عينات الدراسة كلها. [SD: انحراف معياري].

11. 9 نتائج التحوف اللوجستي الثنائي

تم استخدام الإصابة بالورم (DLBCL) كمتغير تابع ومن ثم إجراء التحوف على مرحلتين حيث تم إدخال كل متغير وحده كمتغير مستقل في المرحلة الأولى ومن ثم إدخال جميع المتغيرات التي أعطت نتائج معتد بها إحصائياً في نموذج واحد في اختبار التحوف اللوجستي الثنائي binary logistic regression. ولم يتم عرض نتائج نسبة LDH لأنّ النموذج لم يقبلها بسبب ارتباطها العالي بقيمة LDH الموجودة في النموذج وبالتالي فتأثيرها مشابهة لنتائج LDH.

وكما يظهر في الجدول 24، كانت نسبة الأرجحية (OR) عالية وذات اعتداد إحصائي في النموذج ذي المتغير الواحد مع كل من LDH (OR: 1.013؛ $P > 0.001$ ؛ مجال الموثوقية 95%: 1.005-1.020) و qPCR cfDNA (OR: 1.21؛ $P > 0.001$ ؛ مجال الموثوقية 95%: 1.083-1.359) و cfDNA بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب (OR: 1.58؛ $P > 0.0001$ ؛ مجال الموثوقية 95%: 1.273-1.971). وبذلك كانت نسبة الأرجحية الأعلى من نصيب cfDNA [بمقياس الطيف الضوئي (جهاز النانودروب) ثم بتقانة qPCR] والأدنى من نصيب LDH [الجدول 24-(أ)].

الجدول 24: نتائج التحوف اللوجستي الثنائي باستخدام احتمالية الإصابة بـ DLBCL كمتغير تابع (غير مستقل) وعوامل التنبؤ المحتملة كمتغيرات مستقلة لدى المشاركين في الدراسة.

الاعتداد (P)	مجال الموثوقية 95%		نسبة الأرجحية (OR)	الخطأ المعياري (SE)	قيمة بيتا β	
	حد أدنى	حد أعلى				
(أ) التحوف اللوجستي لكل متثبت لوحده في النموذج						
0.605	1.931	0.323	0.789	0.456	0.236 −	الجنس
0.217	1.046	0.990	1.018	0.014	0.017 +	العمر
0.789	1.518	0.577	0.936	0.247	0.066 −	حمض البول
0.001	1.020	1.005	1.013	0.004	0.013 +	نازعة هيدروجين اللاكتات LDH
0.001	1.359	1.083	1.213	0.058	0.193 +	cfDNA بتقانة qPCR
0.000	1.971	1.273	1.584	0.111	0.460 +	cfDNA بجهاز النانودرب
(ب) التحوف اللوجستي الثنائي لكل المتثابات في نموذج واحد						
0.029	1.018	1.001	1.009	0.004	0.009 +	نازعة هيدروجين اللاكتات LDH
0.031	1.321	1.013	1.157	0.068	0.146 +	cfDNA بتقانة qPCR
0.048	1.650	1.002	1.286	0.127	0.252 +	cfDNA بجهاز النانودروب

تم إدخال المتغيرات الثلاثة التي كانت OR فيها ذات الاعتداد الإحصائي في نموذج واحد كمتغيرات مستقلة مع إدخال حالة DLBCL كمتغير تابع فبقيت نسبة الأرجحية معتداً بها إحصائياً مع المتغيرات الثلاث وبالترتيب ذاته من حيث قيمتها (من الأعلى إلى الأدنى): cfDNA بالنانودروب (OR: 1.29؛ $P > 0.05$ ؛ مجال الموثوقية 1.002-1.321) ثم cfDNA qPCR (OR: 1.16؛ $P > 0.05$ ؛ مجال الموثوقية 1.002-1.650) ثم LDH (OR: 1.00؛ $P > 0.05$ ؛ مجال الموثوقية 1.001-1.018) [الجدول 24-(ب)].

11. 10 اختبار منحنى خاصية تشغيل المستقبل

يعرض الشكل 44 نتائج اختبار منحنى خاصية تشغيل المستقبل (ROC) receiver operating characteristic مع المساحة تحت المنحنى (AUC) Area Under the Curve والاعتداد الإحصائي لعوامل التنبؤ التي أعطت إيجابية معتداً بها إحصائياً في اختبار التخوف اللوجستي. ويظهر الشكل أن cfDNA بمقياس الطيف الضوئي (جهاز

النانو دروب) أعطى أعلى قدرة تنبؤية

إيجابية (AUC = 0.808؛ $P > 0.0001$)

يليه cfDNA بتقانة qPCR (AUC = 0.744؛

$P > 0.001$) ثم LDH (AUC = 0.763؛

$P > 0.001$).

ويعرض الجدول 25 مُعطيات

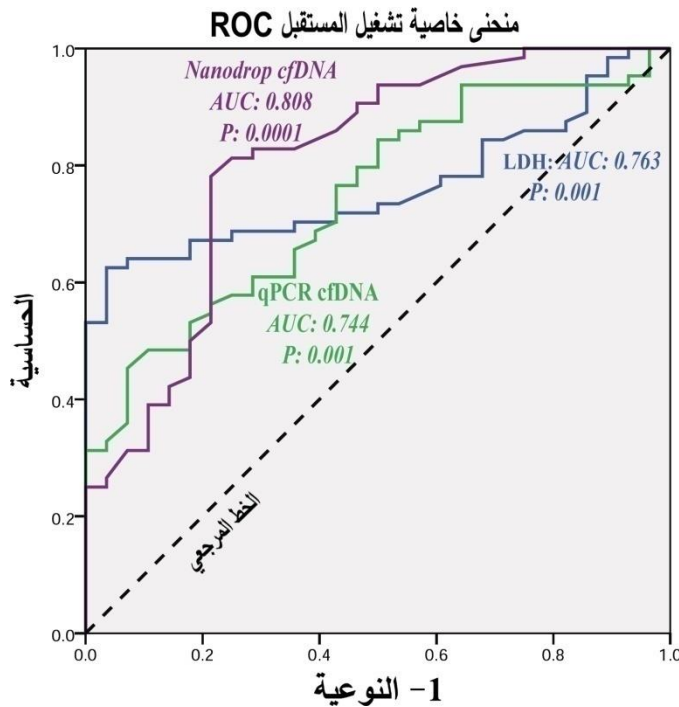
القدرة التنبؤية بحدوث DLBCL لكل من

LDH و cfDNA بمقياس الطيف

الضوئي (جهاز النانو دروب) و cfDNA

بتقانة qPCR مع القيمة الفاصل ونسبة

الحساسية والنوعية لكل منها.



الشكل 44: منحنى خاصية تشغيل المستقبل ROC والمساحة تحت المنحنى AUC والاعتداد الإحصائي "P" لعوامل التنبؤ المحتملة بحدوث DLBCL.

cfDNA: الدنا الحر البلازمي بتقانة qPCR أو النانودروب Nanodrop؛
LDH: نازعة هيدروجين اللاكتات.

بلغت القيمة الفاصل cut-off لمتثابته LDH القيمة 340.5 وحدة دولية/ل (الحساسية: 63% والنوعية 96%). كما بلغت القيمة الفاصل الخاصة بمتثابته cfDNA المُقاس بالتفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي القيمة 7.54 نغ دنا/مكل (الحساسية: 77% والنوعية 57%). أما القيمة الفاصل لمتثابته cfDNA المُقاس بالنانودروب فقد بلغت 7.54 نغ دنا/مكل (الحساسية: 78% والنوعية 79%).

الجدول 25: القدرة التنبؤية بـ DLBCL لكل من LDH و cfDNA بتقناتي qPCR والنانودروب.

النوعية (%)	الحساسية (%)	القيمة الفاصل	مجال الموثوقية 95%		الاعتداد (P)	AUC	
			حد أعلى	حد أدنى			
96	63	340.5	0.857	0.668	0.0001 >	0.763	نازعة هيدروجين اللاكتات LDH
57	77	7.54	0.846	0.641	0.001 >	0.744	cfDNA بتقانة qPCR
79	78	7.35	0.910	0.707	0.0001 >	0.808	cfDNA بمقياس الطيف الضوئي (جهاز النانودروب)

الفصل (12) مناقشة النتائج

Discussion of the Results

السرطان هو أحد الأمراض غير السارية المسؤولة عن نحو 75% من الوفيات العالمية (WHO, 2023c)، ويحتل المرتبة الثانية بين الأسباب الرئيسة للوفيات العالمية (Nagai & Kim, 2017) حيث تسبب في العام 2020 بنحو 10 مليون وفاة (Ferlay et al., 2021; Sung et al., 2021). ومن السرطانات الشائعة تأتي DLBCL كأكثر أنواع اللمفومات اللاهودجكينية شيوعاً (نحو 40% منها)، وتتصف بالتغاير الشديد سريرياً وبيولوجياً ومورثياً فضلاً عن المجال الواسع من أشكال الاستجابة للعلاج. ويظهر ذلك كله كنتيجة لحقيقة أن نظام التصنيف التقليدي المتبع حالياً لا يصنف إلا نحو 20% من حالات DLBCL، ويبقى نحو 80% من الأنماط الفرعية لهذه الخباثة دون تصنيف حيث توضع ضمن فئة DLBCL غير المميزة بطريقة أخرى DLBCL, NOS (الجدول 1؛ ص 13) (Freedman, Aster, et al., 2023; W. Li, 2022; NCCN, 2023; Song et al., 2022).

ومع حقيقة أن المعايير "الذهبية" والطرائق التقليدية المستخدمة روتينياً في سياق تدبير DLBCL (الخزعة النسيجية وتقانة PET-CT) تعاني من محدوديات كثيرة في مجال تشخيصها وتصنيفها وتدبيرها بكل مراحله (Adams & Kwee, 2018, 2019; De Rubis et al., 2019; Griffeth, 2005; Juweid et al., 2021; Kwee et al., 2008; Martins et al., 2021; Seam et al., 2007; Sriram et al., 2019; Ulivi & Indraccolo, 2022; Voltin et al., 2020; Xie et al., 2018; Yu et al., 2021)؛ ومع قلة الواصمات الحيوية النوعية المتوافرة التي تنتبأ بالحصيلة والاستجابة العلاجية والترقي (Munoz et al., 2024; Regazzo et al., 2021)؛ يصبح مهماً جداً بذل الجهود المتواصلة الرامية إلى إيجاد طرائق وتقانات تسمح بتجاوز هذه العقبات وتوفير إمكانيات أكبر لتوجيه أكثر نوعية لعلاج الأنماط الفرعية المختلفة من DLBCL بغية الوصول إلى حصيلة علاجية أفضل مع تخفيف احتمالات النكس. ولعل التطور الهائل للتقانات الحيوية الجزيئية وتطبيقاتها يمكن أن يقدم الحل لهذه المشكلات المتأصلة في تصنيف DLBCL المورثي الجزيئي ومحدوديات تقانات التصوير والخزعات النسيجية التقليدية المستخدمة روتينياً حتى الساعة (Cutmore et al., 2023; W. Li, 2022; Song et al., 2022; Yu et al., 2021).

معايرة cfDNA ودراسته، كأحد أشكال الخزعة السائلة، هي إحدى التقانات الواعدة المقترحة لحل المشكلات المطروحة أعلاه حيث تتميز بطبيعتها الأقل غزواً وتكلفة، وبقدرتها على إعطاء معلومات عن حالة الورم في الوقت الفعلي والتغلب على مشكلة تغيرية الورم (أو التبدلات النقيلية المتعددة)، وعدم تعريض الجسم للإشعاع، وإمكانية الحصول على العينة من أي سائل بيولوجي في الجسم (Alix-Panabières & Pantel, 2021; Armakolas et al., 2023; Yu et al., 2021).

ومن جهة أخرى، فإن الخزعة النسيجية ليست مناسبة لتسليط الضوء على الشاكلة العامة للورم ولا لتمييز آفات أخرى في مواضع مختلفة ولا لتحديد أي منها يجب استخدامها في المراقبة الطولية بعيدة المدى للمرض وتكرارها الروتيني في سياق تقييم الأورام ليس منطقياً ولا عملياً (Xie et al., 2018; Yu et al., 2021)؛ وكذلك لا تنصح عدة دلائل إرشادية باستخدام تقانة PET-CT من أجل التردد والمتابعة (Cheung et al., 2018; NCCN, 2023; Tilly et al., 2015) بسبب غياب البيئة الواضحة على تحسين الحويلة النهائية باستخدام التصوير الروتيني للترصد والكشف عن النكس (Kallam et al., 2020) ولأنه نادراً ما يتم تعديل العلاج استناداً إلى المعلومات التي تعطيها خلال التقييم المرحلي للمعالجة (Agrawal et al., 2021; Kitajima et al., 2019; Schöder et al., 2020; Sworder & Kurtz, 2023). بالمقابل، فمن اليسير الحصول على عينات cfDNA متكررة بطريقة متسلسلة من خلال إجراءات غير غازية (سحب الدم مثلاً) وفي أي مرحلة من مراحل تدبير الورم. وتحديد شاكلة cfDNA يمثل كنزاً غير مسبوق من المعطيات المورثية في الزمن الحقيقي والتي يمكن استغلالها لأغراض تشخيصية وإنذارية وعلاجية واسعة النطاق (Abel J Bronkhorst et al., 2022).

ومن بين الأسباب التي تجعل DLBCL أحد أهم الأورام المرشحة للإفادة من تقانات cfDNA كون المعيار الحالي لمراقبة استجابة هذا المرض للعلاج هو تقانة PET/CT أو غيرها من تقانات التصوير المترافقة مع اختطارات الإشعاع ومحدودية اكتشاف المرض المتبقي. فضلاً عن ذلك، فتشخيص DLBCL يستند إلى الخصائص الشكلية للخلايا الورمية ونمطها الظاهري المناعي immunophenotype. بالمقابل فهناك استخدامات متزايدة للاختبارات البيولوجية الجزيئية لتحديد خلية المنشأ للورم أو طفرات أخرى مستهدفة تعطي المزيد من

المعلومات الإنذارية، وهذه الحاجة المتزايدة للتحليل الجزيئي قد تقيد من زيادة استخدام cfDNA. ولذلك تنامت دراسات استخدام cfDNA في تشخيص DLBCL وتحليل مجين الورم فضلاً عن اكتشاف دوره الإنذاري ومراقبة المرضى الذين دخلوا طور الهدأة (Bingham & Spencer, 2020; Tilly et al., 2015).

تأتي الدراسة الحالية في سياق استقصاء مدى فائدة معايرة cfDNA عند مرضى DLBCL باستخدام تقانة التفاعل البوليميرازي السلسلي الكمي qPCR بالزمن الفعلي، وقد أظهرت بوضوح إمكانية مساهمة هذه المعايرة في تشخيص DLBCL والقدرة على التنبؤ بها.

كانت قيم cfDNA (نغ/مكل) أعلى بوضوح، وباعتداد إحصائي، عند مرضى DLBCL وقت التشخيص (7.20 ± 12.71؛ المجال: 1.81 - 28.50) مقارنة بالشواهد (3.76 ± 7.07؛ المجال: 0.64 - 14.50) ($P > 0.0001$). وقد جاءت هذه النتيجة متوافقة مع دراسات سابقة، ففي دراسة إيطالية في العام 2009 وجد الباحثون أنّ تركيز cfDNA عند الأسوياء (الوسيط: 12.1؛ المتوسط: 13.9؛ المجال 3.0-34.7 نغ/مل) كان أدنى منه عند مرضى اللفوما عموماً وعند DLBCL خصوصاً (الوسيط: 26.9؛ المتوسط: 91.6؛ المجال 4.0-940.5 نغ/مل) ($P > 0.004$) (Hohaus et al., 2009). وظهرت نتائج دراسات أخرى في السياق ذاته مثل دراسة كريستينسن ورفاقه الدنمركية في العام 2016 (Kristensen et al., 2016) ودراسة فريق ماو لي البحثي الصيني في العام 2017 (Mao Li et al., 2017) ودراسة ماهزا إسكندري وزملائها في إيران في العام 2019 (Eskandari et al., 2019) والدراسة الإسبانية المنشورة في العام 2024 (Diez-Feijóo et al., 2024) وغيرها من الدراسات والمراجعات (Arzuaga-Mendez et al., 2019; Bingham & Spencer, 2020; Højlund et al., 2023;) (Kubackova et al., 2017; M Li & Xu, 2017).

يتضح من النظرة الإجمالية لنتائج الدراسات المذكورة أعلاه، بما في ذلك الدراسة الحالية، وجود تغير شديد في تراكيز cfDNA بين الدراسات وضمنها. ومع ذلك، فقد كان تركيز cfDNA الإجمالي أعلى عند المرضى مقارنة بالشواهد، ووصل على الأقل إلى ضعف قيمته عند مرضى DLBCL في معظمها. وقد يعود هذا التغير إلى اختلاف طرائق الاستخلاص وقياس التركيز والمورثة المستهدفة في تقانة qPCR المستخدمة، فضلاً

عن احتمال اختلاف الأنماط الفرعية للمفوما المدروسة حيث يوجد عدد كبير من أنماط DLBCL الفرعية والتي يختلف شيوعها من بيئة إلى أخرى (Arzuaga-Mendez et al., 2019; J. K. Lim et al., 2021; Regazzo et al., 2021).

ورغم أن الآلية الدقيقة لارتفاع تراكيز الدنا الحر في السرطان ليست معروفة تماماً حتى الآن، يمكن تفسيرها استناداً إلى أن آليات إطراح cfDNA الرئيسية في البلازما هي الاستماتة والنخر والتكاثر والإفراز الفاعل (Hu et al., 2021; Rossi et al., 2019). وبينما تبدي الخلايا السرطانية فعالية أكبر ضد حدوث الاستماتة، مما يقلل "نظرياً" من أهميتها كمصدر للدنا الحر من الخلايا الورمية، إلا أن هناك زيادة في النخر الخلوي والإفراز الفاعل في الحالة السرطانية (Hu et al., 2021; Ilkhani et al., 2021; Siravegna et al., 2017). فضلاً عن ذلك، فالاستجابة المناعية للجسم (كما هي الحال في تشكيل المصائد خارج الخلية) تساهم أيضاً في زيادة إطلاق الدنا الحر من الخلايا المناعية والسرطانية على حد سواء (Siravegna et al., 2017; Stroun et al., 1989).

وبهذا، ومع حقيقة سهولة الحصول على cfDNA من عينة الدم المحيطي وغيره من سوائل الجسم، ووجود cfDNA في السائل الدماغي الشوكي (مما ييسر تشخيص الإصابات العصبية المركزية، وخصوصاً الأولية منها) (Chapuy et al., 2016; J. K. Lim et al., 2021; W. Wang et al., 2023)، وكون بعض الدراسات أظهرت معدل توافق كبير بين الطفرات الورمية التي يمكن كشفها من هذه العينة وتلك التي تكشفها الخزعة النسيجية (Iriyama et al., 2023; J. K. Lim et al., 2021; Scherer et al., 2016; Soscia, 2023)، يتضح المستقبل الواعد لقياس cfDNA ودراسته في تشخيص DLBCL وتمييزها.

