

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Myší modely lidských lymfomů pro experimentální imunoterapeutické postupy

MUDr. Radek Jakša

Praha, 2022

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc.

Školící pracoviště: Ústav patologické fyziologie, 1. LF UK

Školitel: prof. MUDr. Pavel Klener, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně 5 pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty UK.

Obsah

Obsah.....	3
Abstrakt	4
Abstract	5
Úvod.....	6
Cíle a hypotézy.....	9
Metody	10
Výsledky.....	12
Diskuse	14
Shrnutí	17
Reference.....	18

Abstrakt

Nehodgkinské lymfomy (NHL) představují nejčastější hematologická onemocnění. Od pacientů odvozené zvířecí modely (patient-derived xenografts, PDX) jsou široce využívány v rámci translačního výzkumu včetně preklinického in vivo testování experimentálních léčebných postupů. Zatímco bylo opakovaně prokázáno, že si PDX modely zachovávají většinu somatických mutací jako primární lymfomy, ze kterých byly odvozeny, složení nádorového mikroprostředí (tumor microenvironment, TME) dosud nebylo obsáhle studováno. Odvodili jsme 15 PDX modelů od pacientů s různými typy nehodgkinských lymfomů a provedli jsme jejich zevrubnou genetickou a imunohistochemickou analýzu v přímém srovnání s primárními lymfomovými buňkami, ze kterých byly PDX modely odvozeny. Jednoznačně jsme prokázali, že většina PDX modelů sdílí klíčové genetické mutace (tzv. driver mutace) s primárními lymfomovými buňkami. Z genetického hlediska tudíž PDX modely představují relevantní nástroj pro studium biologie lymfomů. Imunohistochemická analýza vybraných znaků prokázala mírné odchylky v imunofenotypu lymfomových buněk ve srovnání s primárními lymfomovými buňkami, ze kterých byly PDX modely odvozeny. Imunohistochemická analýza zaměřená na nádorové mikroprostředí prokázala absenci nenádorových komponent běžně nacházených v lymfomem infiltrované uzlině včetně T-lymfocytů, makrofágů, či NK buněk. PDX tumory vykazovaly signifikantně sníženou vaskularitu složenou výhradně z myších cév. Ačkoli tedy PDX modely představují cenný nástroj preklinického studia agresivních lymfomů, je třeba mít na paměti výrazné odlišnosti mezi PDX tumorem a původní lymfomovou uzlinou, například při testování terapeutických postupů zaměřených na nádorové mikroprostředí (antiangiogenní terapie, různé formy imunoterapie, nanoterapeutika závislá na EPR efektu apod.)

Abstract

Non-Hodgkin lymphomas (NHL) represent the most common hematologic malignancies. Patient-derived xenografts (PDX) are used for various aspects of translational research including preclinical in vivo validation of experimental treatment approaches. While it was repeatedly demonstrated that PDX keep majority of somatic mutations with the primary lymphoma samples, from which they were derived, the composition of PDX tumor microenvironment (TME) has not been extensively studied. We derived 15 PDX models from patients with various subtypes of aggressive lymphomas. We implemented complex genetic and immunohistochemical analysis of the established PDX models head-to-head with the patient's primary lymphoma cells, from which the PDXs were derived. We clearly confirmed that the established PDX cells shared majority of somatic mutations with the patient's primary cells, from which they were derived. Thus, from the genetic perspective the PDX models represent relevant tools for the study of lymphoma biology. Immunohistochemistry analysis of selected antigens revealed some differences between the PDXs and patients' primary cells. Importantly, the analysis demonstrated complete loss of non-malignant cellular components of the tumor microenvironment frequently observed in lymphoma infiltrated lymph nodes, including T-cells, macrophages or NK cells. In addition, the PDX tumors had significantly lower extent of microvessel density and microvessel area composed exclusively of vessels of murine origin. Although PDX models represent relevant tools for translational study of malignant lymphomas, the differences described in our study must be taken into account during experiments that address the tumor microenvironment, e.g. experimental anti-angiogenic treatment approaches, various forms of immunotherapy, or nanotherapeutics that rely on enhanced permeability and retention (EPR) effect.

Úvod

Nehodgkinské lymfomy (non-Hodgkin lymphomas, NHL) představují nejčastější hematologická maligní onemocnění a asi 3 % z celkového spektra nádorových onemocnění (Thandra et al., 2021). Jedná se o širokou a z hlediska morfologie, biologie, terapeutických možností a prognózy značně heterogenní skupinu zahrnující dle současné klasifikace (WHO 2022) několik desítek nosologických jednotek, respektive více než 100 jednotek a podjednotek (Alaggio et al., 2022). Ačkoliv se jedná o v různé míře chemosenzitivní malignity, část pacientů dříve či později prodělá návrat choroby (relaps), vyvine rezistenci na léčbu a onemocnění nakonec podlehne. Současná, již 5. verze WHO klasifikace lymfoidních malignit klade čím dál větší důraz na dělení lymfomů podle molekulárně/cytogenetických aberací.

Vznik lymfomů je spojen s poruchami regulace apoptózy a buněčného cyklu, většinou z důvodu chromozomálních aberací, které způsobí transpozici onkogenů před zesilovače transkripce imunoglobulinových genů [např. translokace t(8;14), t(14;18) či t(11;14) vedoucí ke zvýšené expresi onkogenů *MYC*, *BCL-2*, resp. *cyklin D1*] či v důsledku mutací v širokém spektru signálních drah (např. *MYC*, *MYD88*, *CD79B*). Vedle těchto mechanismů hraje v biologii maligních nádorů včetně lymfomů významnou roli vliv nádorové mikroprostředí ovlivňující přežití nádorových buněk, jejich proliferaci a diseminaci a mechanismy úniku před imunitním dozorem hostitele. Vedle klasických forem léčby (kombinovaná chemoterapie, radioterapie, transplantace krvetvorných buněk), které vedou k frakcionované likvidaci nádorových buněk, se čím dál tím více uplatňují metody cílené léčby a v poslední dekádě zejména různé formy imunoterapie, z nichž mnohé jsou zaměřeny právě na faktory mikroprostředí a které mohou nádor eradikovat totálně. Řada cílených léků a imunoterapeutik se úspěšně včlenila do standardních algoritmů léčby pacientů s lymfomy včetně tyrozin-kinázových inhibitorů (ibrutinib, acalabrutinib, idelalisib, copanlisib), proapoptotických látek (venetoclax), anti-CD20 protilátek (rituximab, ofatumumab, obinutuzumab), bispecifických protilátek (mosunetuzumab, glofitamab, epcoritamab), imunomodulačních léků (lenalidomid), check-point inhibitorů (pembrolizumab, nivolumab) či geneticky modifikovaných T-lymfocytů nesoucích tzv. chimerický antigenní receptor (CAR T-cells, např. tisagenlecleucel, axicabtagene ciloleucel nebo brexucabtagene autoleucel). Řada dalších kandidátních molekul se v současné době testuje v rámci četných klinických studií (<https://clinicaltrials.gov/>). Další zlepšení prognózy relabujících / rezistentních NHL je možné pouze díky zavádění nových, účinnějších a méně toxických léčiv a léčebných postupů (Stadlbauer et al., 2022; Takheaw et al., 2021). V rámci preklinické fáze výzkumu jsou nové kandidátní molekuly obvykle testovány také *in vivo* na zvířatech, nejčastěji na myších modelech.

Myší modely lidských lymfomů

Nejčastěji používané myší modely v hematoonkologii hojně využívané pro preklinickou validaci experimentální léčebných postupů a studium různých aspektů biologie hematologických malignit představují tzv. myší modely lidských lymfomů (tzv. *patient-derived lymphoma xenografts*), které se odvozují pomocí xenotransplantace lidských lymfomových buněk do imunodeficientních myší.

V případě xenotransplantace lidských lymfomových linií (*cell line-derived xenografts*, CDX) či primárních lymfomových buněk (tj. buněk získaných přímo od pacienta, PDX) dochází k engraftmentu, růstu a šíření lidského lymfomu v myším imunodeficientním myším kmeni, např. NSGTM (non-obese diabetic [NOD] severe combined immunodeficient [SCID] gamma, např. NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ, Jax® mice, the Jackson Laboratory, USA, <https://www.jax.org/>). V současné době jsou dostupné desítky komerčně dostupných lymfomových linií v buněčných bankách, např. DSZM (*Deutsche Sammlung von*

Microorganismen und Zellkulturen) nebo ATCC (*American Tissue Culture Collection*). Výhodou využití CDX je jejich vyšší schopnost „přihojení“ (engraftment), relativně nízké náklady, avšak na rozdíl od buněčné populace získané přímo od pacienta mohou v důsledku selekčního tlaku po desítkách, stovkách či tisících *in vitro* pasáží a vlivu mikroprostředí hostitele vyvinout změny fenotypu, které se u primárního nádorového procesu nevyskytovaly. Tato pravděpodobnost se zvyšuje úměrně s dobou, kterou lymfomové linie strávily v buněčné kultuře (Day et al., 2015), získané poznatky pak mohou být zavádějící. Přesto jsou tyto modely (tj. panely lymfomových linií) velmi vhodné především pro iniciační screening účinku a toxicity nových léčiv.

PDX modely pracují s nádorovými buňkami získanými přímo od pacienta s nádorovým onemocněním, a tudíž se předpokládá, že přihojená lymfomová populace bude mít stejné morfologické a genetické vlastnosti. Nevýhodou je skutečnost, že zdaleka ne ve všech případech dojde k úspěšnému přihojení, jedním z možných důvodů je právě absence vhodného mikroprostředí. Dalším z omezujících faktorů je typ nádorového onemocnění (např. nízké maligní lymfomy „engraftují“ hůře než vysoce maligní), způsob implantace nádorových buněk a jiné. Podobně jako v případě pasážování lymfomových linií, také sériový „re-engraftment“ (tj. „pasáž“ již úspěšně „engraftovaného“ PDX modelu z dárcovské myši do sekundárního zvířete může vyústit v selekční tlak s následným posunem genotypu (vznik nových mutací, ztráta driver mutací) či imunofenotypu nádorových buněk (změna exprese či intenzity exprese klíčových antigenů). Jak CDX, tak PDX tumory jsou tvořeny z části také nenádorovými komponentami myšního mikroprostředí (*tumor microenvironment*, TME), což kromě možného vlivu na úspěšnost „přihojení“ a na celkový fenotyp úspěšně engraftovaných buněk omezuje možnosti studia účinku léčiv cílících primárně na imunitní buňky (tj. většiny imunoterapeutických léčebných postupů). Modely tohoto typu jsou nicméně vhodné například pro testování chemoterapeutik a cílených léčiv (např. tyrozin-kinázových inhibitorů či proapoptotických látek). Možnost, jak omezit hlavní nevýhodu PDX modelů, tzn. především absenci lidských imunitních buněk, představuje použití tzv. „humanizovaných“ myších modelů s funkčními lidskými imunitními buňkami pomocí intravenózní (i.v.) injekce periferních mononukleárních buněk (tzv. *dočasná* humanizace) nebo pomocí xenotransplantace lidské krevetvorby (nejčastěji kmenových buněk z pupečnickové krve, tzv. *trvalá* humanizace) (Lai et al., 2017), respektive použití geneticky modifikovaných myší (Zullo et al., 2012).

Naprostá většina z dostupných publikovaných primárních prací popisujících použití myších modelů lidských lymfomů je zaměřena na studium vlastních nádorových buněk, zatímco práce cílené na mikroprostředí v myších modelech jsou jen nečetné (Burack et al., 2017; Herek & Cutucache, 2017; Lemasson et al., 2021).

Lymfomy a nádorové mikroprostředí.

Role nádorové mikroprostředí (TME) je v biologii lymfomů klíčová (Coupland, 2011; Gaulard & de Leval, 2014). TME zahrnuje jak extracelulární matrix, tak buněčnou komponentu, především imunitní buňky jako jsou lymfocyty, makrofágy, neutrofilové buňky a dendritické buňky a myeloidní supresorové buňky, z neimunitních buněk pak endotelie, pericyty, fibroblasty a jiné (Junttila & de Sauvage, 2013). Extracelulární matrix tvoří několik typů kolagenů, laminy, proteoglykany a jiné, interakci mezi nádorovými buňkami a TME zprostředkovávají vedle přímého mezibuněčného kontaktu cytokiny, chemokiny, růstové faktory a další faktory. TME vytvářejí komplikovanou heterogenní a plastickou strukturu. Především imunitní buňky mají (mimo jiné) primárně protinádorovou funkci, současně však vykazují funkční plasticitu, to znamená, že mohou být nádorovými buňkami (lymfomovými nevyjímaje) přeprogramovány a TME je tak během progresu nádoru aktivně ovlivňováno ve smyslu podpory přežití, růstu a diseminace / metastázování nádorového procesu. „Editace“ či imunomodulace / imunosuprese

imunitních mechanismů nádorovými buňkami vede k jejich úniku před imunitním „dozorem“ vedoucím k progresi, a nakonec k rezistenci na léčbu (Tarte, 2017). Pochopení interakce nádoru (lymfomu) a jeho mikroprostředí vytyčuje pole pro studium nových terapeutických prostředků a strategií sloužících k posílení protinádorových imunitních mechanismů nebo naopak přerušení signálních drah vedoucích k rezistenci na léčbu (Bejarano et al., 2021).

Nádorová neovaskularizace, endotelové buňky

Růst nádoru je spojen s tvorbou nových cév (neovaskularizace) zabezpečujících jeho výživu poté, co již nestačí prostá difúze, vaskularizace nádoru (a tím daná úroveň oxygenace) je jedním z parametrů určujících agresivitu nádorového procesu a také jedním z mechanismů ovlivňujících rezistenci na léčbu. Pro nádorové cévy je charakteristické jejich chaotické uspořádání, abnormální morfologická stavba a absence hierarchie. Cévní abnormity vedou k častým trombózám s následnou ischemií až nekrózou, tkáňová hypoxie způsobená ischemií stimuluje další angiogenezi, a navíc přispívá k polarizaci makrofágů, mobilizaci a aktivaci Treg-CD4⁺ T lymfocytů, myeloidních prekursorových kmenových buněk (MPSC) a downregulaci NK buněk (Chiu et al., 2017). Produkce HIF-1 (*hypoxia induced factor*) nádorovými buňkami vede k vyšší odolnosti vůči hypoxii (Yu et al., 2009). Vzhledem k vyšší permeabilitě nádorových cév a současné produkci růstových faktorů je proces nádorové angiogeneze dále podporován. Tkáňová hypoxie vede mimo jiné i k produkci oxidu dusnatého (NO) endotelovými buňkami, což se projevuje inhibicí exprese adhezivních molekul VCAM-1 a ICAM-1 a tím pádem k omezení kontaktu endotelu s leukocyty (Takahashi et al., 1996), výsledným efektem je tak snížením počtu tumor infiltrujících lymfocytů (TIL) u solidních nádorů (Buckanovich et al., 2008). Nádorové endotelové buňky (*tumor associated endothelial cells*, TEC) mohou být současně přeprogramovány a působit tak imunosupresivně ve prospěch nádoru (Blonska et al., 2015). TEC zvyšují přežívání nádorových B lymfocytů pomocí faktoru BAFF (B lymfocyty aktivující faktor (B-cell activating factor) (Cols et al., 2012) nebo díky upregulaci proteinů PD-L1 a PD-L2 (díky inhibici cytotoxických lymfocytů, Apollonio et al., 2021). Bylo prokázáno, že úroveň vaskularizace určená parametrem MVD (mikrovaskulární denzita) negativně koreluje s celkovým přežitím u pacientů s lymfomem z pláštěvých buněk (Vesela et al., 2014). Nádorové endotelie tak představují vhodný cíl pro cílenou antiangiogenní terapii.