جاءت نتائج التحوف اللوجستي الثنائي ومنحنيات ROC في الدراسة الحالية لتثبت الدور التشخيصي والاختطاري لقياس cfDNA كما هي الحال في عدة دراسات أخرى (Eskandari et al., 2019; Hohaus et al., 2017; Mao Li et al., 2017). تم استخدام تحليل ROC لتقييم الأداء التشخيصي لقياس cfDNA بتقانة qPCR بالزمن الفعلي وقدرته على التمييز بين الأصحاء ومرضى DLBCL. كانت المساحة تحت منحنى ROC لقيم cfDNA عند مرضى DLBCL بقيمة 0.744 (مجال الموثوقية 95%: 0.641-0.846؛ $P > 0.001$) مما يوحي

بقوة تمييزية معتدلة. وعند القيمة الفاصل 7.54 نغ/مكل، كانت الحساسية والنوعية للاختبار 77% و 57%، على الترتيب. وبما يتوافق مع ذلك، أظهر نموذج التحوف اللوجستي الثنائي قدرة تنبؤية لقياس cfDNA بحدوث DLBCL حيث ترافق ارتفاع قيم cfDNA مع زيادة اختطار DLBCL فكانت نسبة الأرجحية 1.157 (مجال الموثوقية 95%: 1.013 – 1.321؛ $P = 0.031$)، مما يعني أن زيادة cfDNA بمقدار وحدة واحدة يزيد اختطار حدوث DLBCL بمقدار 5.7%. ويوضح الجدول التالي مدى تقارب هذه النتائج مع الدراسات المذكورة أعلاه على DLBCL:

العدد	مرضى/ شواهد	الدراسة الحالية	(Hohaus et al., 2009)	(Mao Li et al., 2017)	(Eskandari et al., 2019)
38/40	80/98	41/63	28/64	0.777	0.86
القيمة	0.744	0.79	0.641-0.846	0.80- 0.90	0.674-0.880
المنطقة تحت المنحنى	مجال الموثوقية 95%	$P < 0.001$	قيمة غير متوافرة	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$
الاعتداد	2.071	340	18.5	7.54	77
القيمة الفاصل	82.5	73	70	71	57
القيمة	62.8	94	71	57	77
نسبة الأرجحية	القيمة	1.157	1.085	1.073	قيمة غير متوافرة
مجال الموثوقية 95%	1.013-1.321	1.039-1.133	I 1.045-1.102	قيمة غير متوافرة	قيمة غير متوافرة
الاعتداد	$P < 0.031$	قيمة غير متوافرة	قيمة غير متوافرة	قيمة غير متوافرة	قيمة غير متوافرة
زيادة الاختطار/وحدة قياس	5.7%	8.5%	7.3%	قيمة غير متوافرة	قيمة غير متوافرة

ومما يزيد استنتاج قدرة قياس cfDNA التشخيصية في DLBCL، ارتباط قيمه عند التشخيص في الدراسة الحالية مع كل من حجم أكبر كتلة ورمية في مجموعة المرضى ($r = 0.334$ ؛ $P > 0.01$) وكذلك مع قيم الواصم التقليدي المستخدم LDH ومع نسبة LDH في مجموعة الشواهد ومجموعة المرضى ومجموع المشاركين، وهي عوامل مهمة في تحديد مرحلة الورم والإنذار وخطة العلاج. ومع ذلك، فقد فشلت الدراسة الحالية في إثبات دور قياس cfDNA في هذا المجال مع غياب أي ارتباط معتد به إحصائياً بين cfDNA وقت التشخيص وكل من مرحلة الورم (وفق آربور أو لوغانو) ووجود المرض الكتلي وحرز كل من حالة الأداء والإنذار (IPI-NCCN) (الجدول 17). وعند أخذ هذه النتائج بالاعتبار مع النتائج الأخرى في النشريات الطبية من دراسات ومراجعات،

يتضح مدى التباين الموجود فعلياً حول دور cfDNA في تحديد إنذار DLBCL حيث تذكر الدراسات عدم اتساق نتائج الأبحاث إلى الحد الذي يسمح باستنتاج واضح حول استخدام cfDNA في تحديد الإنذار (Chamba & Mawalla, 2023; Diez-Feijóo et al., 2024). فبينما توحى بعض الدراسات بالدور الإنذاري لقيم cfDNA وبأن المستويات العالية منه وقت تشخيص DLBCL تتوافق مع نسب أقل من البقاء دون ترقى المرض (Eskandari et al., 2017; Kurtz et al., 2015; Mao Li et al., 2017; Hohaus et al., 2009; al., 2019)، لم يجد فريق بحثي آخر أي ارتباط بين cfDNA والبقاء لخمس سنوات (Kristensen et al., 2016). وبذلك يبقى دور cfDNA الإنذاري بحاجة للمزيد من الدراسات المعيرة طويلة الأمد للوصول إلى استنتاج نهائي.

لعل أهم تطبيقات قياس cfDNA المحتملة الأكثر إثارة للاهتمام عند مرضى DLBCL هو إمكانية استخدامه لتقييم مدى الاستجابة للمعالجة (المرحلة والنهائية) ومراقبة النكس (Bingham & Spencer, 2020). وتأتي أهمية ذلك من غياب الواسمات الحيوية النوعية التي تكشف مدى الاستجابة العلاجية في حالات اللمفوما (Drees, 2024; Munoz et al., 2024; Regazzo et al., 2021)، ومن ترافق حقبة المعالجة المناعية مع ظاهرة الترقى الكاذب (ص36-38) خلال التقييم المرحلي للاستجابة العلاجية بالتقانات التصويرية (بما في ذلك PET) التي تُظهر زيادة مؤقتة في حجم الورم والفاعلية (النشاط) الاستقلابية كنتيجة لتجنيد الخلايا المناعية في البيئة الدقيقة للورم خلال المراحل الأولية من العلاج (Lopci & Meignan, 2020)، وهذا يؤدي إلى إجابيات كاذبة تجعل أمر استخدام تقانة PET في التقييم المرحلي غير مفيد وغير منسوح به لتحديد مرحلة الورم من جديد وتعديل الخطة العلاجية استناداً إلى هذا التصوير (Agrawal et al., 2021; Kitajima et al., 2019; NCCN, 2023; Schöder et al., 2020). ورغم أن خزعة الآفات المتضخمة يمكن أن تكون مفيدة في التمييز بين الترقى الكاذب والترقى الفعلي للمرض، إلا أنها ليست عملية دائماً لبعض المرضى، ويبقى الاعتماد على السريريات والمتابعة الدقيقة غالباً ما يكون الترقى الفعلي للمرض مصحوباً بتدهور في حالة المريض (Al-Ibraheem et al., 2023; Lopci & Meignan, 2020).

بناءً على ما سبق، اهتمت الدراسة الحالية باستقصاء الدور المحتمل لقياس cfDNA في التقييم المرحلي

للاستجابة العلاجية عند مرضى DLBCL بالمقارنة مع الواسم التقليدي المستخدم (LDH). تم قياس cfDNA وLDH (مع حساب نسبة LDH) قبل بدء الشوط الرابع من المعالجة، ومن ثم حساب تبدلات قيمها عن وقت التشخيص ودراسة علاقتها مع نسبة تبدلات حجم الكتلة الأولية عند المرضى. لم تُظهر النتائج أية أهمية إحصائية لتبدلات متوسطات قيم LDH ونسبة LDH بين التشخيص ووقت تقييم المعالجة. بالمقابل، أظهرت نتائج الدراسة الحالية انخفاضاً معتداً به إحصائياً ($P > 0.0001$) في كل من حجم أكبر كتلة (من 32.76 ± 49.93 إلى 15.64 ± 17.27 مم) وقيم cfDNA (من 6.74 ± 12.33 إلى 1.99 ± 3.19 نغ/مكل). كما أظهرت الدراسة الحالية ارتباطاً معتداً به إحصائياً بين النسبة المئوية لانخفاض حجم أكبر كتلة ورمية (الكتلة الأولية) وقيم cfDNA عند المتابعة (معامل بيرسون "r": 0.421 ; $P > 0.01$)، وغاب هذا الارتباط مع النسب الأخرى المتعلقة بالواسم LDH ونسبته. توجي هذه النتائج بأنّ cfDNA يمكن أن يمثل واصماً حيويّاً يكون قياسه أحد الوسائل المستقلة أو المتممة في تقييم المعالجة المرحلية، وهو ما يتوافق مع دراسات أظهرت أنّ قيمه تنقص بوضوح عند المرضى الذين استجابوا للمعالجة، وهو ما لم يظهر في حالة مقاومة العلاج (Bingham & Spencer, 2020; Rossi et al., 2019; Rossi et al., 2017). وتزداد أهمية هذا التطبيق عندما تُضاف عوامل أخرى كسهولة اعتيان cfDNA وإمكانية تكرارها مع كل شوط علاجي والتكلفة المنخفضة مقارنة بتقانة PET-CT والخزعة النسيجية مع التلوين المناعي.

رغم كون qPCR بالزمن الفعلي هي الطريقة المرجعية لقياس cfDNA، فهذه التقانة غير متوافرة دائماً في الأوضاع محدودة الموارد لأنها باهظة الثمن ويحتاج إجراؤها لوقت طويل وتجهيزات نوعية ليست موجودة في كل مكان. بالمقابل، هناك طرائق أخرى تقيس تركيز الدنا في عينات الدم وتتصف بكونها أقل تكلفة وأكثر توافراً وأسرع إجراءً مثل الطرائق المستندة إلى مقياس الطيف الضوئي (النانودروب) وقياس الفلورة والرحلان الكهربائي ويمكن استخدامها في الأوضاع محدودة الموارد وقامت عدة دراسات بمقارنة نتائجها ودراسة تعبيرها (Bruijns et al., 2022; Desjardins & Conklin, 2010; García-Alegría et al., 2020; Jeon et al., 2019; Meddeb, 2018; Ponté et al., 2018; Nielsen et al., 2008; Pisareva, & Thierry, 2019).

أجريت في الدراسة الحالية مقارنة نتائج cfDNA المُقدرة بتقانة qPCR بالزمن الفعلي مع تلك المُقدرة

يستخدم مقياس الطيف الضوئي (النانودروب) بأبسط وأرخص طريقة لقياس الدنا والتي لا يتطلب قياس الدنا فيها سوى ثوان قليلة وتكلفة منخفضة جداً، فضلاً عن أنها تعطي تقييماً يمكن التعويل عليه reliable لمدى نقاوة عينات cfDNA من خلال تحديد نسبة امتصاصية العينة على الموجتين 260 و280 نم (الامتصاصية $260 \div$ الامتصاصية 280) حيث يتم قبول المجال 1.7-2.0 (والدنا النقي يعطي النسبة 1.8) (Bruijns et al., 2022;) وقد حققت قياسات النانودروب لعينات الدراسة كلها النسبة المقبولة للنقاوة. (Ponti et al., 2018; Qiagen, 2016).

وفي النتائج التفصيلية، جاءت نتائج cfDNA المقاسة بالنانودروب مشابهة لتلك المقاسة بتقانة qPCR بالزمن الفعلي من حيث (1) ارتفاعها ذي الاعتداد الإحصائي ($P > 0.0001$) عند مرضى DLBCL مقارنة بالشواهد (الشكل 38؛ ص126)؛ (2) ارتباطاتها، كما هي حال نتائج qPCR، مع حجم أكبر كتلة ورمية وLDH ونسبتها (الجدول 20؛ ص127)؛ (3) عدم ارتباطها مع خصائص الورم السريرية عند التشخيص (مراحل الورم المختلفة وأحراز حالة الأداء وأحراز الاختطار ووجود المرض الكلي من عدمه) (الجدول 21؛ ص127)؛ (4) انخفاض قيم cfDNA المعتد به إحصائياً ($P > 0.0001$) عند التقييم المرحلي مقارنة بخط الأساس (الشكل 39؛ ص128)؛ (5) ارتباط قيم cfDNA المعتد به إحصائياً ($P > 0.0001$) عند التقييم المرحلي مع نسبة انخفاض حجم أكبر كتلة ورمية (ص128).

ورغم أن نتائج قياسات qPCR لكل عينات الدراسة (133 عينة من 28 شاهداً و64 مريضاً عند التشخيص و41 مريضاً عند المتابعة) كانت أعلى من قياسات النانودروب بشكل معتد به إحصائياً ($P > 0.05$)، أظهر اختبارا بيرسون وخطيطة بلاند-ألتمان (ص130) وجود ارتباط معتد به إحصائياً بين نتائج التقنيتين وتوافقهما وإمكانية استخدامهما تبادلياً.

وبذلك فقد أظهرت الدراسة الحالية أن الطريقتين سمحتا بالتفريق بين المشاركين الأسوياء ومرضى DLBCL عند التشخيص، وكذلك بين الحالة القاعدية للسرطان (عند التشخيص) وما بعد أشواط العلاج الثلاثة. وجد مؤلفو دراسة قيّمت منهجياً مصدوقية مقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب أن قياس DNA كمياً بهذه الطريقة قد أثبت أنها آمنة وذات معولية reliable؛ وأن تنفيذها في مختبرات البحث أو

الخدمة عملياً وممكنٌ وآمنٌ (García-Alegria et al., 2020). فإذا أخذت عوامل أخرى، مثل تكلفة التحليل والزمن الذي يستغرقه، وحجم العينة، ومعمولية النتائج، بالاعتبار، تكون طريقة النانودروب مقبولةً ويُنصح بإجرائها (Aranda IV, Dineen, Craig, Guerrieri, & Robertson, 2009; Kuchler et al., 2012). وقد تم الإبلاغ عن نتائج مرضية لتقدير الحمض النووي لظهارة الفم باستخدام النانودروب (Price et al., 2012). كما أفاد المؤلفون في دراسة أخرى بأن تقديرات النانودروب كانت مختلفة بشكل معتد به إحصائياً بين نوعين من السرطان هما سرطان البروستاتة والميلانوما (Ponti et al., 2018).

لقد أصبح جلياً أن القياس الكمي الأولي لإجمالي cfDNA في وقت تشخيص السرطان وخلال المتابعة قد يوفر معلومات إضافية عن السلوك البيولوجي للسرطان واستجابته للعلاج (Eskandari et al., 2019; Molina-Vila et al., 2015; Pinzani et al., 2011; Ponti et al., 2018; Regazzo et al., 2021; Salvianti et al., 2012; Schroers-Martin et al., 2023; Seyedolmohadessin, Akbari, Nourmohammadi, Basiri, & Pourmand, 2018). وتشير الدراسات، كما هي حال الدراسة الحالية، إلى أنه إذا كان تقييم الفعالية العلاجية أو الملامح الإنذارية للسرطان هو الغرض، فقد يكون القياس الكمي الأولي بمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب كافياً كواصم مخبري سريرية مفيد، ولا يتطلب الأمر بالضرورة تحليلاً أكثر تعقيداً وتكلفة مثل PCR الكمي (Chan, Leung, Yeung, Chan, & Lo, 2008; Jung, Fleischhacker, & Rabien, 2010; Lu et al., 2016; Regazzo et al., 2021; Schroers-Martin et al., 2023; van Dessel et al., 2017; van Ginkel et al., 2017). ويصبح هذا المنطق أكثر واقعية وعملائية مع حقيقة الحالة الاقتصادية الصعبة الحالية في الأوضاع الصحية السورية التي تشهد مشافيتها المركزية عدداً متزايداً من مرضى السرطان مما يجعل استخدام النانودروب كطريقة منخفضة التكلفة وسريعة وأقل تعقيداً ومتاحة لقياس cfDNA في سياق تدبير سرطان مثل DLBCL، مع الاعتراف بالطبع بمرجعية تقانة PCR الكمي.

ثالثاً: الاستنتاجات والتوصيات

الفصل (13) الاستنتاجات

Conclusins

يعدّ قياس cfDNA بطيف واسع من التطبيقات خلال تدبير DLBCL من التشخيص وحتى كشف النكس حيث توحى نتائج الدراسة الحالية بالاستنتاجات التالية:

- ترتفع قيم cfDNA عند مرضى DLBCL مقارنة بالأسوياء مما قد يساهم في خطوات تشخيصها، وخصوصاً في غياب الواسمات الكيميائية الحيوية النوعية.
- رغم ارتباط قيمة cfDNA بحجم الكتلة الأولية للورم (حجم أكبر كتلة ورمية) وقيمة LDH ونسبتها عند التشخيص وبعد ثلاثة أشواط من المعالجة، لا يمكن الاستناد إلى قيمة cfDNA الإجمالية عند التشخيص في تحديد مرحلة الورم وفق التصنيف المتبع (لوغانو) وإنذاره وفق المؤشرات المعمول بها دولياً.
- تتوافق الاستجابة الورمية للعلاج بعد ثلاثة أشواط، والمتمثلة بانخفاض حجم أكبر كتلة ورمية، مع انخفاض في قيم cfDNA مقارنة بقيمها عند التشخيص. وتتناسب النسبة المئوية لانخفاض حجم الكتلة مع قيم cfDNA. وهذا ما يجعل استخدام cfDNA مفيداً في التقييم المرحلي للاستجابة العلاجية عند مرضى DLBCL ويسمح بتجاوز السلبيات المتأصلة في التقانات التقليدية التصويرية والنسجية المستخدمة حالياً لهذا الغرض.

- مع الاعتراف بتقانة qPCR كطريقة مرجعية وأولية لقياس cfDNA الإجمالي، يمكن استخدام مقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب كطريقة بسيطة والأقل تكلفة وزمناً كبديل عن qPCR في بعض مراحل تدبير DLBCL، وخصوصاً وقت التشخيص ولتقييم الاستجابة العلاجية. ويصبح هذا أكثر واقعية في الأوضاع الصحية محدودة الموارد.

الفصل (14) التوصيات

Recommendations

تقدم الدراسة الحالية بيئةً إضافيةً على ضرورة:

1. البدء بالعمل على دمج قياس cfDNA كأداة متممة للأدوات المستخدمة في تدبير DLBCL.
2. العمل على دعم المستشفيات التخصصية بالمخابر الحديثة القادرة على قياس cfDNA بالتقانات النوعية المختلفة وإجراء الأبحاث والدراسات عليه. وفي حال عدم توافرها، يمكن الاستفادة من التقانات الأبسط في إجراء هذا القياس كمقياس الطيف الضوئي باستخدام جهاز النانودروب.
3. وضع خطط بحثية شاملة لعدة مراكز خدمية صحية تسمح بإجراء الدراسات المختلفة على cfDNA، بما في ذلك الطفريات الورمية فيه، على أن تشمل أعداداً كبيرة من المرضى من عدة مراكز وتهدف إلى تقديم أدوات أكثر يسراً ومعولية وأقل كلفة وزمناً من الوسائل التقليدية المستخدمة حالياً في تدبير السرطانات بحيث تكون إما بديلاً عنها أو متممةً لها لسد الثغرات التي تفرضها سلبيات هذه الوسائل التقليدية.

المراجع

References

- Aarthi, R., Mani, S., Velusami, S., Sundarsingh, S., & Rajkumar, T. (2015). Role of circulating cell-free DNA in cancers. *Molecular diagnosis & therapy*, 19, 339-350.
- Adams, H. J., & Kwee, T. C. (2018). Unproven clinical value of interim FDG-PET in aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 36(32), 3271-3272.
- Adams, H. J., & Kwee, T. C. (2019). Proportion of false-positive follow-up FDG-PET scans in lymphoma: systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 141, 73-81.
- Adams, H. J., Kwee, T. C., de Keizer, B., Fijnheer, R., de Klerk, J. M., & Nievelstein, R. A. (2014). FDG PET/CT for the detection of bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma: systematic review and meta-analysis. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 41(3), 565-574.
- Afflerbach, A.-K., Rohrandt, C., Brändl, B., Sönksen, M., Hench, J., Frank, S., . . . Winkler, B. (2024). Classification of brain tumors by nanopore sequencing of cell-free DNA from cerebrospinal fluid. *Clinical Chemistry*, 70(1), 250-260.
- Agiannitopoulos, K., Samara, P., Papadopoulou, E., Tsamis, K., Mertzanos, G., Babalis, D., & Lamnissou, K. (2020). Study on the admission levels of circulating cell-free DNA in patients with acute myocardial infarction using different quantification methods. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 80(4), 348-350.
- Agrawal, A., Manikandan, M. V., Uppal, A., & Rangarajan, V. (2021). PET CT in Non-Hodgkin Lymphoma. In A. Agrawal, V. Rangarajan, & A. D. Puranik (Eds.), *PET/CT in Non-Hodgkin Lymphoma* (pp. 55-69). Cham: Springer International Publishing.
- Al-Ibraheem, A., Abdulkadir, A. S., Juweid, M. E., Al-Rabi, K., Ma'koseh, M., Abdel-Razeq, H., & Mansour, A. (2023). FDG-PET/CT in the Monitoring of Lymphoma Immunotherapy Response: Current Status and Future Prospects. *Cancers*, 15(4), 1063.
- Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I., Attygalle, A. D., Araujo, I. B. d. O., Berti, E., . . . Calaminici, M. (2022). The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms. *Leukemia*, 36(7), 1720-1748.
- Albitar, M., Zhang, H., Charifa, A., Ip, A., Ma, W., McCloskey, J., . . . Gutierrez, M. (2023). Combining cell-free RNA with cell-free DNA in liquid biopsy for hematologic and solid tumors. *Heliyon*, 9(5).
- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2021). *Liquid biopsy: From discovery to clinical application*. *Cancer Discov.* 2021; 11: 858–873. doi: 10.1158/2159-8290. Retrieved from
- Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., . . . Yu, X. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403(6769), 503-511.
- Alvarez, R., Dupuis, J., Plonquet, A., Christov, C., Copie-Bergman, C., Hemery, F., . . . Bedoui, M. (2011). Clinical relevance of flow cytometric immunophenotyping of the cerebrospinal fluid in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Annals of oncology*, 23(5), 1274-1279.
- Aranda IV, R., Dineen, S. M., Craig, R. L., Guerrieri, R. A., & Robertson, J. M. (2009). Comparison and evaluation of RNA quantification methods using viral, prokaryotic, and eukaryotic RNA over a 104 concentration range. *Analytical biochemistry*, 387(1), 122-127.
- Armakolas, A., Kotsari, M., & Koskinas, J. (2023). Liquid Biopsies, Novel Approaches and Future Directions. *Cancers*, 15(5), 1579.
- Armitage, J. O. (2007). How I treat patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 110(1), 29-36.
- Armitage, J. O., & Weisenburger, D. D. (1998). New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Journal of Clinical Oncology*, 16(8), 2780-2795.

- Arzuaga-Mendez, J., Prieto-Fernández, E., Lopez-Lopez, E., Martin-Guerrero, I., García-Ruiz, J. C., & García-Orad, A. (2019). Cell-free DNA as a biomarker in diffuse large B-cell lymphoma: a systematic review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 139, 7-15.
- Asif, H., Zubair, R., Siddiqui, I. A., Mahmood, M. T., Jamil, A., Tahir, A., & Mahmood Sr, M. T. (2023). The Diagnostic Accuracy of Bone Marrow Biopsy Versus PET/CT Scan in Identifying Bone Marrow Involvement in Diffuse Large B Cell Lymphoma Patients at a Cancer Hospital. *Cureus*, 15(2).
- Aucamp, J., Bronkhorst, A. J., Badenhorst, C. P., & Pretorius, P. J. (2018). The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biological Reviews*, 93(3), 1649-1683.
- Avivi, I., Zilberlicht, A., Dann, E. J., Leiba, R., Faibish, T., Rowe, J. M., & Bar-Shalom, R. (2013). Strikingly high false positivity of surveillance FDG-PET/CT scanning among patients with diffuse large cell lymphoma in the rituximab era. *American journal of hematology*, 88(5), 400-405.
- Bajwa, R., Cheema, A., Khan, T., Amirpour, A., Paul, A., Chaughtai, S., . . . Gupta, V. (2019). Adverse effects of immune checkpoint inhibitors (programmed death-1 inhibitors and cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4 inhibitors): results of a retrospective study. *Journal of clinical medicine research*, 11(4), 225.
- Ballabio, A., & Bonifacino, J. S. (2020). Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 21(2), 101-118.
- Barakat, Y. (2023). ترجمة الأبجدية النووية إلى أبجدية البروتين. In Y. Barakat, R. Abo Samra, R. Almokbel, R. Abazid, & ... (Eds.), 1 أبجدية الحموض النووية وتقاناتها-المبادئ والتطبيقات الصحية (1) ed., pp. 75-94). Damascus-Syria: ACATAB.
- Bardol, T., Pageaux, G.-P., Assenat, E., & Alix-Panabières, C. (2024). Circulating tumor DNA clinical applications in hepatocellular carcinoma: current trends and future perspectives. *Clinical Chemistry*, 70(1), 33-48.
- Barentsz, J., Takahashi, S., Oyen, W., Mus, R., De Mulder, P., Reznick, R., . . . Mali, W. (2006). Commonly used imaging techniques for diagnosis and staging. *Journal of Clinical Oncology*, 24(20), 3234-3244.
- Barrington, S. F., & Kluge, R. (2017). FDG PET for therapy monitoring in Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 44(1), 97-110.
- Barrington, S. F., Mikhaeel, N. G., Kostakoglu, L., Meignan, M., Hutchings, M., Müeller, S. P., . . . Trotman, J. (2014). Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *Journal of Clinical Oncology*, 32(27), 3048.
- Barrington, S. F., Phillips, E. H., Counsell, N., Hancock, B., Pettengell, R., Johnson, P., . . . Clifton-Hadley, L. (2019). Positron emission tomography score has greater prognostic significance than pretreatment risk stratification in early-stage Hodgkin lymphoma in the UK RAPID study. *Journal of Clinical Oncology*, 37(20), 1732.
- Bartels, H., & Bohmer, M. (1971). Microestimation of creatinine. *Clinica Chimica Acta*, 32, 81-85.
- Barton, B., & Peat, J. (2014). *Medical statistics: A guide to SPSS, data analysis and critical appraisal*: John Wiley & Sons.
- Barton, S., Hawkes, E. A., Wotherspoon, A., & Cunningham, D. (2012). Are we ready to stratify treatment for diffuse large B-cell lymphoma using molecular hallmarks? *The oncologist*, 17(12), 1562-1573.
- Bento, L., Díaz-López, A., Barranco, G., Martín-Moreno, A. M., Baile, M., Martín, A., . . . Sánchez-Pina, J. M. (2020). New prognosis score including absolute lymphocyte/monocyte ratio, red blood cell distribution width and beta-2 microglobulin in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: Spanish Lymphoma Group Experience (GELTAMO). *British journal of haematology*, 188(6), 888-897.
- Bingham, N., & Spencer, A. (2020). The role of cell free DNA and liquid biopsies in haematological conditions. *Cancer Drug Resistance*, 3(3), 521.
- Bohers, E., Viailly, P.-J., Becker, S., Marchand, V., Ruminy, P., Maingonnat, C., . . . Camus, V. (2018). Non-invasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by cell-free DNA high-throughput targeted sequencing: analysis of a prospective cohort. *Blood cancer journal*, 8(8), 74.
- Borcoman, E., Nandikolla, A., Long, G., Goel, S., & Le Tourneau, C. (2018). Patterns of response and progression to immunotherapy. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 38, 169-178.

- Bou Zerdan, M., Kassab, J., Saba, L., Haroun, E., Bou Zerdan, M., Allam, S., . . . Abou Moussa, S. (2023). Liquid biopsies and minimal residual disease in lymphoid malignancies. *Frontiers in oncology*, 13, 1173701.
- Brentjens, R. J., Davila, M. L., Riviere, I., Park, J., Wang, X., Cowell, L. G., . . . Olszewska, M. (2013). CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Science translational medicine*, 5(177), 177ra138-177ra138.
- Bronkhorst, A. J., Ungerer, V., & Holdenrieder, S. (2019a). Comparison of methods for the quantification of cell-free DNA isolated from cell culture supernatant. *Tumor Biology*, 41(8), 1010428319866369.
- Bronkhorst, A. J., Ungerer, V., & Holdenrieder, S. (2019b). The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomolecular detection and quantification*, 17, 100087.
- Bronkhorst, A. J., Ungerer, V., Oberhofer, A., Gabriel, S., Polatoglou, E., Randeu, H., . . . Holdenrieder, S. (2022). New perspectives on the importance of cell-free DNA biology. *Diagnostics*, 12(9), 2147.
- Bronkhorst, A. J., Wentzel, J. F., Aucamp, J., Van Dyk, E., Du Plessis, L., & Pretorius, P. J. (2016). Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(1), 157-165.
- Buijns, B., Hoekema, T., Oomens, L., Tiggelaar, R., & Gardeniers, H. (2022). Performance of Spectrophotometric and Fluorometric DNA Quantification Methods. *Analytica*, 3(3), 371-384.
- Burggraaff, C. N., de Jong, A., Hoekstra, O. S., Hoetjes, N. J., Nievelstein, R. A., Jansma, E. P., . . . Zijlstra, J. M. (2019). Predictive value of interim positron emission tomography in diffuse large B-cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 46, 65-79.
- Burnham, P., Dadhania, D., Heyang, M., Chen, F., Westblade, L. F., Suthanthiran, M., . . . De Vlaminc, I. (2018). Urinary cell-free DNA is a versatile analyte for monitoring infections of the urinary tract. *Nature communications*, 9(1), 2412.
- Cai, J., Han, Y., Ren, H., Chen, C., He, D., Zhou, L., . . . Zeng, C. (2013). Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells. *Journal of molecular cell biology*, 5(4), 227-238.
- Carr, R., Fanti, S., Paez, D., Cerci, J., Györke, T., Redondo, F., . . . Nair, R. (2014). Prospective international cohort study demonstrates inability of interim PET to predict treatment failure in diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Nuclear Medicine*, 55(12), 1936-1944.
- Cassel, C. K., & Guest, J. A. (2012). Choosing wisely: helping physicians and patients make smart decisions about their care. *Jama*, 307(17), 1801-1802.
- Cataldi, S., & Viola-Magni, M. (2016). Components of the cytosolic and released virtosomes from stimulated and non-stimulated human lymphocytes. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 6, 236-241.
- Chae, Y. K., Wang, S., Nimeiri, H., Kalyan, A., & Giles, F. J. (2017). Pseudoprogression in microsatellite instability-high colorectal cancer during treatment with combination T cell mediated immunotherapy: a case report and literature review. *Oncotarget*, 8(34), 57889.
- Chamba, C., & Mawalla, W. (2023). *The future of lymphoma diagnosis, prognosis, and treatment monitoring in countries with limited access to pathology services*. Paper presented at the Seminars in Hematology.
- Champiat, S., Dercle, L., Ammari, S., Massard, C., Hollebecque, A., Postel-Vinay, S., . . . Soria, J.-C. (2017). Hyperprogressive Disease Is a New Pattern of Progression in Cancer Patients Treated by Anti-PD-1/PD-L1 Hyperprogressive Disease with Anti-PD-1/PD-L1 Therapy. *Clinical cancer research*, 23(8), 1920-1928.
- Chan, K. A., Leung, S.-F., Yeung, S.-W., Chan, A. T., & Lo, Y. D. (2008). Persistent aberrations in circulating DNA integrity after radiotherapy are associated with poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma patients. *Clinical cancer research*, 14(13), 4141-4145.
- Chang, J. M., Lee, H. J., Goo, J. M., Lee, H.-Y., Lee, J. J., Chung, J.-K., & Im, J.-G. (2006). False positive and false negative FDG-PET scans in various thoracic diseases. *Korean Journal of Radiology*, 7(1), 57-69.
- Chapuy, B., Roemer, M. G., Stewart, C., Tan, Y., Abo, R. P., Zhang, L., . . . Jordanova, E. S. (2016). Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 127(7), 869-881.

- Chapuy, B., Stewart, C., Dunford, A. J., Kim, J., Kamburov, A., Redd, R. A., . . . Ziepert, M. (2018). Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nature medicine*, 24(5), 679-690.
- Che, H., Stanley, K., Jatsenko, T., Thienpont, B., & Vermeesch, J. R. (2022). Expanded knowledge of cell-free DNA biology: Potential to broaden the clinical utility. *Extracell. Vesicles Circ. Nucleic Acids*, 3, 199-217.
- Cheah, C. Y., Hofman, M. S., Dickinson, M., Wirth, A., Westerman, D., Harrison, S. J., . . . Herbert, K. (2013). Limited role for surveillance PET-CT scanning in patients with diffuse large B-cell lymphoma in complete metabolic remission following primary therapy. *British journal of cancer*, 109(2), 312-317.
- Chen, H., Xu, C., Fang, Z., & Mao, S. (2023). Cell-free DNA, MicroRNAs, Proteins, and peptides as liquid biopsy biomarkers in prostate cancer and bladder cancer. *Liquid Biopsies: Methods and Protocols*, 165-179.
- Chen, L., Wu, T., Fan, R., Qian, Y.-S., Liu, J.-F., Bai, J., . . . Du, L.-T. (2024). Cell-free DNA testing for early hepatocellular carcinoma surveillance. *EBioMedicine*, 100.
- Chen, M., & Zhao, H. (2019). Next-generation sequencing in liquid biopsy: cancer screening and early detection. *Human genomics*, 13, 1-10.
- Chen, Z., Li, C., Zhou, Y., Yao, Y., Liu, J., Wu, M., & Su, J. (2023). Liquid biopsies for cancer: From bench to clinic. *MedComm*, 4(4), e329.
- Cheson, B., Fisher, R., Barrington, S., Cavalli, F., Schwartz, L., Zucca, E., & Lister, T. (2014). Alliance, Australasian Leukaemia and Lymphoma Group Eastern Cooperative Oncology Group European Mantle Cell Lymphoma Consortium Italian Lymphoma Foundation European Organisation for Research Treatment of Cancer/Dutch Hemato-Oncology Group Grupo Español de Médula Ósea German High-Grade Lymphoma Study Group German Hodgkin's Study Group Japanese Lymphoma Study Group Lymphoma Study Association NCIC Clinical Trials Group Nordic Lymphoma Study Group Southwest Oncology Group United Kingdom National Cancer Research Institute. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*, 32(27), 3059-3068.
- Cheson, B., Horning, S., Coiffier, B., Shipp, M., Fisher, R., Connors, J., . . . Hagenbeek, A. (1999). NCI Sponsored International Working Group: Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol*, 17(4), 1244.
- Cheson, B. D., Ansell, S., Schwartz, L., Gordon, L. I., Advani, R., Jacene, H. A., . . . Armand, P. (2016). Refinement of the Lugano Classification lymphoma response criteria in the era of immunomodulatory therapy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 128(21), 2489-2496.
- Cheson, B. D., Fisher, R. I., Barrington, S. F., Cavalli, F., Schwartz, L. H., Zucca, E., & Lister, T. A. (2014). Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *Journal of Clinical Oncology*, 32(27), 3059.
- Cheson, B. D., Pfistner, B., Juweid, M. E., Gascoyne, R. D., Specht, L., Horning, S. J., . . . Zucca, E. (2007). Revised response criteria for malignant lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 25(5), 579-586.
- Cheung, M. C., Mittmann, N., Earle, C. C., Rahman, F., Liu, N., & Singh, S. (2018). Are we choosing wisely in lymphoma? excessive use of surveillance CT imaging in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) in long-term remission. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 18(1), e27-e34.
- Cho, W. K., Lee, J., Youn, S.-M., Oh, D., Lim, D. H., Yoon, H. G., . . . Noh, J. M. (2023). Liquid biopsy using cfDNA to predict radiation therapy response in solid tumors. *Radiation Oncology Journal*, 41(1), 32.
- Chua, B. J. G., Low, C. E., Yau, C. E., Tan, Y. H., Chiang, J., Chang, E. W. Y., . . . Rashid, M. F. B. H. (2024). Recent updates on central nervous system prophylaxis in patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma. *Experimental Hematology & Oncology*, 13(1), 1.
- Cirillo, M., Craig, A. F., Borchmann, S., & Kurtz, D. M. (2020). Liquid biopsy in lymphoma: Molecular methods and clinical applications. *Cancer treatment reviews*, 91, 102106.
- Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., . . . Gaulard, P. (2002). CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 346(4), 235-242.