Cíle a hypotézy

1. *Odvození nových PDX modelů agresivních lymfomů a jejich komplexní genetická charakterizace pomocí celoexomového sekvenování v přímém srovnání s primárními lymfomovými buňkami, ze kterých byly PDX modely odvozeny.*

Hypotéza: nově odvozené PDX modely agresivních lymfomů budou sdílet většinu genetických mutací s primárními lymfomovými buňkami, ze kterých byly odvozeny. U některých PDX modelů předpokládáme subklonální charakter engraftmentu, tedy vyšší alelickou frekvenci (variant allele frequency, VAF) genů zodpovědných za biologickou agresivitu (např. mutace/delece TP53 apod.). Předpokládáme také vznik nových (de novo) mutací v průběhu růstu PDX tumor v myším organismu.

2. *Komplexní imunohistochemická analýza nově odvozených PDX tumorů v přímém srovnání s imunohistochemickým profilem lymfatických uzlin, ze kterých byly PDX modely odvozeny.*

Hypotéza: předpokládáme, že lymfomové buňky v PDX tumorech budou mít podobný imunohistochemický profil jako primární lymfomové buňky v patientských uzlinách. Předpokládáme, že cévní vaskulatura bude vznikat pomocí „sprouting“ angiogeneze, a tudíž bude myšího původu. Předpokládáme, že nenádorové komponenty běžně nacházené v lidských lymfatických uzlinách infiltrovaných lymfomem (nenádorové lymfocyty, NK buňky a makrofágy) budou v PDX tumorech zastoupeny méně nebo budou zcela chybět. Předpokládáme, že v PDX tumorech nalezneme (vedle myších cév) také myší makrofágy, které lze detekovat v myší slezině, játrech či v kostní dřeni.

3. *Dynamický in vivo monitoring míry hypoxie a míry vaskularizace PDX tumorů pomocí fotoakustického a ultrazvukového zobrazování v průběhu jejich růstu v imunodeficientních myších*

Hypotéza: předpokládáme, že v průběhu růstu PDX tumoru v myším organismu dochází ke vzniku hypoxie v centrálních částech tumoru. Dále předpokládáme, že míra vaskularity bude korelovat s mírnou hypoxií. Konečně předpokládáme, že UZ odhad míry vaskularity bude korelovat s mikrovaskulární denzitou a mikrovaskulární plochou stanovenou imunohistochemicky.

Metody

Odběr nádorové tkáně

Nádorová tkáň byla získána od pacientů s lymfomy v rámci standardního diagnostického procesu biopsií po předchozím informovaném souhlasu v souladu s Helsinskou Deklarací a po schválení etickou komisí 1. LF UK (48/18). Jednalo se o lymfomy nově diagnostikované či lymfomy relabující, rezistentní na léčbu. Ve 13 případech šlo o diagnostickou exstirpaci lymfatické uzliny, v jednom případě o probatorní excizi infiltrovaných měkkých tkání (P4, VFN-D4) a 1x o gastrokopickou biopsii (P8, VFN-B3). V 10 případech se jednalo o B-NHL, v 5 o T-NHL.

Míra infiltrace uzliny lymfomem byla v odebraných vzorcích ověřena pomocí průtokové cytometrie (FACS). Pro účely WES byly lymfomové buňky z uzliny pacienta či z PDX tumoru imunodeficientní myši separovány na magnetické koloně pomocí CD19 či CD45 protilátek s navázanými magnetickými kuličkami (Miltenyi Biotec).

Zpracování nádorové tkáně - odvození PDX modelů

Studie byla schválena etickou komisí (MSMT 21527/2017-8). Jako recipienti byly využity samice imunodeficientních myší NOD.Cg- scid II2rg tm Wjl/SzJ zakoupené z Jacksonovy laboratoře, Bar Harbor, Maine, USA (NSG myši). Tyto byly chovány v individuálně ventilovaných klecích s dostatkem vody a potravy v Centru pro experimentální biomodely 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Vzorky lidské nádorové tkáně byly nakrájeny na malé plátky a homogenizovány skrze 45 μ m nylonovou síťku, získaná drť rozmělněna v PBS (*phosphate buffered saline*) a získaná suspenze poté podkožně injikována v množství 10-30 milionů buněk / myš. Myši byly xenotransplantovány buď podkožně nebo pomocí implantace do subrenální kapsuly během krátkého operačního výkonu v celkové anestezii. V okamžiku, kdy velikost subkutánně implantovaných nádorů dosáhla 2 cm, respektive, kdy byla u operativně implantovaných nádorů ultrasonograficky (ultrazvuk Vevo 3100/LARZ-X) detekovatelná nádorová masa, byly myši usmrceny, nádorová tkáň exstirpována a následně využita pro morfologickou, genetickou a morfometrickou analýzu.

Celoexomové sekvenování (whole exome sequencing, WES)

Genomická DNA byla analyzována pomocí celoexomového sekvenování (WES). Hodnoceny byly mutace (single nucleotide variants, SNVs) a změny počtu kopií (copy number variants, CNVs).

Genomová DNA byla extrahována pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Germany) podle instrukcí výrobce. Sekvenační knihovny byly připravené pomocí kitů SureSelectXT Human All Exon V6 a UTR kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) a sekvenované na přístroji NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA, USA) v našem sekvenačním centru (CLIP, Prague, Česká republika). Sekvenční data vzorků z PDX modelů byly nejprve porovnány s myším referenčním genomem mm10 kombinovaným s lidským referenčním genomem hg19, následně bylo sekvenční čtení z myši odfiltrováno z další analýzy pomocí vlastního skriptu, aby se snížilo riziko kontaminace. Zbývající hodnoty byly poté porovnány s lidským referenčním genomem hg19. Všechna srovnání byla provedena s pomocí nástroje BWA. Genomické varianty byly anotovány pomocí programů Samtools, VarScan, a SnpEff. Hodnoceny byly pouze nesynonymní varianty v kódujících oblastech genů s pokrytím alespoň 10x a s kvalitou mapování bází vyšší než 20 ve všech souvisejících vzorcích a byly porovnány na základě jejich frekvence. Varianty v patientská germinální DNA s frekvencí vyšší než 0,05

byly z analýzy ve všech případech vyloučeny. Porovnali jsme varianty s frakcí alel větší nebo rovné 0.2 nejméně v jednom z porovnávaných vzorků, které byly přítomny alespoň ve 3 čteních jak ve vzorku s relapsem, tak ve vzorcích odvozených z PDX modelů. Filtrování variant proběhlo v softwaru RS studio, frekvence a počty variant kopií genů byly vyneseny do grafu pomocí knihovny ggplot2 (<http://www.R-project.org>; <http://www.rstudio.com>). Tyto varianty byly manuálně zkontrolovány v Integrative Genomic Viewer (IGV; <http://www.broadinstitute.org/igv>), aby byly vyloučeny sekvenační artefakty. Seznam zkoumaných genů pro každý typ lymfomu byl sestaven na podkladě poznatků z recentních publikací, jednalo se o geny u předmětných lymfomů často mutované (seznam vyšetřovaných variant/genů pro jednotlivé diagnózy jsou uvedeny v tabulce X).

Změny počtu kopií genů byly predikovány pomocí CNV kitu s normalizací oproti referenčním nenádorovým/normálním kontrolním vzorkům. Geny s největšími odchylkami v CNV analýze byly vyneseny do grafu.

Histopatologické vyšetření

Lidská nádorová tkáň i tkáň získaná z myši byla fixována v 10% roztoku pufovaného formolu a zpracována standardní histologickou technikou. Imunohistochemické vyšetření (IHC) bylo provedeno na 4 µm silných řezech, vyšetřovány byly tyto antigeny: CD45, Ki-67, MYC, CD31, CD68, CD3, CD4, CD8, CD56, CD20, bcl2, bcl6, CD10, IRF4/MUM1, cyklin D1, SOX11, CD5, ALK, CD23, PD-1, CD7, granzym B, perforin, TIA-1. Dále byly použity protilátky proti myším antigenům CD31 a CD68..

Výsledky IHC vyšetření byly vyhodnoceny semikvantitativně odhadem podle počtu pozitivních buněk (0-100 %). Při vyhodnocování Ki-67 indexu bylo považováno za pozitivní každé jádro s hnědým zbarvením jakékoliv intenzity, hodnocena byla celá plocha vyšetřovaného řezu. Skórování bylo založeno na určení oblastí s vysokým, středním a nízkým Ki-67 indexem, z každé takové plochy bylo spočítáno nejméně 100 jader. Kompletní skóre bylo poté vypočítáno z každého vzorku zvlášť a výsledky byly uvedeny v 10 % odstupech.

Detekce vitu Epstein-Barrové (EBV) provedena kitem INFORM EBER (Epstein-Barr virus early RNA) na BenchMark ULTRA automatizované platformě dle instrukcí výrobce (Ventana Benchmark, Roche, Basel, Switzerland). K barvení retikulárních a kolagenní vláken na pozadí nádoru použito barvení dle Gordona-Sweeta and van Giesona. Grading fibrózy jsme vyhodnocovali semikvantitativně jako G0 (žádná fibróza – jen roztroušená jemná retikulární vlákna), G1 (mírná fibróza – řídká síť křížících se retikulárních vláken), G2 (těžká fibróza – hustá síť křížících se silných retikulárních a kolagenních vláken) a G3 (skleróza – kompaktní plochy hyalinizované tkáně).

Vyšetření mikrovaskulární denzity (MVD)

Mikrovaskulární denzita (MVD) představuje hustotu cévních profilů (mikrocév) zachycených v tkáňovém řezu přepočtené na jednotku plochy, respektive udává dvojrozměrný obraz hustoty mikrocév na jednotku plochy tkáňového řezu (mm²). Mikrovaskulární plocha (Microvessel area, MVA) představuje procentuální poměr tkáně tvořené mikrocévami. Kvantitativní parametry MVA a MVD jsou považovány za komplementární. MVD a MVA byly stanoveny celkem ve 4 párech parafinových bloků zhotovených z nádorové tkáně pacienta a korespondujícího PDX modelu (VFN-D1 vs P1, VFN-D5 vs P5, VFN-M5R1 vs P9, VFN-R4 vs P15). Z každého bloku bylo zhotoveno postupným prokrájením po 1 mm pět řezů a tyto byly barveny imunohistochemicky s protilátkou CD31 (JC70A cílené na lidské endotelie a SP38 zaměřené na endotelové buňky myši, u PDX modelů provedeno barvení jak s lidskou, tak myší protilátkou). Kvantifikace byla provedena postupem popsáním dříve (Kolinko et al., 2021), hodnoceno bylo 10 zorných polí při zvětšení 40x metodou systematického náhodného výběru

v definovaných oblastech (viz obrázek 1 a 2) pomocí mikroskopu s motorizovaným posuvným stolcem (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). Úroveň vaskulární denzity nádorové tkáně byla zjišťována na základě vyhodnocení parametrů MVD (mikrovaskulární denzita) metodou tzv. nevyčýleném počítání v počítačím rámečku (obrázek 2A) a MVA (mikrovaskulární plocha) stereologickou metodou na základě Cavalieriho principu (obrázek 2B) s pomocí softwaru Ellipse (ViDiTo, Košice, Slovenská republika).

3.6 Ultrazvukové vyšetření vaskularity

Ultrasonografické 3D zobrazení vaskularizace subkutánních myších lymfomů bylo provedeno pomocí vysokofrekvenčního ultrazvuku Vevo 3100 (FUJIFILM VisualSonics, Inc.) a vyšetřeno vysokofrekvenční sondou Mx400 (střední frekvence 30 MHz B-Mód, 24 MHz barevný Doppler, 30 μm axiální rozlišení, 256 prvků) v barevném Dopplerově módu s anatomickou koregistrací (B-Mód). Velikost zorného pole byla 7-18 mm pro malé a střední nádory a 7-20 mm pro velké nádory. 3D skenování bylo u všech tumorů s konstantním inkrementem 80 μm . Prostor mezi povrchem sondy a kůží tumoru byl vyplněn ultrasonografickým gelem pro usnadnění přenosu echa. Nastavení parametrů: Celkový Zisk (gain) 36 dB, Pulzní Opakovací Frekvence (PRF): 3, Gate: 3, Citlivost: 3 a 4 (malé / střední a velké nádory), Perzistence: off, Uhel svazku: 0°, Wall Filter: medium. Po provedení volumetrické analýzy (VevoLAB 3.2.6) jednotlivých nádorů bylo stanoveno procento vaskularizace (PV %) což odpovídá MVA.

Jako anestézie byla použita spontánní inhalace plynného isofluranu (3% pro navození a 2% pro udržení).

Výsledky

Charakterizace PDX modelů

Celkem jsme odvodili 15 nových PDX modelů od 15 různých pacientů (9 mužů, 6 žen) s dosud neléčeným lymfomem (n=5), či s relapsem choroby lymfomu (n=10). Jednalo se o difúzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL, n = 7), včetně jednoho DLBCL transformovaného z lymfomu z buněk marginální zóny a jednoho tzv. „double hit“ lymfomu s přestavbou genů MYC a BCL2, Burkittův lymfom (BL, n = 1), lymfom z buněk plášťové zóny (mantle cell lymfom, MCL, n=2), angioimunoblastický T lymfom (AITL, n = 2), periferní T lymfom blíže nespecifikovaný (PTCL, NOS, n = 1), anaplastický velkobuněčný T lymfom (ALCL) ALK pozitivní (n = 1) a ALCL ALK negativní (n = 1). Odvozené lymfomy tak pokrývali hlavní spektrum agresivních NHL.

Genetická analýza genomu primárních lidských lymfomových buněk a z nich odvozených PDX myších modelů

Celoexomové sekvenování (*Whole exome sequencing*, WES) bylo provedeno u 13 z 15 případů, u nichž byla dostupná DNA. K vyloučení polymorfismu genů bylo ve všech případech použito srovnání s nenádorovou DNA pacientů (bukální stěr).

WES prokázalo, že PDX modely si zachovaly většinu somatických mutací původních transplantovaných lidských lymfomových buněk, ze kterých byly derivovány. Medián frekvence alel somatických mutací, jež byly detekovány jak u primárních vzorků, tak u PDX modelů (sdílené mutace) byl u obou studovaných skupin srovnatelný, u všech studovaných případů činil 0.39 (PDX) versus 0.27 (pacient), u difúzních velkobuněčných lymfomů zjištěny hodnoty 0.44 vs. 0,36 (PDX vs pacient), u lymfomů z buněk pláště 0.45 vs 0,44 (PDX vs pacient) a u Burkittova lymfomu (pouze jeden případ) činila frekvence alel 0.42 vs 0.44 (PDX vs pacient). Medián AF u T-NHL souhrnně odpovídal hodnotám 0.41 vs 0.27 (PDX vs pacient).

Somatické mutace, jež nebyly zjištěny u PDX modelů, avšak byly přítomny u patientských vzorků (tzv. „nově nedetekované“, *newly undetected*, N/U) představovaly mutace s nízkou frekvencí (medián 0.15) a jen ojediněle zahrnovaly geny, jejichž mutace se rekurentně vyskytuje u pacientů s lymfomy.

Somatické mutace nově detekované u PDX modelů, avšak nepřítomné u patientských vzorků (tj. nově získané, *newly detected*, N/D) byly ve srovnání s mutacemi N/U sice početnější, avšak rovněž představovaly převážně nízkofrekvenční mutace s mediánem frekvence alel 0.18.

Většina z N/D mutací u PDX modelů nebyla identifikována u příslušných primárních lymfomových vzorků (frekvence alel = 0) a většinou sestávaly ze záměny nukleotidů (obrázky č. 9 a 10). Některé N/D mutace byly nalezeny u primárních lymfomových vzorků, avšak jejich frekvence alel nedosahovala pre-definované hranice pro záchyt mutace (tj. frekvence $\geq 10\%$).