- Connal, S., Cameron, J. M., Sala, A., Brennan, P. M., Palmer, D. S., Palmer, J. D., . . . Baker, M. J. (2023). Liquid biopsies: the future of cancer early detection. *Journal of translational medicine*, 21(1), 118.
- Corazzelli, G., De Filippi, R., Capobianco, G., Frigeri, F., De Rosa, V., Iaccarino, G., . . . Crisci, S. (2010). Tumor flare reactions and response to lenalidomide in patients with refractory classic Hodgkin lymphoma. *Am J Hematol*, 85(1), 87-90.
- Cottreau, A.-S., Lanic, H., Mareschal, S., Meignan, M., Vera, P., Tilly, H., . . . Becker, S. (2016). Molecular profile and FDG-PET/CT total metabolic tumor volume improve risk classification at diagnosis for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Clinical cancer research*, 22(15), 3801-3809.
- Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F., & Bardelli, A. (2013). Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature reviews Clinical oncology*, 10(8), 472-484.
- Cuccuini, W., Briere, J., Mounier, N., Voelker, H.-U., Rosenwald, A., Sundstrom, C., . . . Bron, D. (2012). MYC+ diffuse large B-cell lymphoma is not salvaged by classical R-ICE or R-DHAP followed by BEAM plus autologous stem cell transplantation. *Blood*, 119(20), 4619-4624.
- Cunningham, D., Hawkes, E. A., Jack, A., Qian, W., Smith, P., Mouncey, P., . . . McMillan, A. (2013). Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *The Lancet*, 381(9880), 1817-1826.
- Cutmore, N. H., Krupka, J. A., & Hodson, D. J. (2023). Genetic Profiling in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: The Promise and the Challenge. *Modern Pathology*, 36(1), 100007.
- Cuzzo, B., Lipsky, A., & Cherng, H.-J. J. (2023). Measurable Residual Disease Monitoring in Lymphoma. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 18(6), 292-304.
- D'souza, M. M., Jaimini, A., Bansal, A., Tripathi, M., Sharma, R., Mondal, A., & Tripathi, R. P. (2013). Fdg-pet/ct in lymphoma. *The Indian journal of radiology & imaging*, 23(4), 354.
- Dabaja, B. S., Vanderplas, A. M., Crosby-Thompson, A. L., Abel, G. A., Czuczman, M. S., Friedberg, J. W., . . . Millenson, M. (2015). Radiation for diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: Analysis of the National Comprehensive Cancer Network lymphoma outcomes project. *Cancer*, 121(7), 1032-1039.
- De Rubis, G., Krishnan, S. R., & Bebawy, M. (2019). Liquid biopsies in cancer diagnosis, monitoring, and prognosis. *Trends in pharmacological sciences*, 40(3), 172-186.
- Dennis Lo, Y. (2020). Screening of fetal chromosomal aneuploidy by noninvasive prenatal testing: from innovation to setting public health agendas to potential impact on other fields. *Clinical Chemistry*, 66(1), 25-28.
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(45), e2565.
- Desmots, F., Rossille, D., Roussel, M., Pangault, C., Louarn, L., De Saint Jore, M., . . . Gressin, R. (2023). The negative influence of baseline cell-free DNA on long-term survival in DLBCL depends on frontline treatment intensity. *Clinical cancer research*, 29(12), 2280-2290.
- Diez-Feijóo, R., Andrade-Campos, M., Gibert, J., Sánchez-González, B., Fernández-Ibarrondo, L., Fernández-Rodríguez, C., . . . Vázquez, I. (2024). Cell-Free DNA as a Biomarker at Diagnosis and Follow-Up in 256 B and T-Cell Lymphomas. *Cancers*, 16(2), 321.
- Dogliotti, I., Drandi, D., Genuardi, E., & Ferrero, S. (2018). New molecular technologies for minimal residual disease evaluation in B-cell lymphoid malignancies. *Journal of clinical medicine*, 7(9), 288.
- Drees, E. E. E. (2024). Liquid Biopsy Strategies in Lymphoid Malignancies.
- Dührsen, U., Müller, S., Hertenstein, B., Thomssen, H., Kotzerke, J., Mesters, R., . . . Weckesser, M. (2018). Positron emission tomography-guided therapy of aggressive non-Hodgkin lymphomas (PETAL): a multicenter, randomized phase III trial. *Journal of Clinical Oncology*, 36(20), 2024-2034.
- Earnshaw, W. C. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Current opinion in cell biology*, 7(3), 337-343.
- Eertink, J., Burggraaff, C., Heymans, M., Dührsen, U., Hüttmann, A., Schmitz, C., . . . Mikhaeel, N. (2021). Optimal timing and criteria of interim PET in DLBCL: a comparative study of 1692 patients. *Blood advances*, 5(9), 2375-2384.
- El-Galaly, T. C., Jakobsen, L. H., Hutchings, M., de Nully Brown, P., Nilsson-Ehle, H., Székely, E., . . . Bøgsted, M. (2015). Routine imaging for diffuse large B-cell lymphoma in first complete

- remission does not improve post-treatment survival: a Danish-Swedish population-based study. *J Clin Oncol*, 33(34), 3993-3998.
- El-Galaly, T. C., Villa, D., Gormsen, L. C., Baech, J., Lo, A., & Cheah, C. Y. (2018). FDG-PET/CT in the management of lymphomas: current status and future directions. *Journal of internal medicine*, 284(4), 358-376.
- Elshimali, Y. I., Khaddour, H., Sarkissyan, M., Wu, Y., & Vadgama, J. V. (2013). The clinical utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients. *International journal of molecular sciences*, 14(9), 18925-18958.
- Eskandari, M., Manoochehrabadi, S., Pashaiefar, H., Zaimy, M. A., & Ahmadvand, M. (2019). Clinical significance of cell-free DNA as a prognostic biomarker in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood research*, 54(2), 114-119.
- Fabiny, D. L., & Ertingshausen, G. (1971). Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifChem. *Clinical Chemistry*, 17(8), 696-700.
- Farooq, M., Leevan, E., Ahmed, J., Ko, B., Shin, S., De Souza, A., & Takebe, N. (2024). Blood-based multi-cancer detection: A state-of-the-art update. *Current Problems in Cancer*, 48, 101059.
- Febbo, P. G., Allo, M., Alme, E. B., Cuyun Carter, G., Dumanois, R., Essig, A., . . . Popescu, M. C. (2024). Recommendations for the equitable and widespread implementation of liquid biopsy for cancer care. *JCO Precision Oncology*, 8, e2300382.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 149(4), 778-789.
- Ferrara, R., Mezquita, L., Texier, M., Lahmar, J., Audigier-Valette, C., Tessonier, L., . . . Le Moulec, S. (2018). Hyperprogressive disease in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with PD-1/PD-L1 inhibitors or with single-agent chemotherapy. *Jama Oncology*, 4(11), 1543-1552.
- Ferrari, C., Maggialelli, N., Masi, T., Nappi, A. G., Santo, G., Niccoli Asabella, A., & Rubini, G. (2021). Early evaluation of immunotherapy response in lymphoma patients by 18F-FDG PET/CT: a literature overview. *Journal of Personalized Medicine*, 11(3), 217.
- Figaredo, G., Martín-Muñoz, A., Barrio, S., Parrilla, L., Campos-Martín, Y., Poza, M., . . . Jiménez Ubieto, A. (2023). Genetic Profiling of Cell-Free DNA in Liquid Biopsies: A Complementary Tool for the Diagnosis of B-Cell Lymphomas and the Surveillance of Measurable Residual Disease. *Cancers*, 15(16), 4022.
- Fitzgerald, R. C., Antoniou, A. C., Fruk, L., & Rosenfeld, N. (2022). The future of early cancer detection. *Nature medicine*, 28(4), 666-677.
- Fleischhacker, M., & Schmidt, B. (2007). Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1775(1), 181-232.
- Fossati, P., Prencipe, L., & Berti, G. (1980). Use of 3, 5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clinical Chemistry*, 26(2), 227-231.
- Franceschini, G. M., Quaini, O., Mizuno, K., Orlando, F., Ciani, Y., Ku, S.-Y., . . . Benelli, M. (2024). Noninvasive Detection of Neuroendocrine Prostate Cancer through Targeted Cell-free DNA Methylation. *Cancer Discovery*, OF1-OF22.
- Freedman, A. S., Aster, J. C., Lister, A., & Rosmarin, A. G. (2023). Epidemiology, clinical manifestations, pathologic features, and diagnosis of diffuse large B cell lymphoma - UpToDate. Accessed on 1 Feb 2023. Available at: https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-clinical-manifestations-pathologic-features-and-diagnosis-of-diffuse-large-b-cell-lymphoma?search=epidemiology-clinical-manifestation%E2%80%A6ologic-features-and-diagnosis-of-diffuse-large-b-cell-lymphoma&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1.
- Freedman, A. S., Friedberg, J. W., Aster, J. C., Gurbuxani, S., & Sekeres, M. A. (2023). Classification of hematopoietic neoplasms - UpToDate. Accessed on 1 Feb 2023. Available at: https://www.uptodate.com/contents/classification-of-hematopoietic-neoplasms/print?topicRef=4703&source=see_link.
- Frickhofen, N., Muller, E., Sandherr, M., Binder, T., Bangerter, M., Wiest, C., . . . Heimpel, H. (1997). Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 90(12), 4953-4960.
- Frood, R., Burton, C., Tsoumpas, C., Frangi, A., Gleeson, F., Patel, C., & Scarsbrook, A. (2021). Baseline PET/CT imaging parameters for prediction of treatment outcome in Hodgkin and diffuse

- large B cell lymphoma: a systematic review. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 48, 3198-3220.
- Gahan, P. B., & Stroun, M. (2010). The virtosome—a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell biochemistry and function*, 28(7), 529-538.
- Galimberti, S., Genuardi, E., Mazziotta, F., Iovino, L., Morabito, F., Grassi, S., . . . Petrini, M. (2019). The minimal residual disease in non-Hodgkin's lymphomas: from the laboratory to the clinical practice. *Frontiers in oncology*, 9, 528.
- Galluzzi, L., Kepp, O., Krautwald, S., Kroemer, G., & Linkermann, A. (2014). *Molecular mechanisms of regulated necrosis*. Paper presented at the Seminars in cell & developmental biology.
- García-Alegría, A. M., Anduro-Corona, I., Pérez-Martínez, C. J., Guadalupe Corella-Madueño, M. A., Rascón-Durán, M. L., & Astiazaran-Garcia, H. (2020). Quantification of DNA through the NanoDrop spectrophotometer: methodological validation using standard reference material and Sprague Dawley rat and human DNA. *International journal of analytical chemistry*, 2020.
- Garcia-Olmo, D., Garcia-Olmo, D., Ontanon, J., Martinez, E., & Vallejo, M. (1999). Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genomestasis. *Histology and histopathology*, 14(4), 1159-1164.
- Garg, M., Takyar, J., Dhawan, A., Saggi, G., Agrawal, N., Hall, A., . . . Ryland, K. E. (2022). Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): A Structured Literature Review of the Epidemiology, Treatment Guidelines, and Real-World Treatment Patterns. *Blood*, 140(Supplement 1), 12106-12107.
- Giacona, M. B., Ruben, G. C., Iczkowski, K. A., Roos, T. B., Porter, D. M., & Sorenson, G. D. (1998). Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*, 17(1), 89-97.
- Gleeson, M., Hawkes, E. A., Cunningham, D., Jack, A., & Linch, D. (2015). Caution in the Use of Immunohistochemistry for Determination of Cell of Origin in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(28), 3215-3216.
- Glick, B. R., & Patten, C. L. (2017). *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA* (5th ed.): John Wiley & Sons.
- Gobeil, S., Boucher, C., Nadeau, D., & Poirier, G. (2001). Characterization of the necrotic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death & Differentiation*, 8(6), 588-594.
- Golden, E. B., Chhabra, A., Chachoua, A., Adams, S., Donach, M., Fenton-Kerimian, M., . . . Goldberg, J. (2015). Local radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to generate abscopal responses in patients with metastatic solid tumours: a proof-of-principle trial. *The lancet oncology*, 16(7), 795-803.
- Grabuschnig, S., Bronkhorst, A. J., Holdenrieder, S., Rosales Rodriguez, I., Schliep, K. P., Schwendenwein, D., . . . Sensen, C. W. (2020). Putative origins of cell-free DNA in humans: a review of active and passive nucleic acid release mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 21(21), 8062.
- Granata, V., Pradella, S., Cozzi, D., Fusco, R., Faggioni, L., Coppola, F., . . . Lacasella, G. V. (2021). Computed tomography structured reporting in the staging of lymphoma: A Delphi consensus proposal. *Journal of clinical medicine*, 10(17), 4007.
- Griffeth, L. K. (2005). *Use of PET/CT scanning in cancer patients: technical and practical considerations*. Paper presented at the Baylor University Medical Center Proceedings.
- Guay, C., & Regazzi, R. (2017). Exosomes as new players in metabolic organ cross-talk. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 19, 137-146.
- Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V., & Agnati, L. F. (2010). Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *Journal of neural transmission*, 117, 1-4.
- Guglielmi, R., Andreisek, G., & Halpern, B. S. (2022). 18F FDG imaging—response criteria in tumors. *European Journal of Radiology*, 147, 110054.
- Guo, Z. (2022). *The Principle and State-of-Art Facilities for PET*. Paper presented at the Journal of Physics: Conference Series.
- Guppy, A., Tebbutt, N., Norman, A., & Cunningham, D. (2003). The role of surveillance CT scans in patients with diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia & lymphoma*, 44(1), 123-125.

- Gupta, G., Ghalaut, V., Lokanathan, V., & Sharma, P. (2017). 33P Prognostic significance of serum Beta 2 Microglobulin in Non-Hodgkin Lymphoma. *Annals of oncology*, 28(suppl_10), mdx653.010.
- Haïoun, C., Itti, E., Rahmouni, A., Brice, P., Rain, J.-D., Belhadj, K., . . . Reyes, F. (2005). [18F] fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (FDG-PET) in aggressive lymphoma: an early prognostic tool for predicting patient outcome. *Blood*, 106(4), 1376-1381.
- Haïoun, C., Lepage, E., Gisselbrecht, C., Salles, G., Coiffier, B., Brice, P., . . . Tilly, H. (2000). Survival benefit of high-dose therapy in poor-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma: final analysis of the prospective LNH87-2 protocol—a groupe d'Etude des lymphomes de l'Adulte study. *Journal of Clinical Oncology*, 18(16), 3025-3030.
- Hans, C. P., Weisenburger, D. D., Greiner, T. C., Gascoyne, R. D., Delabie, J., Ott, G., . . . Jaffe, E. S. (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103(1), 275-282.
- He, W., Xiao, Y., Yan, S., Zhu, Y., & Ren, S. (2023). Cell-free DNA in the management of prostate cancer: Current status and future prospective. *Asian Journal of Urology*, 10(3), 298-316.
- Heitzer, E., Haque, I. S., Roberts, C. E., & Speicher, M. R. (2019). Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nature Reviews Genetics*, 20(2), 71-88.
- Herrera, A. F., & Armand, P. (2017). Minimal residual disease assessment in lymphoma: methods and applications. *Journal of Clinical Oncology*, 35(34), 3877.
- Hodi, F. S., Hwu, W.-J., Kefford, R., Weber, J. S., Daud, A., Hamid, O., . . . Gangadhar, T. C. (2016). Evaluation of immune-related response criteria and RECIST v1. 1 in patients with advanced melanoma treated with pembrolizumab. *Journal of Clinical Oncology*, 34(13), 1510.
- Hohaus, S., Giachelia, M., Massini, G., Mansueto, G., Vannata, B., Bozzoli, V., . . . Larocca, L. M. (2009). Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Annals of oncology*, 20(8), 1408-1413.
- Højlund, E. L., Cédile, O., Larsen, T. S., Vimalathas, G., Møller, M. B., Hansen, M. H., & Nyvold, C. G. (2023). Cell-free DNA for detection of clonal B cells in diffuse large B cell lymphoma by sequencing. *International Journal of Laboratory Hematology*.
- Horn, H., Ziepert, M., Becher, C., Barth, T. F., Bernd, H.-W., Feller, A. C., . . . Hansmann, M.-L. (2013). MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 121(12), 2253-2263.
- Hu, Z., Chen, H., Long, Y., Li, P., & Gu, Y. (2021). The main sources of circulating cell-free DNA: apoptosis, necrosis and active secretion. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 157, 103166.
- Hui, D., Proctor, B., Donaldson, J., Shenkier, T., Hoskins, P., Klasa, R., . . . Connors, J. M. (2010). Prognostic implications of extranodal involvement in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *Leukemia & lymphoma*, 51(9), 1-10.
- Ignatiadis, M., Lee, M., & Jeffrey, S. S. (2015). Circulating tumor cells and circulating tumor DNA: challenges and opportunities on the path to clinical utility. *Clinical cancer research*, 21(21), 4786-4800.
- Ilkhani, K., Bastami, M., Delgir, S., Safi, A., Talebian, S., & Alivand, M.-R. (2021). The engaged role of tumor microenvironment in cancer metabolism: focusing on cancer-associated fibroblast and exosome mediators. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 21(2), 254-266.
- Ingelsson, B., Söderberg, D., Strid, T., Söderberg, A., Bergh, A.-C., Loitto, V., . . . Rosén, A. (2018). Lymphocytes eject interferogenic mitochondrial DNA webs in response to CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides of class C. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(3), E478-E487.
- Irenge, L. M., Robert, A., & Gala, J.-L. (2005). Quantitative assessment of human β -globin gene expression in vitro by TaqMan real-time reverse transcription-PCR: comparison with competitive reverse transcription-PCR and application to mutations or deletions in noncoding regions. *Clinical Chemistry*, 51(12), 2395-2396.
- Iriyama, C., Murate, K., Iba, S., Okamoto, A., Goto, N., Yamamoto, H., . . . Hattori, K. (2023). Utility of cerebrospinal fluid liquid biopsy in distinguishing CNS lymphoma from cerebrospinal infectious/demyelinating diseases. *Cancer Medicine*, 12(16), 16972-16984.
- Islam, M. N., Das, S. R., Emin, M. T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., . . . Bhattacharya, J. (2012). Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nature medicine*, 18(5), 759-765.

- Islam, P., Goldstein, J., & Flowers, C. R. (2019). PET-derived tumor metrics predict DLBCL response and progression-free survival. *Leukemia & lymphoma*.
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R.-D., & Knippers, R. (2001). DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research*, 61(4), 1659-1665.
- James, K., Eisenhauer, E., Christian, M., Terenziani, M., Vena, D., Muldal, A., & Therasse, P. (1999). Measuring response in solid tumors: unidimensional versus bidimensional measurement. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(6), 523-528.
- Jeon, K., Lee, J., Lee, J.-S., Kim, M., Kim, H.-S., Kang, H. J., & Lee, Y. K. (2019). Quantification of cell-free DNA: a comparative study of three different methods. *Journal of Laboratory Medicine and Quality Assurance*, 41(4), 214-219.
- Jiang, P., Chan, C. W., Chan, K. A., Cheng, S. H., Wong, J., Wong, V. W.-S., . . . Chan, H. L. (2015). Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), E1317-E1325.
- Jung, K., Fleischhacker, M., & Rabien, A. (2010). Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—a critical appraisal of the literature. *Clinica Chimica Acta*, 411(21-22), 1611-1624.
- Juweid, M. E., Mueller, M., Alhourri, A., A-Risheq, M. Z., & Mottaghy, F. M. (2021). Positron emission tomography/computed tomography in the management of Hodgkin and B-cell non-Hodgkin lymphoma: An update. *Cancer*, 127(20), 3727-3741.
- Kallam, A., Adusumalli, J., & Armitage, J. O. (2020). *Surveillance in patients with diffuse large B cell lymphoma*. Paper presented at the Mayo Clinic Proceedings.
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2016). *Discovery of double-stranded genomic DNA in circulating exosomes*. Paper presented at the Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology.
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478), eaau6977.
- Kang, J., Demaria, S., & Formenti, S. (2016). Current clinical trials testing the combination of immunotherapy with radiotherapy. *Journal for immunotherapy of cancer*, 4(1), 1-20.
- Kashyap, R., Lau, E., George, A., Seymour, J. F., Lade, S., Hicks, R. J., & Hofman, M. S. (2013). High FDG activity in focal fat necrosis: a pitfall in interpretation of posttreatment PET/CT in patients with non-Hodgkin lymphoma. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 40, 1330-1336.
- Kato, S., Goodman, A., Walavalkar, V., Barkauskas, D. A., Sharabi, A., & Kurzrock, R. (2017). Hyperprogressors after Immunotherapy: Analysis of Genomic Alterations Associated with Accelerated Growth Rate Genomics of Immunotherapy-Associated Hyperprogressors. *Clinical cancer research*, 23(15), 4242-4250.
- Kemp, M. G., Reardon, J. T., Lindsey-Boltz, L. A., & Sancar, A. (2012). Mechanism of release and fate of excised oligonucleotides during nucleotide excision repair. *Journal of Biological Chemistry*, 287(27), 22889-22899.
- Khier, S., & Lohan, L. (2018). Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: critical appraisal of the literature. *Future science OA*, 4(4), FSO295.
- Kiamanesh, Z., Ayati, N., Sadeghi, R., Hawkes, E., Lee, S. T., & Scott, A. M. (2022). The value of FDG PET/CT imaging in outcome prediction and response assessment of lymphoma patients treated with immunotherapy: a meta-analysis and systematic review. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 49(13), 4661-4676.
- Kim, J. H., Lee, J., Park, J., & Gho, Y. S. (2015). *Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles*. Paper presented at the Seminars in cell & developmental biology.
- Kitajima, K., Okada, M., Yoshihara, K., Tokugawa, T., Sawada, A., Yoshihara, S., . . . Kawamoto, H. (2019). Predictive value of interim FDG-PET/CT findings in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Oncotarget*, 10(52), 5403.
- Koffler, D., Agnello, V., Winchester, R., & Kunkel, H. G. (1973). The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *The Journal of clinical investigation*, 52(1), 198-204.
- Kowal-Wisniewska, E., Jaskiewicz, K., Bartochowska, A., Kiwerska, K., Ustaszewski, A., Gorecki, T., . . . Jarmuz-Szymczak, M. (2024). Towards effectiveness of cell free DNA based liquid biopsy in head and neck squamous cell carcinoma. *Scientific reports*, 14(1), 2251.
- Kristensen, L. S., Hansen, J. W., Kristensen, S. S., Tholstrup, D., Harsløf, L. B. S., Pedersen, O. B., . . . Grønbaek, K. (2016). Aberrant methylation of cell-free circulating DNA in plasma predicts poor outcome in diffuse large B cell lymphoma. *Clinical epigenetics*, 8(1), 1-11.