Závěr 1: Výsledky WES dokazují, že genetický profil PDX myších modelů je z hlediska sdílených mutací srovnatelný s primárními lymfomovými buňkami, ze kterých byly odvozeny, včetně zachování genetické heterogenity lymfomových populací. Z genetického hlediska tudíž PDX modely představují relevantní modely agresivních lymfomů. Přítomnost nově detekovaných mutací, včetně mutací rekurentně nacházených u pacientů s lymfomy, svědčí pro biologický vývoj lymfomové populace během její propagace v myším organismu (např. z důvodu pokračující somatické hypermutace).

Histopatologické porovnání PDX modelů a primárních nádorů

U některých PDX modelů DLBCL byly ve srovnání s primárními lidskými nádory pozorovány znaky vyšší agresivity onemocnění v podobě větší velikosti nádorových buněk (blastů) či přítomnosti většího počtu blastů a / nebo vyšší stupeň pleomorfie (tvarových a velikostních nepravidelostí), jmenovitě (VFN-D3, VFN-D5, DLBCL). U zbylých modelů byla morfologie nádorových buněk srovnatelná. Imunofenotyp všech B-NHL u PDX modelů zůstal ve srovnání s primárními vzorky prakticky shodný, zaznamenány byly pouze mírné rozdíly jako snížení intenzity exprese cyklinu D1 a SOX11 u lymfomů z plášťové zóny (VFN-M5R1 a VFN-M1). Viditelnější změny imunofenotypu byly pozorovány u PDX modelů odvozených od pacientů s T-lymfomy. U periferního T-lymfomu, blíže nespecifického (VFN-T6 vs P13) byla ve srovnání s primárním nádorem zjištěna zvýšená exprese CD30, CD4 a CD5, a naopak redukce exprese CD8, ztráta exprese CD7 a snížení exprese cytotoxických granul. Podobně jsme zaznamenali jisté změny imunofenotypu u dalších případů T-NHL, u ALK negativního ALCL (VFN-T5) se jednalo ztrátu exprese CD3 a zvýšení exprese CD4. V posledním ze studovaných T-NHL (ALK pozitivní ALCL) byla nově zaznamenána exprese znaku CD5. U jednoho z případů AITL (VFN-T3) došlo ve srovnání s primárním vzorkem k proliferaci blastických, EBER-pozitivních B-lymfocytů. V žádném z případů AITL (VFN-T3 a VFN-T7) nebyla u PDX modelů zjištěna přítomnost lidských folikulárních dendritických buněk, jejichž expanze je pro AITL typická.

U velké většiny PDX modelů došlo ke zvýšení proliferační aktivity (Ki-67 indexu), pouze ve třech případech PDX modelů - VFN-D20 (DLBCL), VFN-M5R1 (MCL) a VFN-T7 (AITL) - došlo ke snížení proliferačního indexu a ve třech případech – VFN-D1 (DLBCL), VFN-M1 (MCL) a VFN-T (ALK negativní ALCL) se proliferační aktivita PDX modelu shodovala nebo více méně odpovídala primárnímu nádoru. Přítomnost reziduálních lidských T lymfocytů byla pozorována jen u několika málo PDX modelů, ve všech případech šlo o DLBCL. Přítomnost lidských makrofágů byla zaznamenána pouze u případů VFN-D12 (DLBCL) a VFN-T4 (ALK pozitivní ALCL). Nejviditelnější byla absence lidských makrofágů u případu PTCL, NOS

(VFN-T6, primárně se jednalo u tzv. Lennertovu variantu s účastí četných epiteloidních histiocyty). Infiltrace myšími makrofágy v xenotransplantovaných nádorech nebyla zjištěna ani v jednom případě PDX modelů navzdory tomu, že jsme jejich přítomnost ověřili imunohistochemicky v kontrolních vzorcích ze sleziny, jater a kostní dřeně u zdravého zvířete. CD56 pozitivní NK buňky nebyly zachyceny u žádného z PDX modelů.

Úroveň vaskularizace byla u PDX modelů ve srovnání s primárními nádory ze semikvantitativního pohledu zřetelně nižší, omezovala se na velmi řídkou síť kapilár. Rozdíly v úrovni vaskularizace vynikaly zejména u případů angioimunoblastických lymfomů (VFN-T3, VFN-T7). Imunohistochemickým průkazem myšího antigenu CD31 bylo zjištěno, že se jednalo výhradně o myší cévy, přítomnost lidských endotelových CD31 pozitivních buněk u PDX modelů jsme neprokázali. Přítomnost nekróz byla zaznamenána u dvou PDX modelů DLBCL (VFN-D4 a VFN-D12), u prvního uvedeného případu byly přítomny nekrózy také u primárního nádoru. Pouze v jednom PDX modelu byla zaznamenána výraznější fibrotizace intersticia (VFN-T4, ALK negativní ALCL).

Závěr 2: Výsledky histopatologického porovnání primárních nádorů a jejich PDX modelů ukazují na určité změny morfologie xenotransplantovaných nádorových buněk (agresivnější charakter v podobě vyššího počtu blastů a / nebo pleomorfie s většinou vyšší proliferací) a změny imunofenotypu, především u PDX modelů odvozených od pacientů s T-lymfomy. Významné rozdíly byly zaznamenány zejména ve složení nádorového mikroprostředí. Jednalo se v zásadě o absenci nenádorových komponent lidských tumorů, tj. lidských T lymfocytů, NK buněk a až na výjimky také lidských makrofágů (které nebyly nahrazeny myšími makrofágy přítomnými v játrech, slezině či kostní dřeni imunodeficientních myší). Dalším významným zjištěním byla signifikantně nižší úroveň vaskularizace složená výhradně z cév myšího původu.

Diskuse

Provedli jsme komplexní histopatologickou a genetickou analýzu 15 PDX modelů odvozených od pacientů s nejčastějšími typy agresivních NHL včetně difúzního velkobuněčného B lymfomu (DLBCL-non GC i GC, tzv. „double hit“ DLBCL a DLBCL transformovaný z MZL), Burkittova lymfomu (MCL), lymfomu z plášťové zóny (MCL), angioimunoblastického T lymfomu (AITL), periferního T lymfomu blíže nespecifikovaného (PTCL, NOS) a anaplastického velkobuněčného T lymfomu (ALCL), ALK pozitivního i negativního, včetně vyšetření vybraných faktorů mikroprostředí. Genetická analýza WES prokázala, že u většiny odvozených PDX modelů bylo možno detekovat většinu somatických mutací, které se nacházely u primárních lymfomových buněk (ze kterých byly PDX modely odvozeny). Tyto výsledky se shodují s dříve publikovanými daty (Forde et al., 2021; Chapuy et al., 2016; Townsend et al., 2016; Woo et al., 2021; Zhang et al., 2017). PDX modely sdílely nejen stejné typy mutací, nýbrž i podobnou frekvenci těchto mutací (VAF). Vedle srovnatelného mutačního profilu byly v PDX buňkách pomocí WES predikovány i srovnatelné změny počtu kopií DNA (copy number variants, CNV), tj. delece či amplifikace příslušných genových oblastí. Data z analýzy WES tudíž potvrdila, že se v naprosté většině případů nejedná o subklony původních, více heterogenních lymfomů, ale že si PDX tumory zachovávají plnou genetickou diverzitu dárcovských lymfomů. Ve většině analyzovaných PDX modelů počet sdílených mutací převyšoval jak počet mutací nově detekovaných (N/D), tak počet mutací nově nedetekovaných (N/U). Vyšší nálož N/D a N/U mutací byla zjištěna pouze ve 3 případech - VFN-D6 (P2, DLBCL), VFN-M1 (P10, MCL) a VFN-T6 (P13, T-NHL). S výjimkou VFN-T6 byl počet N/D mutací vždy vyšší než počet N/U mutací. Většina N/D mutací nebyla detekována u primárních

lymfomových buněk (tj. jejich alelická frekvence byla rovna nule). Menšina N/D mutací byla u primárních lymfomových buněk sice detekována, ale pod nastaveným limitem (tj. VAF < 10%). Tato pozorování naznačují, že velká většina N/D mutací představuje *de novo* mutace získané v průběhu dělení lymfomových buněk v myším organismu, např. mechanismem somatické hypermutace, což odpovídá dříve publikovaným sdělením (Di Noia & Neuberger, 2007; Choi et al., 2016). Na druhé straně, N/U mutace byly méně četné a v naprosté většině nízkofrekventní. Jejich biologický význam zůstává nejasný, ale s největší pravděpodobností se jedná o nevýznamné (passenger) mutace, které byly ztraceny v průběhu *in vivo* růstu PDX tumoru.

Na rozdíl od v zásadě shodného genetického profilu PDX modelů a primárních lymfomových buněk, histologická analýza odhalila určité fenotypické alterace PDX buněk i mikroprostředí PDX tumorů ve srovnání s primárními lymfomovými buňkami, resp. mikroprostředím lymfomem infiltrované uzliny. Morfologie PDX buněk vykazovala výraznější změny ve smyslu větší velikosti a / nebo vyššího stupně pleomorfie. PDX tumory vykazovaly obvykle vyšší proliferační aktivitu dle Ki-67 ve srovnání s příslušnou dáčovskou lymfomovu tkání. Tyto výsledky poukazují na agresivnější fenotyp engraftovaných PDX buněk. Pokud vezmeme v úvahu genetickou podobnost PDX modelů a primárních lymfomů, mohou být tyto rozdíly vysvětleny odlišným složením TME.

Vedle morfologických změn byly u některých PDX modelů pozorovány i rozdíly v jejich imunofenotypu. - např. nižší exprese cyklinu D1 a SOX11 u PDX modelů MCL nebo snížení míry exprese či úplná ztráta exprese cytotoxických granul a některých CD antigenů u PDX modelů odvozených od pacientů s T-NHL. Mechanismy vedoucí ke změně imunofenotypu zůstávají nejasné. U PDX modelu VFN-T3 odvozeného od pacienta s AITL byla zaznamenána proliferace CD20-pozitivních, EBER-pozitivních velkých blastických lymfocytů. Zůstává otázkou, zda šlo o rozvoj sekundárního EBV-pozitivního difúzního velkobuněčného B lymfomu, což je komplikace, jež u případů AITL dokumentována (Chen et al., 2018; Yang et al., 2012) nebo o engraftment B buněčného, virem EBV infikovaného subklonu, jež se může u PDX modelů vyvinout. Přítomnost jednotlivých EBER-pozitivních buněk byla v primárním vzorku (tj. infiltrované lymfatické uzlině) prokázána.

Ačkoli PDX modely popsané v naší práci sdíleli podobný genetický profil a (s určitými odchylkami) i podobný imunofenotyp, došlo u PDX tumorů ke kompletní ztrátě heterogenity TME ve smyslu absence nenádorových komponent běžně pozorovaných u lymfomů. U všech PDX modelů jsme potvrdili absenci lidských T lymfocytů a makrofágů, ačkoli buněčná suspenze primárních nádorů použitá pro xenotransplantaci nebyla nijak purifikována. V PDX modelech nebyly nalezeny ani myší makrofágy a to navzdory tomu, že jsme jejich přítomnost prokázali v řadě myších orgánů, konkrétně ve slezině, játrech a kostní dřeni. Absence buněk TME může být vysvětlena jejich ztrátou v průběhu zpracování nádorové tkáně nebo nedostatečnými podmínkami v organismu hostitele a jejich zániku v odbobí po jejich přenosu. Absence buněk TME u xenografitované tkáně se může odrazit nejen ve změně fenotypu u PDX modelů, ale také v úspěšnosti „přihojení“ nádorové populace. Na rozdíl od infiltrovaných uzlin tak PDX modely představují v zásadě homogenní nakupení PDX buněk s minimální příměsí myších buněk, zejména cév a fibroblastů.

Z hlediska nádorové angiogeneze byla u PDX modelů ve srovnání s primárními nádory zjištěna signifikantně nižší úroveň vaskularizace (parametry MVA a MVD), přičemž se jednalo výhradně o myší, nikoliv lidské cévy. Nižší MVD a MVA mohou si vysvětlujeme suboptimální stimulací myší angiogeneze endoteliálním růstovým faktorem (VEGF) produkovaným lymfomovými buňkami v důsledku hypoxie. Nižší úroveň MVD / MVA myších cév může mít

zásadní vliv na výsledky preklinických studií v terapii antiangiogenními léčivy založenými na pasivní akumulaci léčiva v nádorové tkáni (nanoterapeutika cílená zejména pomocí tzv. enhanced permeability and retention [EPR] efektu).

Burack (Burack et al., 2017) se ve své práci zaměřil na PDX modely nízké maligních lymfomů (folikulární lymfom a lymfom z marginální zóny), u kterých je vliv TME na přežití nádorových buněk *ex vivo* všeobecně znám. Použil tzv. OTX modely (*omental tumor xenografts*), které umožňují přihojení nádorových i nenádorových buněk (B a T lymfocyty, plazmatické buňky). Do omenta imunodeficientních myši implantoval jednak purifikované buněčné suspenze zahrnující pouze nádorové buňky „očištěné“ od buněk TME, jednak neselektované suspenze homogenizovaných uzlin získaných od pacientů s indolentními lymfomy. Jednoznačně byla prokázána vyšší úspěšnost „engraftmentu“ za přítomnosti CD3+, CD4+ T lymfocytů a v některých případech i nenádorových B lymfocytů, zatímco absence CD8+ lymfocytů v úspěšnosti přihojení nehrála roli. Mimo jiné, stejně jako my, neprokázal v žádném z xenograftů makrofágy ani dendritické buňky. Zůstává otázkou, zda PDX modely v této studii reprezentují selekci případů nádorů nejméně závislých na faktorech lidského TME. Během cca 10 leté trvalé snahy vyvinout PDX modely různých NHL v lymfomové laboratoři na Ústavu patologické fyziologie 1.LF UK se úspěšnost přihojení engraftovaných buněk pohybuje okolo 20 % (tedy cca 1 z 5 pacientů). Dá se předpokládat, že lymfomové buňky, jejichž přežití je plně závislé na lidském TME, nemohou v myši přežít. Rozdíly v úspěšnosti xenotransplantace však mohou být způsobeny i takovými faktory, jako jsou charakter primárního vzorku, ze kterého byly nádorové buňky získány, způsoby implantace (implantace do subrenálního tukového pouzdra, omenta, intravenózní a subkutánní nebo intraperitoneální injekce), předchozí ozáření myši, použití čerstvých xenotransplantovaných buněk nebo buněk zmrazených. V naší předešlé práci (Klanova et al., 2014) jsme porovnávali způsob engraftmentu ustálených lymfomových linií (tj. CDX modely) a primárních lymfomových buněk po *i.v.* xenotransplantaci. Zatímco lymfomové linie engraftovali primárně v kostní dřeni xenotransplantovaných zvířat, lymfomové buňky získané od pacienta engraftovaly primárně v myši slezině. Dále jsme prokázali, že u lymfomových linií lze pozorovat plastickou změnu transkriptomu z *in vitro* profilu (buňky kultivované v podmínkách tkáňových kultur) do *in vivo* profilu (po engraftmentu lymfomových linií v imunodeficientních myších) a zpět do *in vitro* profilu po *ex vivo* (re)kultivaci lymfomových buněk získaných z infiltrovaných myších orgánů v podmínkách tkáňových kultur.

Forde (Forde et al., 2021) uvádí nejvyšší úspěšnost přihojení Burkittova lymfomu z buněk získaných z pleurálního výpotku, o něco nižší úspěšnost u buněk získaných z periferní krve a kostní dřeni (při intraperitoneální a subkutánní infiltraci) a nulovou úspěšnost u lymfomových buněk získaného ze solidního nádoru. Také my jsme pozorovali největší úspěšnost při xenotransplantaci lymfomových buněk získaných z maligních výpotků a leukemizované krve ve srovnání s xenotransplantací homogenizátů lymfatických uzlin. Toto pozorování lze vysvětlit nižší závislostí lymfomových buněk rostoucích ve formě „suspenze“ v maligních výpotcích na lidském TME ve srovnání s lymfomovými buňkami rostoucími v infiltrovaných lymfatických uzlinách.