- Kubackzkova, V., Vrabel, D., Sedlarikova, L., Besse, L., & Sevcikova, S. (2017). Cell-free DNA—minimally invasive marker of hematological malignancies. *European Journal of Haematology*, 99(4), 291-299.
- Küchler, E. C., Tannure, P. N., Falagan-Lotsch, P., Lopes, T. S., Granjeiro, J. M., & Amorim, L. M. F. (2012). Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. *Journal of Applied Oral Science*, 20, 467-471.
- Kumar, V., Shrivastava, S. M., Meghal, T., & Chandra, B. A. (2018). Recent Advances in Diffuse Large B Cell Lymphoma *Hematology-Latest Research and Clinical Advances*: IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.74263.
- Kurtz, D. M., Green, M. R., Bratman, S. V., Scherer, F., Liu, C. L., Kunder, C. A., . . . Kihira, S. (2015). Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 125(24), 3679-3687.
- Kurtz, D. M., Scherer, F., Jin, M. C., Soo, J., Craig, A. F., Esfahani, M. S., . . . Tibshirani, R. (2018). Circulating tumor DNA measurements as early outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 36(28), 2845.
- Kurz, K. S., Kalmbach, S., Ott, M., Staiger, A. M., Ott, G., & Horn, H. (2023). Follicular Lymphoma in the 5th Edition of the WHO-Classification of Haematolymphoid Neoplasms—Updated Classification and New Biological Data. *Cancers*, 15(3), 785.
- Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T., & Grinshpun, A. (2019). Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer biology & therapy*, 20(8), 1057-1067.
- Kwee, T. C., Kwee, R. M., & Nievelstein, R. A. (2008). Imaging in staging of malignant lymphoma: a systematic review. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 111(2), 504-516.
- Kwong, Y.-L., Chan, T. S., Tan, D., Kim, S. J., Poon, L.-M., Mow, B., . . . Iqbal, J. (2017). PD1 blockade with pembrolizumab is highly effective in relapsed or refractory NK/T-cell lymphoma failing l-asparaginase. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 129(17), 2437-2442.
- Lacy, S. E., Barrans, S. L., Beer, P. A., Painter, D., Smith, A. G., Roman, E., . . . Van Hoppe, S. J. (2020). Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: a Haematological Malignancy Research Network report. *Blood*, 135(20), 1759-1771.
- Larrea, E., Sole, C., Manterola, L., Goicoechea, I., Armesto, M., Arestin, M., . . . Fernandez-Mercado, M. (2016). New concepts in cancer biomarkers: circulating miRNAs in liquid biopsies. *International journal of molecular sciences*, 17(5), 627.
- Lee, T. H., Chennakrishnaiah, S., Meehan, B., Montermini, L., Garnier, D., D'Asti, E., . . . Jabado, N. (2016). Barriers to horizontal cell transformation by extracellular vesicles containing oncogenic H-ras. *Oncotarget*, 7(32), 51991.
- Leeksa, O., De Miranda, N., & Veelken, H. (2017). Germline mutations predisposing to diffuse large B-cell lymphoma. *Blood cancer journal*, 7(2), e532-e532.
- Li, M., Ding, N., Mi, L., Shi, Y., Du, X., Yi, Y., . . . Zhu, J. (2022). Liquid biopsy in diffuse large B-cell lymphoma: utility in cell origin determination and survival prediction in Chinese patients. *Leukemia & lymphoma*, 63(3), 608-617.
- Li, M., Jia, Y., Xu, J., Cheng, X., & Xu, C. (2017). Assessment of the circulating cell-free DNA marker association with diagnosis and prognostic prediction in patients with lymphoma: a single-center experience. *Annals of hematology*, 96, 1343-1351.
- Li, M., Mi, L., Wang, C., Wang, X., Zhu, J., Qi, F., . . . Cao, J. (2022). Clinical implications of circulating tumor DNA in predicting the outcome of diffuse large B cell lymphoma patients receiving first-line therapy. *BMC medicine*, 20(1), 1-13.
- Li, M., & Xu, C. (2017). Circulating cell-free DNA utility for the surveillance of patients with treated diffuse large B-cell lymphoma. *Clinical Oncology*, 29(9), 637-638.
- Li, W. (2022). The 5th Edition of the World Health Organization Classification of Hematolymphoid Tumors. In W. Li (Ed.), *Leukemia*. Brisbane (AU): Exon Publications. Online first 15 Sep 2022. Doi: <https://doi.org/10.36255/exon-publications-leukemia-who-5th-editionhematolymphoid-tumors>.
- Li, Z., Mu, W., & Xiao, M. (2023). Genetic lesions and targeted therapy in Hodgkin lymphoma. *Therapeutic Advances in Hematology*, 14, 20406207221149245.
- Liedtke, M., Hamlin, P., Moskowitz, C., & Zelenetz, A. (2006). Surveillance imaging during remission identifies a group of patients with more favorable aggressive NHL at time of relapse: a

- retrospective analysis of a uniformly-treated patient population. *Annals of oncology*, 17(6), 909-913.
- Lim, J. K., Kuss, B., & Talaulikar, D. (2021). Role of cell-free DNA in haematological malignancies. *Pathology*, 53(3), 416-426.
- Lim, S., Tao, M., Cheung, Y., Rajan, S., & Mann, B. (2005). Can patients with early-stage diffuse large B-cell lymphoma be treated without bone marrow biopsy? *Annals of oncology*, 16(2), 215-218.
- Lister, T., Crowther, D., Sutcliffe, S., Glatstein, E., Canellos, G., Young, R., . . . Tubiana, M. (1989). Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *Journal of Clinical Oncology*, 7(11), 1630-1636.
- Liu, Y., & Barta, S. K. (2019). Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *American journal of hematology*, 94(5), 604-616.
- Lo, Y. D., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W., & Wainscoat, J. S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet*, 350(9076), 485-487.
- Lone, S. N., Nisar, S., Masoodi, T., Singh, M., Rizwan, A., Hashem, S., . . . Haris, M. (2022). Liquid biopsy: A step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Molecular Cancer*, 21(1), 79.
- Long, N. M., & Smith, C. S. (2011). Causes and imaging features of false positives and false negatives on 18F-PET/CT in oncologic imaging. *Insights into imaging*, 2(6), 679-698.
- Lopci, E., & Meignan, M. (2020). Current evidence on PET response assessment to immunotherapy in lymphomas. *PET clinics*, 15(1), 23-34.
- López-Guillermo, A., Colomo, L., Jiménez, M., Bosch, F., Villamor, N., Arenillas, L., . . . Colomer, D. (2005). Diffuse large B-cell lymphoma: clinical and biological characterization and outcome according to the nodal or extranodal primary origin. *Journal of Clinical Oncology*, 23(12), 2797-2804.
- Lou, J., Zhang, J., Deng, Q., & Chen, X. (2024). Neutrophil extracellular traps mediate neuro-immunothrombosis. *Neural Regeneration Research*, 19(8), 1734-1740.
- Lu, H., Busch, J., Jung, M., Rabenhorst, S., Ralla, B., Kilic, E., . . . Jung, K. (2016). Diagnostic and prognostic potential of circulating cell-free genomic and mitochondrial DNA fragments in clear cell renal cell carcinoma patients. *Clinica Chimica Acta*, 452, 109-119.
- Lucey, B. C., Stuhlfaut, J. W., & Soto, J. A. (2005). Mesenteric lymph nodes: detection and significance on MDCT. *American Journal of Roentgenology*, 184(1), 41-44.
- Luo, J., Craver, A., Bahl, K., Stepniak, L., Moore, K., King, J., . . . Aschebrook-Kilfoy, B. (2022). Etiology of non-Hodgkin lymphoma: A review from epidemiologic studies. *Journal of the National Cancer Center*.
- Luo, Y., Xu, L., Ma, Y., Yan, X., Hou, R., Huang, Y., . . . Jiang, L. (2023). Association between the first and second trimester cell free DNA fetal fraction and spontaneous preterm birth. *Expert Review of Molecular Diagnostics*(just-accepted).
- Lv, L., & Liu, Y. (2021). Clinical application of liquid biopsy in non-Hodgkin lymphoma. *Frontiers in oncology*, 11, 658234.
- Mafrá, A., Laversanne, M., Gospodarowicz, M., Klinger, P., De Paula Silva, N., Piñeros, M., . . . Znaor, A. (2022). Global patterns of non-Hodgkin lymphoma in 2020. *International journal of cancer*, 151(9), 1474-1481.
- Mamede, M., Higashi, T., Kitaichi, M., Ishizu, K., Ishimori, T., Nakamoto, Y., . . . Wada, H. (2005). [18F] FDG uptake and PCNA, Glut-1, and Hexokinase-II expressions in cancers and inflammatory lesions of the lung. *Neoplasia*, 7(4), 369-379.
- Mamot, C., Klingbiel, D., Hitz, F., Renner, C., Pabst, T., Driessen, C., . . . Krasniqi, F. (2015). Final results of a prospective evaluation of the predictive value of interim positron emission tomography in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP-14 (SAKK 38/07). *Journal of Clinical Oncology*, 33(23), 2523-2529.
- Mandel, P., & Metais, P. (1948). Nuclear acids in human blood plasma. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*, 142(3-4), 241-243.
- Margolis, L., & Sadovsky, Y. (2019). The biology of extracellular vesicles: The known unknowns. *PLoS biology*, 17(7), e3000363.
- Markus, H., Contente-Cuomo, T., Farooq, M., Liang, W. S., Borad, M. J., Sivakumar, S., . . . Berens, M. E. (2018). Evaluation of pre-analytical factors affecting plasma DNA analysis. *Scientific reports*, 8(1), 7375.

- Martins, I., Ribeiro, I. P., Jorge, J., Gonçalves, A. C., Sarmiento-Ribeiro, A. B., Melo, J. B., & Carreira, I. M. (2021). Liquid biopsies: applications for cancer diagnosis and monitoring. *Genes*, 12(3), 349.
- Matsuoka, T., & Yashiro, M. (2024). Current status and perspectives of genetic testing in gastrointestinal cancer. *Oncology Letters*, 27(1), 1-17.
- Maurer, M. J., Ghesquières, H., Jais, J.-P., Witzig, T. E., Haioun, C., Thompson, C. A., . . . Macon, W. R. (2014). Event-free survival at 24 months is a robust end point for disease-related outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 32(10), 1066.
- McCarten, K. M., Nadel, H. R., Shulkin, B. L., & Cho, S. Y. (2019). Imaging for diagnosis, staging and response assessment of Hodgkin lymphoma and non-Hodgkin lymphoma. *Pediatric radiology*, 49, 1545-1564.
- McGehee, E., Patel, H., Pearson, C., Clements, K., Jaso, J. M., Chen, W., . . . Ramakrishnan Geethakumari, P. (2021). Combined immune checkpoint blockade and radiotherapy induces durable remission in relapsed natural killer/T-cell lymphoma: a case report and review of the literature. *Journal of Medical Case Reports*, 15(1), 1-5.
- Meddeb, R., Pisareva, E., & Thierry, A. R. (2019). Guidelines for the preanalytical conditions for analyzing circulating cell-free DNA. *Clinical Chemistry*, 65(5), 623-633.
- Meldolesi, J. (2021). Extracellular vesicles (exosomes and ectosomes) play key roles in the pathology of brain diseases. *Molecular biomedicine*, 2(1), 18.
- Michot, J.-M., Mazon, R., Dercle, L., Ammari, S., Canova, C., Marabelle, A., . . . Soria, J.-C. (2016). Abscopal effect in a Hodgkin lymphoma patient treated by an anti-programmed death 1 antibody. *European Journal of Cancer*, 66, 91-94.
- Milgrom, S. A., Rechner, L., & Berthelsen, A. (2021). The optimal use of PET/CT in the management of lymphoma patients. *The British journal of radiology*, 94(1127), 20210470.
- Miyazaki, K. (2016). Treatment of diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*, 56(2), 79-88.
- Mohan, P. B., Rajpurohit, S., Musunuri, B., Bhat, G., Lochan, R., & Shetty, S. (2023). Exosomes in chronic liver disease. *Clinica Chimica Acta*, 117215.
- Mole, R. (1953). Whole body irradiation—radiobiology or medicine? *The British journal of radiology*, 26(305), 234-241.
- Molina-Vila, M. A., de-Las-Casas, C. M., Bertran-Alamillo, J., Jordana-Ariza, N., González-Cao, M., & Rosell, R. (2015). cfDNA analysis from blood in melanoma. *Annals of translational medicine*, 3(20).
- Møller, M. B., Pedersen, N. T., & Christensen, B. E. (2004). Diffuse large B-cell lymphoma: clinical implications of extranodal versus nodal presentation—a population-based study of 1575 cases. *British journal of haematology*, 124(2), 151-159.
- Moras, M., Lefevre, S. D., & Ostuni, M. A. (2017). From erythroblasts to mature red blood cells: organelle clearance in mammals. *Frontiers in physiology*, 8, 1076.
- Moskowitz, C. H., Schöder, H., Teruya-Feldstein, J., Sima, C., Iasonos, A., Portlock, C. S., . . . O'Connor, O. A. (2010). Risk-adapted dose-dense immunochemotherapy determined by interim FDG-PET in advanced-stage diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 28(11), 1896.
- Munoz, J., Deshpande, A., Rimsza, L., Nowakowski, G. S., & Kurzrock, R. (2024). Navigating between Scylla and Charybdis: A roadmap to do better than pola-RCHP in DLBCL. *Cancer treatment reviews*, 102691.
- Nagai, H., & Kim, Y. H. (2017). Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns. *J Thorac Dis.*, 9(3), 448-451. doi: 410.21037/jtd.22017.21002.21075.
- Nakata, J., Isohashi, K., Oka, Y., Nakajima, H., Morimoto, S., Fujiki, F., . . . Hashimoto, N. (2021). Imaging assessment of tumor response in the era of immunotherapy. *Diagnostics*, 11(6), 1041.
- Namasivayam, S., Kalra, M. K., Torres, W. E., & Small, W. C. (2006). Adverse reactions to intravenous iodinated contrast media: a primer for radiologists. *Emergency radiology*, 12, 210-215.
- NCCN. (2023). National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines: B-Cell Lymphomas v3.2023. Available at https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/b-cell.pdf. Accessed on Feb 19, 2023.
- NCI. (2024). National Cancer Institute (NCI) Dictionary of Cancer Terms: MRD.

- Negrier, S., Ollivier, L., Escudier, B., Savary, J., Lasset, C., & Thiesse, P. (2000). Reliability of the response rate in oncology: analysis of the causes for variation. *Bulletin du Cancer*, 87(12), 927-934.
- Nielsen, K., Mogensen, H. S., Hedman, J., Niederstätter, H., Parson, W., & Morling, N. (2008). Comparison of five DNA quantification methods. *Forensic Science International: Genetics*, 2(3), 226-230.
- Nishino, M., Giobbie-Hurder, A., Gargano, M., Suda, M., Ramaiya, N. H., & Hodi, F. S. (2013). Developing a Common Language for Tumor Response to Immunotherapy: Immune-Related Response Criteria Using Unidimensional Measurements Unidimensional irRC as a Common Language for Immunotherapy. *Clinical cancer research*, 19(14), 3936-3943.
- Olsson, I., & Ronquist, G. (1990). Nucleic acid association to human prostasomes. *Archives of andrology*, 24(1), 1-10.
- Onesti, C. E., Frères, P., & Jerusalem, G. (2019). Atypical patterns of response to immune checkpoint inhibitors: interpreting pseudoprogression and hyperprogression in decision making for patients' treatment. *Journal of Thoracic Disease*, 11(1), 35.
- Ott, G., Rosenwald, A., & Campo, E. (2013). Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood*, 122(24), 3884-3891.
- Owusu, C., & Berger, N. A. (2014). Comprehensive geriatric assessment in the older cancer patient: coming of age in clinical cancer care. *Clinical practice (London, England)*, 11(6), 749.
- Padhani, A., & Ollivier, L. (2001). The RECIST criteria: implications for diagnostic radiologists. *The British journal of radiology*, 74(887), 983-986.
- Paquin, A. R., Oyogoa, E., McMurry, H. S., Kartika, T., West, M., & Shatzel, J. J. (2023). The diagnosis and management of suspected lymphoma in general practice. *European Journal of Haematology*, 110(1), 3-13.
- Parilova NK, S. N., Marshutina NV, Tyurina NG, Chervontseva AM. (2016). Diagnostic value of soluble interleukin-2 receptor in patients with lymphoproliferative diseases. *P.A. Herzen Journal of Oncology* doi:10.17116/onkolog20165626-30
- Pelosi, E., Penna, D., Douroukas, A., Bello, M., Amati, A., Arena, V., . . . Bisi, G. (2010). Bone marrow disease detection with FDG-PET/CT and bone marrow biopsy during the staging of malignant lymphoma: results from a large multicentre study. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging: Official Publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN)[and] the International Association of Radiopharmacology (IAR),[and] Section of the Society of..* 55(4), 469-475.
- Persky, D. O., Unger, J. M., Spier, C. M., Stea, B., LeBlanc, M., McCarty, M. J., . . . Miller, T. P. (2008). Phase II study of rituximab plus three cycles of CHOP and involved-field radiotherapy for patients with limited-stage aggressive B-cell lymphoma: Southwest Oncology Group study 0014. *Journal of Clinical Oncology*, 26(14), 2258-2263.
- Pessoa, L. S., Heringer, M., & Ferrer, V. P. (2020). ctDNA as a cancer biomarker: A broad overview. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 155, 103109.
- Peters, D. L., & Pretorius, P. J. (2011). Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA—A new paradigm in genetic behaviour. *Clinica Chimica Acta*, 412(11-12), 806-811.
- Petersen, H., Holdgaard, P. C., Madsen, P. H., Knudsen, L. M., Gad, D., Gravergaard, A. E., . . . Bech, K. (2016). FDG PET/CT in cancer: comparison of actual use with literature-based recommendations. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 43, 695-706.
- Petrasch, U., Samaras, P., Haile, S., Veit-Haibach, P., Soyka, J., Knuth, A., . . . Schäfer, N. (2010). Risk-adapted FDG-PET/CT-based follow-up in patients with diffuse large B-cell lymphoma after first-line therapy. *Annals of oncology*, 21(8), 1694-1698.
- Pinzani, P., Salvianti, F., Zaccara, S., Massi, D., De Giorgi, V., Pazzagli, M., & Orlando, C. (2011). Circulating cell-free DNA in plasma of melanoma patients: qualitative and quantitative considerations. *Clinica Chimica Acta*, 412(23-24), 2141-2145.
- Pittella-Silva, F., Chin, Y. M., Chan, H. T., Nagayama, S., Miyauchi, E., Low, S.-K., & Nakamura, Y. (2020). Plasma or serum: which is preferable for mutation detection in liquid biopsy? *Clinical Chemistry*, 66(7), 946-957.
- Pons-Belda, O. D., Fernandez-Uriarte, A., & Diamandis, E. P. (2021). Can circulating tumor DNA support a successful screening test for early cancer detection? The Grail paradigm. *Diagnostics*, 11(12), 2171.
- Ponti, G., Maccaferri, M., Manfredini, M., Kaleci, S., Mandrioli, M., Pellacani, G., . . . Pirola, G. M. (2018). The value of fluorimetry (Qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification

- of cell-free DNA (cfDNA) in malignant melanoma and prostate cancer patients. *Clinica Chimica Acta*, 479, 14-19.
- Pregno, P., Chiappella, A., Bello, M., Botto, B., Ferrero, S., Franceschetti, S., . . . Menga, M. (2012). Interim 18-FDG-PET/CT failed to predict the outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated at the diagnosis with rituximab-CHOP. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 119(9), 2066-2073.
- Price, E. P., Dale, J. L., Cook, J. M., Sarovich, D. S., Seymour, M. L., Ginther, J. L., . . . Kaestli, M. (2012). Development and validation of Burkholderia pseudomallei-specific real-time PCR assays for clinical, environmental or forensic detection applications. *PloS one*, 7(5), e37723.
- Prigent, K., & Aide, N. (2020). 18F-fludeoxyglucose PET/computed tomography for assessing tumor response to immunotherapy and detecting immune-related side effects: a checklist for the PET reader. *PET clinics*, 15(1), 1-10.
- Prokop, M. (2003). Multislice CT: technical principles and future trends. *European radiology*, 13, 3-13.
- Pushpanjali, P., Keshari, J., Prakash, P., Kumar, M., Mandal, M., Kumari, R., & Pushpanjali, P. (2023). Correlation between circulating cell-free DNA levels and breast cancer subtypes: A prospective observational study. *Cureus*, 15(7).
- Qiagen. (2016). QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. *Qiagen Hilden, Germany*. fifth edition.
- Rahmim, A., Lodge, M. A., Karakatsanis, N. A., Panin, V. Y., Zhou, Y., McMillan, A., . . . Wahl, R. L. (2019). Dynamic whole-body PET imaging: principles, potentials and applications. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 46, 501-518.
- Regazzo, G., Marchesi, F., Spagnuolo, M., Méndez, A. B. D., Masi, S., Mengarelli, A., & Rizzo, M. G. (2021). Diffuse large B-cell lymphoma: Time to focus on circulating blood nucleic acids? *Blood Reviews*, 47, 100776.
- Ribeiro Gomes, J., Schmerling, R. A., Haddad, C. K., Racy, D. J., Ferrigno, R., Gil, E., . . . Buzaid, A. C. (2016). Analysis of the abscopal effect with anti-PD1 therapy in patients with metastatic solid tumors. *Journal of immunotherapy*, 39(9), 367-372.
- Rodriguez-Abreu, D., Bordoni, A., & Zucca, E. (2007). Epidemiology of hematological malignancies. *Annals of oncology*, 18(suppl_1), i3-i8.
- Ronquist, K. G., Ronquist, G., Carlsson, L., & Larsson, A. (2009). Human prostasomes contain chromosomal DNA. *The Prostate*, 69(7), 737-743.
- Roschewski, M., Dunleavy, K., Pittaluga, S., Moorhead, M., Pepin, F., Kong, K., . . . Lai, C. (2015). Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *The lancet oncology*, 16(5), 541-549.
- Roschewski, M., Rossi, D., Kurtz, D. M., Alizadeh, A. A., & Wilson, W. H. (2022). Circulating tumor DNA in lymphoma: principles and future directions. *Blood Cancer Discovery*, 3(1), 5-15.
- Roschewski, M., Staudt, L. M., & Wilson, W. H. (2014). Diffuse large B-cell lymphoma—treatment approaches in the molecular era. *Nature reviews Clinical oncology*, 11(1), 12-23.
- Rosenberg, S. A., Boiron, M., DeVita Jr, V. T., Johnson, R. E., Lee, B. J., Ultmann, J. E., & Viamonte Jr, M. (1971). Report of the committee on Hodgkin's disease staging procedures. *Cancer research*, 31(11), 1862-1863.
- Rossi, D., Diop, F., Spaccarotella, E., Monti, S., Zanni, M., Rasi, S., . . . Favini, C. (2017). Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 129(14), 1947-1957.
- Rossi, D., Spina, V., Bruscaggin, A., & Gaidano, G. (2019). Liquid biopsy in lymphoma. *Haematologica*, 104(4), 648.
- Rubin, D. B., Danish, H. H., Ali, A. B., Li, K., LaRose, S., Monk, A. D., . . . Robertson, M. S. (2019). Neurological toxicities associated with chimeric antigen receptor T-cell therapy. *Brain*, 142(5), 1334-1348.
- Runge, H. F., Lacy, S., Barrans, S., Beer, P. A., Painter, D., Smith, A., . . . Tooze, R. (2021). Application of the LymphGen classification tool to 928 clinically and genetically-characterised cases of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL).
- Rutherford, S. C. (2019). Surveillance scanning in lymphoma. *Clin Adv Hematol Oncol*, 17(6), 352-359.
- Rydberg, J., Buckwalter, K. A., Caldemeyer, K. S., Phillips, M. D., Conces Jr, D. J., Aisen, A. M., . . . Kopecky, K. K. (2000). Multisection CT: scanning techniques and clinical applications. *Radiographics*, 20(6), 1787-1806.

- Saâda-Bouزيد, E., Defauchaux, C., Karabajakian, A., Coloma, V. P., Servois, V., Paoletti, X., . . . Loirat, D. (2017). Hyperprogression during anti-PD-1/PD-L1 therapy in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Annals of oncology*, 28(7), 1605-1611.
- Sacidalan, D. B., Ul Haq, S., & Lok, B. H. (2024). Plasma Cell-Free Tumor Methylome as a Biomarker in Solid Tumors: Biology and Applications. *Current Oncology*, 31(1), 482-500.
- Sachpekidis, C., Kopp-Schneider, A., Hakim-Meibodi, L., Dimitrakopoulou-Strauss, A., & Hassel, J. C. (2019). 18F-FDG PET/CT longitudinal studies in patients with advanced metastatic melanoma for response evaluation of combination treatment with vemurafenib and ipilimumab. *Melanoma research*, 29(2), 178-186.
- Sagiraju, S. (2022). Liquid biopsy provides complementary information to tissue biopsies for molecular classification of DLBCL patients.
- Salem, A. E., Shah, H. R., Covington, M. F., Koppula, B. R., Fine, G. C., Wiggins, R. H., . . . Morton, K. A. (2022). PET-CT in Clinical Adult Oncology: I. Hematologic Malignancies. *Cancers*, 14(23), 5941.
- Salviano-Silva, A., Maire, C. L., Lamszus, K., & Ricklefs, F. L. (2022). Circulating cell-free DNA and its clinical utility in cancer. *Journal of Laboratory Medicine*, 46(4), 265-272.
- Salvianti, F., Pinzani, P., Verderio, P., Ciniselli, C. M., Massi, D., De Giorgi, V., . . . Orlando, C. (2012). Multiparametric analysis of cell-free DNA in melanoma patients. *PloS one*, 7(11), e49843.
- Sansone, P., Savini, C., Kurelac, I., Chang, Q., Amato, L. B., Strillacci, A., . . . Daly, L. (2017). Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(43), E9066-E9075.
- Scherer, F., Kurtz, D. M., Newman, A. M., Stehr, H., Craig, A. F., Esfahani, M. S., . . . Liu, C. L. (2016). Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Science translational medicine*, 8(364), 364ra155-364ra155.
- Schmitz, R., Wright, G. W., Huang, D. W., Johnson, C. A., Phelan, J. D., Wang, J. Q., . . . Shaffer, A. L. (2018). Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 378(15), 1396-1407.
- Schöder, H., & Moskowitz, C. (2008). PET imaging for response assessment in lymphoma: potential and limitations. *Radiologic Clinics of North America*, 46(2), 225-241.
- Schöder, H., Polley, M.-Y. C., Knopp, M. V., Hall, N., Kostakoglu, L., Zhang, J., . . . Zelenetz, A. D. (2020). Prognostic value of interim FDG-PET in diffuse large cell lymphoma: results from the CALGB 50303 Clinical Trial. *Blood*, 135(25), 2224-2234.
- Schroers-Martin, J. G., Alig, S., Garofalo, A., Tessoulin, B., Sugio, T., & Alizadeh, A. A. (2023). Molecular Monitoring of Lymphomas. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 18, 149-180.
- Schuster, S. J., Svoboda, J., Chong, E. A., Nasta, S. D., Mato, A. R., Anak, Ö., . . . Landsburg, D. (2017). Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas. *New England Journal of Medicine*, 377(26), 2545-2554.
- Scientific_Committee. (1982). Recommandations pour la mesure de la concentration catalytique de la lactate deshydrogenase dans le serum humain a 30 C. *Ann Biol Clin*, 40, 87-164.
- Seam, P., Juweid, M. E., & Cheson, B. D. (2007). The role of FDG-PET scans in patients with lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 110(10), 3507-3516.
- Sehn, L. H., & Gascoyne, R. D. (2015). Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood*, 125(1), 22-32.
- Sehn, L. H., & Salles, G. (2021). Diffuse large B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 384(9), 842-858.
- Semelka, R. C., Armao, D. M., Elias, J., & Huda, W. (2007). Imaging strategies to reduce the risk of radiation in CT studies, including selective substitution with MRI. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: an Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 25(5), 900-909.
- Seyedolmohadessin, S. M., Akbari, M. T., Nourmohammadi, Z., Basiri, A., & Pourmand, G. (2018). Assessing the diagnostic value of plasma-free DNA in prostate cancer screening. *Iranian biomedical journal*, 22(5), 331.
- Shi, Y., Su, H., Song, Y., Jiang, W., Sun, X., Qian, W., . . . Zhou, J. (2019). Safety and activity of sintilimab in patients with relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma (ORIENT-1): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Haematology*, 6(1), e12-e19.

- Shipp, M. (1993). A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The international non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project. *N Engl j Med*, 329, 987-994.
- Sidransky, D., Von Eschenbach, A., Tsai, Y. C., Jones, P., Summerhayes, I., Marshall, F., . . . Frost, P. (1991). Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science*, 252(5006), 706-709.
- Singh, R., Shaik, S., Negi, B. S., Rajguru, J. P., Patil, P. B., Parihar, A. S., & Sharma, U. (2020). Non-Hodgkin's lymphoma: a review. *Journal of family medicine and primary care*, 9(4), 1834.
- Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S., & Bardelli, A. (2017). Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 14(9), 531-548.
- Slone, H. B., Peters, L. J., & Milas, L. (1979). Effect of host immune capability on radiocurability and subsequent transplantability of a murine fibrosarcoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 63(5), 1229-1235.
- Smith, L., McCourt, O., Henrich, M., Paton, B., Yong, K., Wardle, J., & Fisher, A. (2015). Multiple myeloma and physical activity: a scoping review. *BMJ open*, 5(11), e009576.
- Song, J. Y., Dirnhofer, S., Piris, M. A., Quintanilla-Martínez, L., Pileri, S., & Campo, E. (2022). Diffuse large B-cell lymphomas, not otherwise specified, and emerging entities. *Virchows Archiv*, 1-14.
- Soscia, R. (2023). Non-invasive minimal residual disease (MRD) analysis in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL).
- Sriram, D., Lakhota, R., & Fenske, T. S. (2019). Measurement of circulating tumor DNA to guide management of patients with lymphoma. *Measurement*, 17(9).
- Stegemann, M., Denker, S., & Schmitt, C. A. (2022). DLBCL 1L—What to Expect beyond R-CHOP? *Cancers*, 14(6), 1453.
- Stejskal, P., Goodarzi, H., Srovnal, J., Hajdúch, M., van't Veer, L. J., & Magbanua, M. J. M. (2023). Circulating tumor nucleic acids: biology, release mechanisms, and clinical relevance. *Molecular Cancer*, 22(1), 1-21.
- Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C., & Beljanski, M. (1989). Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*, 46(5), 318-322.
- Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A., & Anker, P. (2001). About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clinica Chimica Acta*, 313(1-2), 139-142.
- Sukswai, N., Lyapichev, K., Khoury, J. D., & Medeiros, L. J. (2020). Diffuse large B-cell lymphoma variants: an update. *Pathology*, 52(1), 53-67.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Susanibar-Adaniya, S., & Barta, S. K. (2021). 2021 Update on Diffuse large B cell lymphoma: A review of current data and potential applications on risk stratification and management. *American journal of hematology*, 96(5), 617-629.
- Swarup, V., & Rajeswari, M. (2007). Circulating (cell-free) nucleic acids—a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS letters*, 581(5), 795-799.
- Swinnen, L. J., Li, H., Quon, A., Gascoyne, R., Hong, F., Ranheim, E. A., . . . Advani, R. H. (2015). Response-adapted therapy for aggressive non-Hodgkin's lymphomas based on early [18F] FDG-PET scanning: ECOG-ACRIN Cancer Research Group study (E3404). *British journal of haematology*, 170(1), 56-65.
- Sworder, B. J., & Kurtz, D. M. (2023). *Cell-free DNA in large B-cell lymphoma: MRD and Beyond*. Paper presented at the Seminars in Hematology.
- Talotta, D., Almasri, M., Cosentino, C., Gaidano, G., & Moia, R. (2023). Liquid biopsy in hematological malignancies: current and future applications. *Frontiers in oncology*, 13, 1164517.
- Tan, E., Schur, P., Carr, R., & Kunkel, H. (1966). Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation*, 45(11), 1732-1740.
- Tavakkoli, M., & Barta, S. K. (2023). 2024 Update: Advances in the risk stratification and management of large B-cell lymphoma. *American journal of hematology*, 98(11), 1791-1805.
- Taylor, C. K. (2019, July 14, 2019). Range Rule for Standard Deviation.
- Temilola, D. O., Wium, M., Paccez, J., Salukazana, A. S., Rotimi, S. O., Otu, H. H., . . . Zerbini, L. F. (2023). Detection of Cancer-Associated Gene Mutations in Urinary Cell-Free DNA among Prostate Cancer Patients in South Africa. *Genes*, 14(10), 1884.

- Thierry, A. R., El Messaoudi, S., Gahan, P., Anker, P., & Stroun, M. (2016). Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer and metastasis reviews*, 35, 347-376.
- Thiesse, P., Ollivier, L., Di Stefano-Louineau, D., Négrier, S., Savary, J., Pignard, K., . . . Escudier, B. (1997). Response rate accuracy in oncology trials: reasons for interobserver variability. Groupe Français d'Immunothérapie of the Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 15(12), 3507-3514.
- Thompson, C. A., Ghesquieres, H., Maurer, M. J., Cerhan, J. R., Biron, P., Ansell, S. M., . . . Johnston, P. B. (2014). Utility of routine post-therapy surveillance imaging in diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, 32(31), 3506.
- Thompson, J. C., Scholes, D. G., Carpenter, E. L., & Aggarwal, C. (2023). Molecular response assessment using circulating tumor DNA (ctDNA) in advanced solid tumors. *British journal of cancer*, 129(12), 1893-1902.
- Thorsen, S. U., Moseholm, K. F., & Clausen, F. B. (2024). Circulating cell-free DNA and its association with cardiovascular disease: what we know and future perspectives. *Current Opinion in Lipidology*, 35(1), 14-19.
- Tilly, H., Gomes da Silva, M., Vitolo, U., Jack, A., Meignan, M., Lopez-Guillermo, A., . . . Pfreundschuh, M. (2015). Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*, 26(suppl_5), v116-v125.
- Timmermans, K., Kox, M., Scheffer, G. J., & Pickkers, P. (2016). Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels, and markers of inflammation, shock, and organ damage in patients with septic shock. *Shock*, 45(6), 607-612.
- Torralba, D., Baixauli, F., Villarroya-Beltri, C., Fernández-Delgado, I., Latorre-Pellicer, A., Acín-Pérez, R., . . . Jorge, I. (2018). Priming of dendritic cells by DNA-containing extracellular vesicles from activated T cells through antigen-driven contacts. *Nature communications*, 9(1), 2658.
- Trejo-Becerril, C., Pérez-Cárdenas, E., Taja-Chayeb, L., Anker, P., Herrera-Goepfert, R., Medina-Velázquez, L. A., . . . Cruz-Velázquez, J. (2012). Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivo model. *PloS one*, 7(12), e52754.
- Trigg, R., Martinson, L., Parpart-Li, S., & Shaw, J. (2018). Factors that influence quality and yield of circulating-free DNA: A systematic review of the methodology literature. *Heliyon*, 4(7).
- UK, N. G. A. (2016). Patient information needs *Non-Hodgkin's Lymphoma: Diagnosis and Management*: National Institute for Health and Care Excellence (UK).
- Ulivi, P., & Indraccolo, S. (2022). Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring and Prognosis (Vol. 10, pp. 2748): MDPI.
- van Dessel, L. F., Beijer, N., Helmijs, J. C., Vitale, S. R., Kraan, J., Look, M. P., . . . Martens, J. W. (2017). Application of circulating tumor DNA in prospective clinical oncology trials—standardization of preanalytical conditions. *Molecular oncology*, 11(3), 295-304.
- van Ginkel, J., van den Broek, D., van Kuik, J., Linders, D., de Weger, R., Willems, S., & Huibers, M. (2017). Preanalytical blood sample workup for cell-free DNA analysis using droplet digital PCR for future molecular cancer diagnostics. *Cancer Med.* 2017; 6 (10): 2297–307.
- Veldman-Jones, M. H., Brant, R., Rooney, C., Geh, C., Emery, H., Harbron, C. G., . . . Barrett, J. C. (2015). Evaluating Robustness and Sensitivity of the NanoString Technologies nCounter Platform to Enable Multiplexed Gene Expression Analysis of Clinical SamplesEvaluation of NanoString Technologies nCounter Platform. *Cancer research*, 75(13), 2587-2593.
- Venetis, K., Cursano, G., Pescia, C., D'Ercole, M., Porta, F. M., Blanco, M. C., . . . Fusco, N. (2023). Liquid biopsy: Cell-free DNA based analysis in breast cancer. *The Journal of Liquid Biopsy*, 100002.
- Vermeesch, J. R., Voet, T., & Devriendt, K. (2016). Prenatal and pre-implantation genetic diagnosis. *Nature Reviews Genetics*, 17(10), 643-656.
- Viglianti, B. L., Wong, K. K., Gross, M. D., & Wale, D. J. (2018). Common pitfalls in oncologic FDG PET/CT imaging. *J Am Osteopath Coll Radiol*, 7(1), 5-17.
- Vinnicombe, S. J., & Reznick, R. H. (2003). Computerised tomography in the staging of Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 30(Suppl 1), S42-S55.
- Vitolo, U., Chiappella, A., Brusamolino, E., Angelucci, E., Rossi, G., Carella, A. M., . . . Merli, F. (2012). Rituximab dose-dense chemotherapy followed by intensified high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation (HDC+ ASCT) significantly reduces the risk of progression compared to standard rituximab dose-dense chemotherapy as first line treatment in young patients