Townsend (Townsend et al., 2016) uvádí, že míra přihojení po první pasáži z pacienta do zvířete se lišila dle agresivity oneomecnění, nejúspěšnější byly výsledky s agresivními typy leukémie (akutní lymfoblastické následované akutní myeloidní (v rozmezí 23-67 %), zatímco u lymfomů to bylo jen okolo 20 % (tedy výsledek odpovídající našim vlastním zkušenostem). Vyšší úspěšnost přihojení u lymfomů byla pozorována u dalšího přepasáží (76,9 %) a s použitím implantace do subrenálního tukového pouzdra. Intravenózní aplikace dokonce vedla k ortotopickému postižení myších orgánů podobně jako tomu bylo u primárních nádorů

pacientů. Můžeme jen spekulovat, který z *in vivo* faktorů přispívá k přežití xenotransplantátů, zda je to přímý mezibuněčný kontakt, hypoxie, růstové faktory, metabolické změny či jiné faktory.

Shrnutí

Odvodili jsme 15 PDX modelů od pacientů s různými typy ne Hodgkinských lymfomů a provedli jsme jejich zevrubnou genetickou a imunohistochemickou analýzu v přímém srovnání s primárními lymfomovými buňkami, ze kterých byly PDX modely odvozeny. Jednoznačně jsme prokázali, že většina PDX modelů sdílí klíčové genetické mutace (tzv. driver mutace) s primárními lymfomovými buňkami. Z genetického hlediska tudíž PDX modely představují relevantní nástroj pro studium biologie lymfomů. Imunohistochemická analýza vybraných znaků prokázala mírné odchylky v imunofenotypu lymfomových buněk ve srovnání s primárními lymfomovými buňkami, ze kterých byly PDX modely odvozeny. Imunohistochemická analýza zaměřená na nádorové mikroprostředí prokázala absenci nenádorových komponent běžně nacházených v lymfomem infiltrované uzlině včetně T-lymfocytů, makrofágů, či NK buněk. PDX tumory vykazovaly signifikantně sníženou vaskularitu složenou výhradně z myších cév. Ačkoli tedy PDX modely představují cenný nástroj preklinického studia agresivních lymfomů, je třeba mít na paměti výrazné odlišnosti mezi PDX tumorem a původní lymfomovou uzlinou, například při testování terapeutických postupů zaměřených na nádorové mikroprostředí (antiangiogenní terapie, různé formy imunoterapie, nanoterapeutika závislá na EPR efektu apod.)

Reference

- Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I., Attygalle, A. D., Araujo, I. B. D., Berti, E., Bhagat, G., Borges, A. M., Boyer, D., Calaminici, M., Chadburn, A., Chan, J. K. C., Cheuk, W., Chng, W. J., Choi, J. K., Chuang, S. S., Coupland, S. E., Czader, M., Dave, S. S., . . . Xiao, W. B. (2022). The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*, *36*(7), 1720-1748. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01620-2>
- Ame-Thomas, P., & Tarte, K. (2014). The yin and the yang of follicular lymphoma cell niches: role of microenvironment heterogeneity and plasticity. *Semin Cancer Biol*, *24*, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.08.001>
- Apollonio, B., Ioannou, N., Papazoglou, D., & Ramsay, A. G. (2021). Understanding the Immune-Stroma Microenvironment in B Cell Malignancies for Effective Immunotherapy. *Front Oncol*, *11*, 626818. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.626818>
- Bejarano, L., Jordao, M. J. C., & Joyce, J. A. (2021). Therapeutic Targeting of the Tumor Microenvironment. *Cancer Discovery*, *11*(4), 933-959. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-20-1808>
- Blonska, M., Agarwal, N. K., & Vega, F. (2015). Shaping of the tumor microenvironment: Stromal cells and vessels. *Semin Cancer Biol*, *34*, 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.002>
- Bruneau, J., Canioni, D., Renand, A., Marafioti, T., Paterson, J. C., Martin-Garcia, N., Gaulard, P., Delfau, M. H., Hermine, O., Macintyre, E., Brousse, N., & Asnafi, V. (2010). Regulatory T-cell depletion in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Pathol*, *177*(2), 570-574. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100150>
- Buckanovich, R. J., Facciabene, A., Kim, S., Benencia, F., Sasaroli, D., Balint, K., Katsaros, D., O'Brien-Jenkins, A., Gimotty, P. A., & Coukos, G. (2008). Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy. *Nat Med*, *14*(1), 28-36. <https://doi.org/10.1038/nm1699>
- Burack, W. R., Spence, J. M., Spence, J. P., Spence, S. A., Rock, P. J., Shenoy, G. N., Shultz, L. D., Bankert, R. B., & Bernstein, S. H. (2017). Patient-derived xenografts of low-grade B-cell lymphomas demonstrate roles of the tumor microenvironment. *Blood Adv*, *1*(16), 1263-1273. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017005892>
- Cai, Q. C., Liao, H., Lin, S. X., Xia, Y., Wang, X. X., Gao, Y., Lin, Z. X., Lu, J. B., & Huang, H. Q. (2012). High expression of tumor-infiltrating macrophages correlates with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Med Oncol*, *29*(4), 2317-2322. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-0123-6>
- Catala, E., Iacoboni, G., & Barba, P. (2022). Chimeric antigen receptor T-cell (CAR-T) therapy in patients with aggressive B-cell lymphomas. Current outlook after a decade of treatment. *Medicina Clinica*, *158*(7), 327-332. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2021.10.005>
- Cohen, N., Shani, O., Raz, Y., Sharon, Y., Hoffman, D., Abramovitz, L., & Erez, N. (2017). Fibroblasts drive an immunosuppressive and growth-promoting microenvironment in breast cancer via secretion of Chitinase 3-like 1. *Oncogene*, *36*(31), 4457-4468. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.65>
- Cols, M., Barra, C. M., He, B., Puga, I., Xu, W., Chiu, A., Tam, W., Knowles, D. M., Dillon, S. R., Leonard, J. P., Furman, R. R., Chen, K., & Cerutti, A. (2012). Stromal endothelial cells establish a bidirectional crosstalk with chronic lymphocytic leukemia cells through the TNF-related factors BAFF, APRIL, and CD40L. *J Immunol*, *188*(12), 6071-6083. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102066>
- Comito, G., Giannoni, E., Segura, C. P., Barcellos-de-Souza, P., Raspollini, M. R., Baroni, G., Lanciotti, M., Serni, S., & Chiarugi, P. (2014). Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. *Oncogene*, *33*(19), 2423-2431. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.191>
- Coupland, S. E. (2011). The challenge of the microenvironment in B-cell lymphomas. *Histopathology*, *58*(1), 69-80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03706.x>
- Cozar, B., Greppi, M., Carpentier, S., Narni-Mancinelli, E., Chiossone, L., & Vivier, E. (2021). Tumor-Infiltrating Natural Killer Cells. *Cancer Discov*, *11*(1), 34-44. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0655>
- Day, C. P., Merlino, G., & Van Dyke, T. (2015). Preclinical mouse cancer models: a maze of opportunities and challenges. *Cell*, *163*(1), 39-53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.068>
- de Leval, L., Rickman, D. S., Thielen, C., Reynies, A., Huang, Y. L., Delsol, G., Lamant, L., Leroy, K., Briere, J., Molina, T., Berger, F., Gisselbrecht, C., Xerri, L., & Gaulard, P. (2007). The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood*, *109*(11), 4952-4963. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-055145>