- with high-risk (aa-IPI 2–3) diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): final results of phase III randomized trial DLCL04 of the Fondazione Italiana Linfomi (FIL): Am Soc Hematology.
- Vodicka, P., Klener, P., & Trneny, M. (2022). Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Early Patient Management and Emerging Treatment Options. *OncoTargets and Therapy*, 1481-1501.
- Voltin, C.-A., Mettler, J., Grosse, J., Dietlein, M., Baues, C., Schmitz, C., . . . Hellwig, D. (2020). FDG-PET Imaging for Hodgkin and Diffuse large B-cell lymphoma—An updated overview. *Cancers*, 12(3), 601.
- Vriens, D., Visser, E. P., de Geus-Oei, L.-F., & Oyen, W. J. (2010). Methodological considerations in quantification of oncological FDG PET studies. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 37, 1408-1425.
- Wan, J. C., Massie, C., Garcia-Corbacho, J., Mouliere, F., Brenton, J. D., Caldas, C., . . . Rosenfeld, N. (2017). Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature Reviews Cancer*, 17(4), 223-238.
- Wang, H.-Y., Lin, W.-Y., Zhou, C., Yang, Z.-A., Kalpana, S., & Lebowitz, M. S. (2024). Integrating Artificial Intelligence for Advancing Multiple Cancer Early Detection via Serum Biomarkers: A Narrative Review.
- Wang, Q., Gao, J., & Wu, X. (2018). Pseudoprogression and hyperprogression after checkpoint blockade. *International immunopharmacology*, 58, 125-135.
- Wang, W., Zou, D., Zhuang, Z., Zhang, X., Zhang, L., Yin, J., . . . Zhang, Y. (2023). Cell-Free DNA in Cerebrospinal Fluid Complements the Monitoring Value of Interleukin-10 in Newly Diagnosed Primary Central Nervous System Lymphoma. *Journal of Oncology*, 2023.
- Warburg, O. (1930). The metabolism of tumours. *Constable*.
- Weber, J., & Van Zanten, A. (1991). Interferences in current methods for measurements of creatinine. *Clinical Chemistry*, 37(5), 695-700.
- West, H. J., & Jin, J. O. (2015). Performance status in patients with cancer. *Jama Oncology*, 1(7), 998-998.
- WHO-IARC. (2023). World Health Organization-International Agency for Research on Cancer: Cancer today in Syria. Accessed on Feb,2023. Available on: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=760&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0.
- WHO. (2023a). World Health Organization: Cancer key facts. Accessed on Feb,2023. Available on: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- WHO. (2023b). World Health Organization: Country profile generated from the World Health Organization NCD Data Portal (2023). Available on: <https://ncdportal.org/CountryProfile/GHE110/Syrian%20Arab%20Republic#mor1>.
- WHO. (2023c). World Health Organization: Noncommunicable Diseases Data Portal (2023). Accessed on Feb,2023. Available on: <https://ncdportal.org>.
- William, B. M., Bongu, N. R., Bast, M., Bociek, R. G., Bierman, P. J., Vose, J. M., & Armitage, J. O. (2013). The utility of lactate dehydrogenase in the follow up of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 35(3), 189-191.
- Witzig, T., Vose, J. M., Zinzani, P. L., Reeder, C., Buckstein, R., Polikoff, J., . . . Guo, P. (2011). An international phase II trial of single-agent lenalidomide for relapsed or refractory aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Annals of oncology*, 22(7), 1622-1627.
- Wolchok, J. D., Hoos, A., O'Day, S., Weber, J. S., Hamid, O., Lebbé, C., . . . Nichol, G. (2009). Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clinical cancer research*, 15(23), 7412-7420.
- Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British journal of haematology*, 13(3), 269-288.
- Wu, F.-T., Lu, L., Xu, W., & Li, J.-Y. (2019). Circulating tumor DNA: clinical roles in diffuse large B cell lymphoma. *Annals of hematology*, 98, 255-269.
- Wu, J., Tang, W., Huang, L., Hou, N., Wu, J., Cheng, X., . . . Guo, W. (2019). The analysis of cell-free DNA concentrations and integrity in serum of initial and treated of lymphoma patients. *Clinical biochemistry*, 63, 59-65.
- Wu, L., Wang, T., Gui, W., Lin, H., Xie, K., Wang, H., . . . Han, T. (2014). Prognostic significance of serum beta-2 microglobulin in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Oncology*, 87(1), 40-47.

- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284(5756), 555-556.
- Xie, F., Li, P., Gong, J., Tan, H., & Ma, J. (2018). Urinary cell-free DNA as a prognostic marker for KRAS-positive advanced-stage NSCLC. *Clinical and Translational Oncology*, 20, 591-598.
- Xu, J., Chen, H., Fan, W., Qiu, M., & Feng, J. (2024). Plasma cell-free DNA as a sensitive biomarker for multi-cancer detection and immunotherapy outcomes prediction. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 150(1), 7. doi:10.1007/s00432-023-05521-4
- Yadav, C., Ahmad, A., D'Souza, B., Agarwal, A., Nandini, M., Prabhu, K. A., & D'Souza, V. (2016). Serum lactate dehydrogenase in non-Hodgkin's lymphoma: A prognostic indicator. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 31(2), 240-242.
- Yipp, B. G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C. N., Scott, B. N., Zbytnuik, L. D., . . . Meijndert, H. C. (2012). Dynamic NETosis is carried out by live neutrophils in human and mouse bacterial abscesses and during severe gram-positive infection. *Nature medicine*, 18(9), 1386.
- Yoo, K. H. (2022). Staging and response assessment of lymphoma: a brief review of the Lugano classification and the role of FDG-PET/CT. *Blood research*, 57(S1), 75-78.
- Younes, A., Hilden, P., Coiffier, B., Hagenbeek, A., Salles, G., Wilson, W., . . . Pfreunschuh, M. (2017). International Working Group consensus response evaluation criteria in lymphoma (RECIL 2017). *Annals of oncology*, 28(7), 1436-1447.
- Yu, W., Hurley, J., Roberts, D., Chakraborty, S., Enderle, D., Noerholm, M., . . . Skog, J. (2021). Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges. *Annals of oncology*, 32(4), 466-477.
- Zanoni, L., Bezzi, D., Nanni, C., Paccagnella, A., Farina, A., Broccoli, A., . . . Fanti, S. (2022). *PET/CT in Non-Hodgkin Lymphoma: An Update*. Paper presented at the Seminars in Nuclear Medicine.
- Zanoni, L., Mattana, F., Calabrò, D., Paccagnella, A., Broccoli, A., Nanni, C., & Fanti, S. (2021). Overview and recent advances in PET/CT imaging in lymphoma and multiple myeloma. *European Journal of Radiology*, 141, 109793.
- Zeman, M. N., Akin, E. A., Merryman, R. W., & Jacene, H. A. (2022). *Interim FDG-PET/CT for Response Assessment of Lymphoma*. Paper presented at the Seminars in Nuclear Medicine.
- Zhang, X., Jiang, H., Wu, S., Wang, J., Zhou, R., He, X., . . . Civelek, A. C. (2022). Positron Emission Tomography Molecular Imaging for Phenotyping and Management of Lymphoma. *Phenomics*, 2(2), 102-118.
- Zhou, Z., Sehn, L. H., Rademaker, A. W., Gordon, L. I., LaCasce, A. S., Crosby-Thompson, A., . . . Rodriguez, M. A. (2014). An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*, 123(6), 837-842.
- Zill, O. A., Banks, K. C., Fairclough, S. R., Mortimer, S. A., Vowles, J. V., Mokhtari, R., . . . Nagy, R. J. (2018). The landscape of actionable genomic alterations in cell-free circulating tumor DNA from 21,807 advanced cancer patients. *Clinical cancer research*, 24(15), 3528-3538.
- Zinzani, P. L., Stefoni, V., Tani, M., Fanti, S., Musuraca, G., Castellucci, P., . . . Pellegrini, C. (2009). Role of [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography scan in the follow-up of lymphoma. *J Clin Oncol*, 27(11), 1781-1787.

الملاحق

الملحق (1): أسباب وآليات إطلاق cfDNA في الدوران (Aucamp et al., 2018)

ملخص شامل للسّمات البيولوجية المفترضة والآليات التي تعمل من خلالها كمصادر للدنا الحر الجوال cfDNA أو أسباب لإطلاقه من الخلايا الحية أو الميتة.

السمة البيولوجية	الآليات المشاركة في إطلاق cfDNA	العدّة	المصدر	المرحلة
النّخر	إزالة الخلايا الميتة عن طريق البالعات	✓	✓	
	إصابة	✓		
	رض	✓	✓	
	إصابة الأنسجة المزروعة و/أو رفضها	✓		
	الجراحة	✓		
	التدخلات الجراحية على مرضى الرضوض	✓	✓	
	الإجراءات الجراحية لزرع الأعضاء	✓		
الاستماتة	عندما تُقَلَّت خلايا الاستماتة من البلعمة	✓	✓	
	عندما تخضع خلايا الاستماتة للبلعمة	✓		
	أجسام الاستماتة	✓	✓	
محنة الانقسام الفتيلي	موت الخلية عن طريق الاستماتة الخلوية	✓		
	الخلايا رباعية الصيغة الصبغية (إذا نجت الخلايا من الاستماتة)	✓	✓	
	موت الخلية عن طريق النخر	✓		
	موت الخلايا بشكل مستقل عن الاستماتة الخلوية والنخر	✓	✓	
	النوى الصغيرة (إذا نجت النوى الصغيرة من البلعمة الذاتية)	✓	✓	
البلعمة الذاتية	بُقيَا الخلية / الورم (انظر السرطان)	✓		
	إزالة تعدد الصيغة الصبغية	✓	✓	
	التصفية بالبلعمة الذاتية للنوى الصغيرة من محنة الانقسام الفتيلي	✓	✓	
	التصفية بالبلعمة الذاتية للمتقدّرات	✓	✓	
	الموت الخلوي الناتج	✓	✓	
	نشاط طليعة الورم	✓		
	حماية الورم	✓	✓	
الحويصلات	تعزيز نمو الورم في الخلايا السليمة	✓	✓	
	تعزيز أذية الدنا في الخلايا السليمة	✓	✓	
	الجسيمات الإيماسية والحويصلات الدقيقة، مع استثناء أجسام الاستماتة	✓	✓	

ملخص شامل للسّمات البيولوجية المفترضة والآليات التي تعمل من خلالها كمصادر للدنا الحر الجوال cfDNA أو أسباب لإطلاقه من الخلايا الحية أو الميتة.

السمية البيولوجية	الآليات المشاركة في إطلاق cfDNA	المرحلة الأولى	المرحلة الثانية	المرحلة الثالثة
الاستماتة الحموية pyroptosis	تدرك الدنا النووي	✓	✓	
	تبقى المتقدرات سليمة - إزالة بالبلعمة الذاتية	✓	✓	
	الاستماتة الحموية المُحرّضة بالالتهاب	✓	✓	
	قصور العضو	✓	✓	
الإطلاق الفاعل للدنا	(جسيمات التحول، دنا استقلابي، معقدات الدنا والبروتين)			
	من الخلايا الداخلية أو من خلايا أو كائنات خارجية	✓	✓	
	الاستماتة الخلوية	✓	✓	
نزع نوى أرومات الكريات الحمر	التصفية بالبلعمة الذاتية لـ:			
	أرومات الكريات الحمر منزوعة النواة Pyrenocytes	✓	✓	
	متقدرات أرومات الكريات الحمر	✓	✓	
	الإزالة البلعية لحويصلات أرومات الكريات الحمر بواسطة البالعات	✓	✓	
	النجاة من الإزالة البلعية	✓	✓	
المتقدرات	يؤدي موت / إصابة الخلية إلى تدمير / إطلاق المتقدرات			
	نجاة المتقدرات و/أو الدنا المتقدي من البلعمة الذاتية	✓	✓	
	خضوع المتقدرات و/أو الدنا المتقدي للبلعمة الذاتية	✓	✓	
	موت الخلايا المُحرّض بالدنا المتقدي	✓	✓	
	التهاب	✓	✓	
	الصفائح	✓	✓	
	الالتهاب الناجم عن الدنا المتقدي		✓	
	التشخيص	✓	✓	✓
	التمارين	✓	✓	✓
	السرطان	✓	✓	✓
	تكوين مصيدة العدلات خارج الخلوية	✓	✓	✓
	تعمير الخلية وموتها	✓		
التشخيص	الالتهاب	✓		
	المتقدرات			
	< 50 سنة: أسباب الالتهاب، وهو مُحَرّض بالدنا المتقدي	✓		
	~ 90 سنة: يصبح نفاذ المتقدرات واضحاً	✓		
	نقص آليات التصفية، بما في ذلك البلعمة	✓		
	يحدث خلل في تشكيل الخلايا الجذعية المكونة للدم	✓	✓	✓
	يؤدي فقدان الجسيم الطرفي إلى التنسخ الداخلي endoreplication	✓	✓	

ملخص شامل للسّمات البيولوجية المفترضة والآليات التي تعمل من خلالها كمصادر للدنا الحر الجوال cfDNA أو أسباب لإطلاقه من الخلايا الحية أو الميتة.

السمّة البيولوجية	الآليات المشاركة في إطلاق cfDNA	١	٢	٣	٤
مصادر خارجية	العداوى (البكتيريا والفيروسات)	✓	✓	✓	
	الدنا البكتيري / الفيروسى من العدوى	✓			
	شُدْف الدنا المشتقة من الالتهاب بسبب التفاعل المناعي	✓			
	الاحتشار (عدوى الطفيليات)				
	لعاب و/أو مفرزات و/أو إطراحات الطفيليات البرانية Ectoparasite	✓	✓	✓	
	عدوى مناطق الإطعام	✓	✓	✓	
	لعاب و/أو مفرزات و/أو إطراحات الطفيليات الداخلية Endoparasite	✓	✓	✓	
	الابتلاع				
	رواسب و/أو حياة نباتية وحيوانية و/أو تلوث/نفايات في مياه الشرب	✓	✓	✓	
	تعرض الفاكهة والخضراوات للتربة و/أو الفطريات و/أو الكائنات المتحللة و/أو مصادر المياه و/أو التلوث و/أو الملوثات/النفايات	✓	✓	✓	
	تعرض الحيوانات والمنتجات الحيوانية إلى الدنا من مصادر الغذاء والمياه قبل معالجتها للاستهلاك البشري				
	الاستنشاق (الطلع، الغبار، بكتيريا / فيروسات المنقولة بالهواء، الأبخرة)	✓	✓	✓	
	الجروح				
	الجسم الذي تسبب في الجرح (مثل الشوكة)	✓	✓	✓	
	تلوث الجسم المسبب للجرح	✓	✓	✓	
	لدغات أو لسعات الحشرات التي تسبب تفاعلات التهابية / مناعية	✓	✓	✓	
	الاحتشار الطفيلي للجرح أو العضة أو اللدغة	✓	✓	✓	
	عدوى الجرح أو العضة أو اللدغة				
	الزرع ونقل الدم	✓	✓	✓	
	تطلق الطعوم الناجحة الدنا المشتق من المتبرع في دوران المضيف	✓		✓	
	مضاعفات أو رفض (تترك الأنسجة وإطلاق دنا المتبرع في الدوران)	✓	✓		
	أذية الطعم تُطلق الدنا المتقدي للمتبرع في دوران المضيف	✓	✓		
	مضاعفات/أذية /رفض [إطلاق دنا المضيف في الدوران (مناعي)]	✓	✓		
	الهضم الذاتي للعوامل الممرضة في أثناء العدوى	✓	✓		
	الاستماتة الحُمويّة الناجمة عن العدوى	✓	✓		
الخلايا المولدة للدم	موت الخلية أو أذيتها	✓	✓		
	خلايا سوية وظيفية	✓		✓	
	الحمل	✓	✓	✓	✓
	التمارين	✓	✓	✓	✓

ملخص شامل للسّمات البيولوجية المفترضة والآليات التي تعمل من خلالها كمصادر للدنا الحر الجوال cfDNA أو أسباب لإطلاقه من الخلايا الحية أو الميتة.

السمة البيولوجية	الآليات المشاركة في إطلاق cfDNA	الإنزيمات	الخلايا	الأنسجة	الدم
تشكيل المصائد خارج الخلية	من الخلايا المكونة للدم (الإيوزينيات والقاعديات والعدلات والبالعات)	✓	✓	✓	✓
	تأثيرات طليعة ورمية	✓	✓	✓	✓
	تأثيرات مضادة للورم	✓	✓	✓	✓
	الدنا المتقدي	✓	✓	✓	✓
	تشكيل مصيدة العدلات خارج الخلية الحوية	✓	✓	✓	✓
الإنتان	الحمضات	✓	✓	✓	✓
	الدنا الخارجي (من العدوى - تبين أنه غير مرجح)	✓	✓	✓	✓
	مصائد العدلات خارج الخلية وتشكيلها	✓	✓	✓	✓
	النَّخر / الاستماتة الخلوية / الاستماتة الحُمويّة	✓	✓	✓	✓
	الاستجابات الالتهابية التي يسببها النخر	✓	✓	✓	✓
الالتهاب	الاستجابات الالتهابية التي تسببها الاستماتة الخلوية	✓	✓	✓	✓
	تشكيل مصيدة العدلات خارج الخلية	✓	✓	✓	✓
	تتكس النسيج الدهني - التهاب مزمن منخفض الدرجة	✓	✓	✓	✓
	السرطان والأمراض الالتهابية (تصبح عمليات البلعمة مُثقلة)	✓	✓	✓	✓
	الاستماتة الخلوية / النَّخر / الاستماتة الحُمويّة	✓	✓	✓	✓
إنزيمات النوكلياز (الدناز)	استماتة أرومات الكريات الحمر منزوعة النواة	✓	✓	✓	✓
	الاستماتة النَّخرية	✓	✓	✓	✓
	إطلاق طلائع التهابية (ومنها الجُسيمات النووية ومعقدات الكروماتين)	✓	✓	✓	✓
	مقاومة العوامل الممرضة لمصيدة العدلات خارج الخلية	✓	✓	✓	✓
	الدنا الداخلي (من المصائد ومصادر الدنا القريبة)	✓	✓	✓	✓
الكرب الأكسدي	الدنا الخارجي (من العوامل الممرضة)	✓	✓	✓	✓
	منخراط في أمراض مختلفة، بما في ذلك:	✓	✓	✓	✓
	الإنتان / السرطان / التشيخ	✓	✓	✓	✓
	تشكيل مصيدة العدلات خارج الخلية	✓	✓	✓	✓
	إطلاق الدنا السوي والمؤكسد ودنا المتقدرات عبر:	✓	✓	✓	✓
الكرب الأكسدي	النَّخر / الاستماتة الخلوية	✓	✓	✓	✓
	تشكيل مصيدة العدلات خارج الخلية	✓	✓	✓	✓
	يؤدي الإجهاد التأكسدي في المتقدرات إلى:	✓	✓	✓	✓
	تفعيل شلال الكاسباز الذي يقود إلى الاستماتة الخلوية	✓	✓	✓	✓
	تشكيل مصيدة العدلات خارج الخلية	✓	✓	✓	✓
الالتهاب	الالتهاب	✓	✓	✓	✓

ملخص شامل للسّمات البيولوجية المفترضة والآليات التي تعمل من خلالها كمصادر للدنا الحر الجوال cfDNA أو أسباب لإطلاقه من الخلايا الحية أو الميتة.

السمية البيولوجية	الآليات المشاركة في إطلاق cfDNA	العدلات خارج الخلية	العدلات داخل الخلية	العدلات الحرة
تأثير غير مباشر	الكرب الأكسدي / الاستماتة الخلوية	✓	✓	✓
	الاستجابة التكيفية	✓		✓
	إطلاق الدنا الفاعل من الأم والجنين	✓	✓	
	من الجنين			
	الخلايا المكونة للدم	✓	✓	✓
الحمل	إعادة التنسخ مما يؤدي إلى إنتاج شدف قصيرة من الدنا	✓	✓	✓
	الأرومة الغازية المشيمية			
	النقل الفاعل للدنا عبر المشيمة / الأغشية	✓	✓	
	الاستماتة الخلوية / الالتهاب (الانسمام الحلمي، المخاض الباكر)	✓	✓	
التمارين	الرياضة الحادة دون مجهود مفرط			
	تفاعل مناعي (تكوين مصيدة العدلات خارج الخلية)	✓	✓	✓
	آليات إطلاق الدنا الفاعل (مثل الحويصلات)	✓	✓	
	التمارين الشاقة المزمنة أو المؤذية			
	الاستماتة الخلوية / النخر	✓	✓	
	آليات إطلاق الدنا الفاعل	✓	✓	
الوظائف العصبية		✓	✓	✓
	من الخلايا الورمية			
	موت الخلايا بسبب زيادة عبء الورم	✓	✓	
	إطلاق الدنا الفاعل	✓	✓	
	تكوين مصائد العدلات خارج الخلية لتعزيز تطور الورم أو منعه	✓	✓	✓
	إعادة التنسخ مما يؤدي إلى إنتاج شدف قصيرة من الدنا	✓	✓	✓
	من الخلايا المحيطة بالورم			
	موت الخلايا بسبب زيادة عبء الورم	✓	✓	
	تكوين مصائد العدلات خارج الخلية استجابة لتطور الورم	✓	✓	✓
السرطان	الالتهاب	✓	✓	
	موت الخلايا بسبب العلاج (مثل الاستماتة الخلوية، الاستماتة الحُمويّة)	✓	✓	
	الشيخوخة			
	تشكيل تعدد الصيغة الصبغية عند الهروب من التشخيص	✓	✓	
	تعزيز نشوء الورم عن طريق التشخيص	✓	✓	
	المتقدرات			
	موت الخلية	✓		
	تكوين مصيدة العدلات خارج الخلية	✓	✓	
	التهاب	✓		

ملخص شامل للسمات البيولوجية المفترضة والآليات التي تعمل من خلالها كمصادر للدنا الحر الجوال cfDNA أو أسباب لإطلاقه من الخلايا الحية أو الميتة.

السمات البيولوجية	الآليات المشاركة في إطلاق cfDNA	الآلية	الآلية	الآلية
تضخيم الجينات	إطلاق فاعل لشدة المورثات المتضخمة	✓	✓	
	إطلاق شدة المورثات المتضخمة من خلال موت الخلية / أذيتها	✓		
	الشدة الدقيقة المضاعفة	✓	✓	
	تكون الأورام	✓	✓	✓
	زيادة الاستعداد للإصابة بالمرض	✓	✓	
إعادة تنسخ الدنا	يحدث على عدم الاستقرار المورثي فيؤدي لتكون الأورام (انظر السرطان)	✓		
	يستحث الاستماتة الخلوية	✓		
	تشكيل شدة قصيرة من الدنا في أثناء تنسخه	✓	✓	✓
	تشكيل شدة قصيرة من الدنا في أثناء انتساخه	✓		✓
تنسخ الدنا الداخلي	تعدد الصيغة الصبغية			
	لتفادي الاستماتة الخلوية ومحنة الانقسام الفتيلي	✓	✓	
	تكون الأورام بسبب عدم الاستقرار الصبغي	✓	✓	✓
	إزالة تعدد الصيغة الصبغية	✓	✓	
	دورات الانقسام الفتيلي المعرضة للخطأ تؤدي إلى محنة الانقسام الفتيلي	✓		
	التنسخ الداخلي الناجم عن تقصير الجسيم الطرفي			
	الاستماتة الخلوية	✓		
	التشخيص	✓	✓	✓

الملحق (2): الموافقة المستنيرة على المشاركة بالبحث

أنا الطيبية ريم فيصل أبازيد، طالبة الدكتوراه في اختصاص الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية في كلية الطب البشري - جامعة دمشق، أقوم بإجراء بحث بعنوان:

"دراسة مستويات الدنا الحر الجوال البلازمي cfDNA عند عينة من السوريين المصابين بلمفوما الخلية البائية الكبيرة المنتشرة: مقارنتها بالأصحاء وتبدلاتها عند التقييم المرحلي للعلاج"

ويهدف إلى مقارنة مستويات cfDNA بين مجموعة من الأصحاء وعينة من مرضى DLBCL السوريين، ودراسة علاقة هذه المستويات عند المرضى بمرحلة الورم ومحددات إنذاره، ومتابعة تبدلاتها مع تطبيق المعالجة؛ ودراسة علاقة هذه التبدلات مع تبدلات الإجراءات التصويرية الشعاعية (CT أو PET) المتوافرة في حال وجودها. وكل ذلك بغية استكشاف إمكانية اعتبار معايرة cfDNA في الدوران كطريقة مراقبة روتينية غير مكلفة عند مرضى DLBCL، بديلة أو متممة للإجراءات المعتمدة حالياً.

ستتم في هذا البحث دراسة الحالة والحصول على عينة دم وريدي لإجراء الاختبارات المخبرية بما فيها قياس cfDNA لكل من الأصحاء وللمرضى قبل البدء بالعلاج، ومقارنة مستوياته بينهما، ودراسة علاقته عند المرضى مع كل من مرحلة الورم وإنذاره. بعد ذلك سيتم إجراء التقييم المرحلي للمرضى فقط، ويتضمن قياس الدنا الحر الجوال البلازمي cfDNA عند المرضى بعد 3 أشواط من المعالجة ومقارنته بالقيم البدئية عند التشخيص.

إن موافقتكم على الاشتراك في هذا البحث تعني تزويدنا بالمعلومات المتعلقة بمرضكم لملء استبانة خاصة بالبحث، علماً أن هذه المعلومات ضرورية لمتابعة حالتكم الصحية، وأود أن أؤكد أن هذه المعلومات ستبقى سرية ولا يمكن لأحد الإطلاع عليها، كما سيتم ترميز المشاركين والمشاركات (إعطائهم أرقاماً دون ذكر أسماء). وكذلك أتعهد بعدم إجراء أي استقصاء غير ضروري لحالة المريض وعدم إعطاء أي دواء تجريبي أو أي تدخل دوائي أو استقصائي من شأنه أن يؤذي المريض بقصد أو بغير قصد.

أحيطكم علماً بأنه لا توجد أية مخاطر غير اعتيادية يمكن أن تنجم عن مشاركتكم في هذه الدراسة، وأن مشاركتكم ربما تسهم في المستقبل في تحسين إمكانية تدبير الحالة التي تعانون منها وتحسين رعايتها الصحية.

كما أود أن أشير إلى أن المشارك (المريض/الشاهد) لن يحصل على أية تعويضات أو مقابل مادي، كما أن رفضه المشاركة ليس له أية تبعات، ولن يتأثر حقه بالرعاية الطبية اللازمة، وعليه فالمشاركة ليست إلزامية ولك الحرية الكاملة في اختيار المشاركة من عدمها ولك حق الانسحاب متى شئت.

الموافقة في المشاركة:

لقد اطلعت وأدركت محتوى الموافقة المستنيرة وأوافق طوعاً على أن أكون مشاركاً في هذا البحث وأدرك أنني أملك فرصة الاستفسار عن أي أمر مع ضرورة الإجابة كما وأملك الحق في الانسحاب في أي وقت أشاء ودون أن يعرضني ذلك لأي ضرر.

التاريخ / /

الملحق (3): استبانة المعلومات

اسم المريض:

سنة

رقم الهاتف:

القياسات المخبرية العامة:

عند التشخيص:	الكرياتينين (ملغ/دل)		حمض البول (ملغ/دل)	
	LDH (IU/L)		نسبة LDH	
بعد الشوط الثالث:	الكرياتينين (ملغ/دل)		حمض البول (ملغ/دل)	
	LDH (IU/L)		نسبة LDH	

خصائص الورم:

مرحلة الورم

R-CHOP	IV	III	II	I
--------	----	-----	----	---

الإنذار وفق NCCN-IPI

	الاختطار	الحرز
عند التشخيص:		حجم أكبر عقدة (كتلة) (مم):
بعد الشوط الثالث:		

تركيز cfDNA (نغ/مكل):

النانودروب	تقانة qPCR	
		قبل العلاج
		التقييم المرحلي

Plasma Cell-Free DNA (cfDNA) as a Non-Invasive Biomarker in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL)



Reem F. Abazid¹, Dr. Seham M. Sulaiman², Dr. Youssef A. Barakat¹

¹ Department of laboratory medicine, Faculty of Medicine, Damascus University.

² Professor, Department of Oncology, Faculty of Medicine, Damascus University, AlBairouni University Hospital.



Background

DLBCL is among the most prevalent lymphomas, significantly burdening patients, communities, and healthcare systems. Routine management of these tumors involves procedures like tissue biopsies, Computed Tomography, and Positron Emission Tomography scans, which are invasive, expensive, and radiation-heavy. Also, these procedures are not always available in low-resource settings and have different disadvantages and limitations. These prompted the exploration of simpler tests, such as plasma cfDNA.

The term cfDNA describes any DNA existing in the extracellular environment. It is released from cells into the circulation in both physiological and pathological conditions by passive and active mechanisms. Many studies showed its elevation in pathological conditions such as sepsis, cancer, & acute myocardial infarction.

Taken together, with the easy repeatedly obtaining of cfDNA by minimally invasive procedures, have indicated the tremendous potential for cfDNA as a non-invasive biomarker for the screening & management of DLBCL.

Objectives

To compare cfDNA levels between DLBCL patients & controls, to study the correlations of these levels with tumor stage and prognostic determinants, and to evaluate cfDNA alteration after 3 cycles of treatment.

Material & Methods

The study included 64 newly-diagnosed DLBCL patients and 28 apparently healthy controls. In addition, 41 patients were followed-up to evaluate treatment response after 3 cycles of chemotherapy.

Tumor stage, prognosis determinants, uric acid, creatinine, LDH, LDH ratio, and cfDNA were evaluated at diagnosis (baseline) and after 3 cycles of chemotherapy.

Using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), cfDNA was extracted from blood samples taken from controls and from DLBCL patients (at diagnosis from all participants and before the 4th cycle of chemotherapy from 41 DLBCL patients). Extracted cfDNA was measured by real-time qPCR using Sybrmaster mix (Jena Bioscience GmbH, Löbstedter, Jena, Germany) with two primers flanking beta globin gene (Alpha DNA, Montreal, Canada).

Bibliography

- NCCN. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines: B-Cell Lymphomas v3.2023.
- Ponti G, Maccaferri M, Manfredini M, Kaleci S, Mandrioli M, Pellacani G, et al. The value of fluorimetry (Qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification of cell-free DNA (cfDNA) in malignant melanoma and prostate cancer patients. *Clinica Chimica Acta*. 2018;479:14-9.
- Arzuaga-Mendez J, Prieto-Fernández E, Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Garcia-Ruiz JC, Garcia-Orad A. Cell-free DNA as a biomarker in diffuse large B-cell lymphoma: a systematic review. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2019;139:7-15.
- Pessoa LS, Herlinger M, Ferrer VP. cfDNA as a cancer biomarker: A broad overview. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2020;155:103109.
- Pons-Belda OD, Fernandez-Urriarte A, Diamandis EP. Can circulating tumor DNA support a successful screening test for early cancer detection? *The Grail paradigm. Diagnostics*. 2021;11(12):2171.

Results

At diagnosis (baseline), cfDNA levels (ng/ml) was significantly ($P<0.0001$) higher in DLBCL patients (12.71 ± 7.20) compared to controls (7.07 ± 3.76). These levels were significantly correlated with baseline levels of LDH, LDH ratio, and size of the largest tumor mass but not with performance status [according to Zubrod / Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) scale]; tumor stage (using the Ann Arbor or Lugano classification); prognosis [based on NCCN-International Prognosis Index (NCCN-IPI) scores]; the presence of bulky disease (lymph nodes larger than 7.5 cm); or differences in sex and age.

At follow-up, cfDNA levels decreased significantly after 3 cycles of chemotherapy (from 12.33 ± 6.74 to 3.19 ± 1.99). These levels were correlated with the significant reduction in tumor size. In contrast, neither HDL, nor HDL ratio changes after treatment was significant or correlated with mass size change after 3 cycles of chemotherapy.

Discussion

Current study showed the importance of cfDNA as a non-invasive biomarker in the course of DLBCL. It appears as an important diagnostic and predictive biomarker. Both odd ratio (1.2; $P=0.007$) and area under the curve were comparable to, if not better than, those related to LDH.

The current results also showed the importance of cfDNA in the monitoring of DLBCL treatment response, which is the most important use of this biomarker till now.

Fig. 1. Comparison of cfDNA Concentration between control and DLBCL groups.

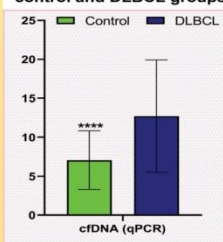


Fig. 2. CfDNA Correlations with mass size (A) & LDH (B) in DLBCL groups.

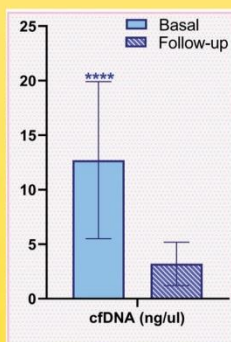
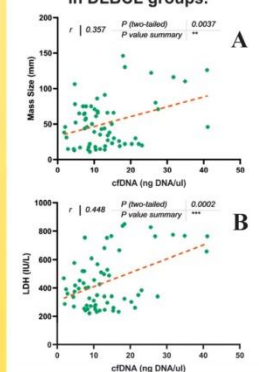


Fig. 3. Comparison of cfDNA Concentration between baseline and 4th cycle of chemotherapy.

Abstract

Background: Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is one of the most common forms of lymphoma, imposing a significant economic and social burden on patients, their surroundings, society, and the country. The management of these tumors is long, exhausting, and costly, involving numerous techniques (histological, laboratory, radiological, and surgical) aimed at detection, diagnosis, staging, prognosis, treatment, response evaluation, and relapse detection. These methods include tissue biopsies (surgical excisional or needle), computed tomography (CT), and positron emission tomography (PET) scans, which are invasive, often expensive, expose the body to high radiation doses, and may not be available in resource-limited healthcare settings. Despite the high sensitivity of PET technology, it lacks specificity for tumors and produces many false-negative or false-positive results, potentially leading to unnecessary and costly chemical and invasive treatments. This has driven the search for more accessible tests, such as measuring the amount of free DNA present in body fluids like blood plasma [circulating cell-free DNA (cfDNA)].

Objective: This study aimed to (a) compare cfDNA levels between a group of apparently healthy individuals and a group of Syrian DLBCL patients, (b) study the relationship of these levels with tumor stage and prognostic factors in patients, (c) track changes in these levels with treatment application, (d) study the relationship of these changes with changes in radiological imaging (CT or PET) if present. The ultimate goal is to explore the potential contribution of quantitative cfDNA calibration in the various stages of DLBCL investigation as a routine, non-invasive, and cost-effective method, either as an alternative or complement to currently adopted procedures.

Methods: The study included 92 Syrian individuals: 28 apparently healthy controls and 64 newly diagnosed DLBCL patients. Anthropometric data (age, gender, performance status), radiological data (number and distribution of nodes, size of the largest mass), and histological diagnosis (diagnostic biopsy) were obtained. Laboratory measurements included creatinine, uric acid, and the tumor marker lactate dehydrogenase (LDH) were performed, along with the calculation of the LDH ratio. Plasma cfDNA was quantified in patients and healthy individuals using two methods: NanoDrop technology and real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) using SYBR Green dye. Additionally, previous tests were repeated in patients only (41 patients) during routine follow-up (after three cycles of chemotherapy).

Statistical analysis was performed using SPSS version 22, with a p-value of less than 0.05, which is considered statistically significant.

Results:

At diagnosis: DLBCL was associated with elevated cfDNA levels compared to healthy individuals, with statistically significant increases using both measurement methods (NanoDrop or qPCR), whose results were also statistically significantly correlated. This elevation (with both measurement methods) was statistically significantly correlated with the size of the largest tumor mass at diagnosis and LDH and its ratio. In contrast, cfDNA values did not significantly vary with performance status (according to Zubrod/Eastern Cooperative Oncology Group–ECOG–scale), tumor stage (using the Ann Arbor or Lugano classification), prognosis (based on NCCN–International Prognosis Index–NCCN–IPI–scores), presence of bulky disease (lymph nodes 7.5 cm or larger), gender, or age.

At follow-up: cfDNA levels significantly decreased after three cycles of treatment in the monitored patients (41 patients) without a statistically significant decrease in LDH levels and its ratio. The change in cfDNA levels or any of these markers did not correlate with the percentage of treatment response (measured by the reduction in the size of the largest mass). The only statistically significant correlation at follow-up was between cfDNA values (measured by both techniques) and the percentage reduction in the size of the largest mass.

Conclusion:

These results can lay the foundation for using cfDNA assays as an alternative or complement to invasive and costly radiological and histological procedures in the management of DLBCL related to tumor presence and treatment efficacy monitoring. cfDNA measured by NanoDrop technology can be used for the same purpose in resource-limited settings. Further longitudinal studies may reveal the role of this calibration as an alternative to several of these invasive procedures in different management stages.

Keywords:

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), circulating plasma cell-free DNA (cfDNA), DLBCL treatment monitoring, lactate dehydrogenase (LDH).

Syrian Arab Republic
Damascus university
Faculty of Medicine
Department of Laboratory
Medicine



**A Study of Circulating-Free Plasma DNA (cfDNA) Levels in a
Syrian Sample of Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL):
Comparison with Healthy Controls and Changes at Interim
Monitoring of Therapy**

**A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the
degree of Ph.D. in Medical Biochemistry and Molecular Biology**

By
Reem Abazid
MD; Higher Studies in Laboratory Medicine

Supervisors

Dr. Youssef Barakat
Assoc. Prof., Medical Biochemistry
Faculty of Medicine
Damascus University

Prof. Dr. Seham Sulaiman
Professor, Department of Oncology
Faculty of Medicine
Damascus University

2024