- Di Noia, J. M., & Neuberger, M. S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem*, 76, 1-22. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061705.090740>
- Dias, S., Hattori, K., Heissig, B., Zhu, Z. P., Wu, Y., Witte, L., Hicklin, D. J., Tateno, M., Bohlen, P., Moore, M. A. S., & Rafii, S. (2001). Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10857-10862. <https://doi.org/DOI.10.1073/pnas.191117498>
- Dierks, C., Grbic, J., Zirlik, K., Beigi, R., Englund, N. P., Guo, G. R., Veelken, H., Engelhardt, M., Mertelsmann, R., Kelleher, J. F., Schultz, P., & Warmuth, M. (2007). Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat Med*, 13(8), 944-951. <https://doi.org/10.1038/nm1614>
- Dome, B., Hendrix, M. J., Paku, S., Tovari, J., & Timar, J. (2007). Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*, 170(1), 1-15. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060302>
- Forde, S., Matthews, J. D., Jahangiri, L., Lee, L. C., Prokoph, N., Malcolm, T. I. M., Giger, O. T., Bell, N., Blair, H., O'Marcaigh, A., Smith, O., Kenner, L., Bomken, S., Burke, G. A. A., & Turner, S. D. (2021). Paediatric Burkitt lymphoma patient-derived xenografts capture disease characteristics over time and are a model for therapy. *Br J Haematol*, 192(2), 354-365. <https://doi.org/10.1111/bjh.17043>
- Gaulard, P., & de Leval, L. (2014). The microenvironment in T-cell lymphomas: emerging themes. *Semin Cancer Biol*, 24, 49-60. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.11.004>
- Giese, M. A., Hind, L. E., & Huttenlocher, A. (2019). Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood*, 133(20), 2159-2167. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-11-844548>
- Gok Yavuz, B., Gunaydin, G., Gedik, M. E., Kosemehmetoglu, K., Karakoc, D., Ozgur, F., & Guc, D. (2019). Cancer associated fibroblasts sculpt tumour microenvironment by recruiting monocytes and inducing immunosuppressive PD-1(+) TAMs. *Sci Rep*, 9(1), 3172. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39553-z>
- Guenova, E., Watanabe, R., Teague, J. E., DeSimone, J. A., Jiang, J., Dowlatschahi, M., Schlapbach, C., Schakel, K., Rook, A. H., Tawa, M., Fischer, D. C., Kupper, T. S., & Clark, R. A. (2014). Th2 cytokines from malignant cells suppress Th1 responses and enforce a global Th2 bias in leukemic cutaneous T-cell lymphoma. *Experimental Dermatology*, 23(3), E50-E50. <Go to ISI>://WOS:000332335500317
- Herek, T. A., & Cutucache, C. E. (2017). Using Murine Models to investigate Tumor-Lymphoid interactions: Spotlight on Chronic Lymphocytic Leukemia and Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma. *Frontiers in Oncology*, 7. <https://doi.org/ARTN.10.3389/fonc.2017.00086>
- Chao, M. P., Alizadeh, A. A., Tang, C., Myklebust, J. H., Varghese, B., Gill, S., Jan, M., Cha, A. C., Chan, C. K., Tan, B. T., Park, C. Y., Zhao, F., Kohrt, H. E., Malumbres, R., Briones, J., Gascoyne, R. D., Lossos, I. S., Levy, R., Weissman, I. L., & Majeti, R. (2010). Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell*, 142(5), 699-713. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.044>
- Chapuy, B., Cheng, H., Watahiki, A., Ducar, M. D., Tan, Y., Chen, L., Roemer, M. G., Ouyang, J., Christie, A. L., Zhang, L., Gusenleitner, D., Abo, R. P., Farinha, P., von Bonin, F., Thorner, A. R., Sun, H. H., Gascoyne, R. D., Pinkus, G. S., van Hummelen, P., . . . Shipp, M. A. (2016). Diffuse large B-cell lymphoma patient-derived xenograft models capture the molecular and biological heterogeneity of the disease. *Blood*, 127(18), 2203-2213. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-672352>
- Chen, B. J., Dashnamoorthy, R., Galera, P., Makarenko, V., Chang, H., Ghosh, S., & Evens, A. M. (2019). The immune checkpoint molecules PD-1, PD-L1, TIM-3 and LAG-3 in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 10(21), 2030-2040. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26771>
- Chen, H., Xue, Y. N., Xin, C. M., Xiong, J. S., Ni, X., & Sun, J. F. (2018). Secondary Cutaneous Epstein-Barr Virus-associated Diffuse Large B-cell Lymphoma with Hodgkin/Reed-Sternberg-like Cells in a Patient with Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma. *Acta Derm Venereol*, 98(10), 981-982. <https://doi.org/10.2340/00015555-2996>
- Chen, L., Xie, T., Wei, B., & Di, D. L. (2022). Current progress in CAR-T cell therapy for tumor treatment. *Oncology Letters*, 24(4). <https://doi.org/ARTN.10.3892/ol.2022.13478>
- Chen, X., & Song, E. (2019). Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Drug Discov*, 18(2), 99-115. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0004-1>
- Chiu, D. K. C., Tse, A. P. W., Xu, I. M. J., Di Cui, J., Lai, R. K. H., Li, L. L., Koh, H. Y., Tsang, F. H. C., Wei, L. L., Wong, C. M., Ng, I. O. L., & Wong, C. C. L. (2017). Hypoxia inducible factor HIF-1 promotes

myeloid-derived suppressor cells accumulation through ENTPD2/CD39L1 in hepatocellular carcinoma. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/ARTN 517>

10.1038/s41467-017-00530-7

- Choi, Y. Y., Lee, J. E., Kim, H., Sim, M. H., Kim, K. K., Lee, G., Kim, H. I., An, J. Y., Hyung, W. J., Kim, C. B., Noh, S. H., Kim, S., & Cheong, J. H. (2016). Establishment and characterisation of patient-derived xenografts as preclinical models for gastric cancer. *Sci Rep*, 6, 22172. <https://doi.org/10.1038/srep22172>
- Jaillon, S., Ponzetta, A., Di Mitri, D., Santoni, A., Bonocchi, R., & Mantovani, A. (2020). Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 20(9), 485-503. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0281-y>
- Jaksa, R., Karolova, J., Svaton, M., Kazantsev, D., Grajciarova, M., Pokorna, E., Tonar, Z., Klanova, M., Winkowska, L., Malarikova, D., Vockova, P., Forsterova, K., Renesova, N., Dolnikova, A., Nozickova, K., Dunder, P., Fronkova, E., Trneny, M., & Klener, P. (2022). Complex genetic and histopathological study of 15 patient-derived xenografts of aggressive lymphomas. *Lab Invest*, 102(9), 957-965. <https://doi.org/10.1038/s41374-022-00784-w>
- Joyce, J. A., & Fearon, D. T. (2015). T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*, 348(6230), 74-80. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6204>
- Junttila, M. R., & de Sauvage, F. J. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 501(7467), 346-354. <https://doi.org/10.1038/nature12626>
- Kang, C. (2022). Mosunetuzumab: First Approval. *Drugs*, 82(11), 1229-1234. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01749-5>
- Kim, S., Kwon, D., Koh, J., Nam, S. J., Kim, Y. A., Kim, T. M., Kim, C. W., & Jeon, Y. K. (2020). Clinicopathological features of programmed cell death-1 and programmed cell death-ligand-1 expression in the tumor cells and tumor microenvironment of angioimmunoblastic T cell lymphoma and peripheral T cell lymphoma not otherwise specified. *Virchows Arch*, 477(1), 131-142. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02790-z>
- Klanova, M., Soukup, T., Jaksa, R., Molinsky, J., Lateckova, L., Maswabi, B. C., Prukova, D., Brezinova, J., Michalova, K., Vockova, P., Hernandez-Ilizaliturri, F., Kulvait, V., Zivny, J., Vokurka, M., Necas, E., Trneny, M., & Klener, P. (2014). Mouse models of mantle cell lymphoma, complex changes in gene expression and phenotype of engrafted MCL cells: implications for preclinical research. *Lab Invest*, 94(7), 806-817. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.61>
- Kline, J., Godfrey, J., & Ansell, S. M. (2020). The immune landscape and response to immune checkpoint blockade therapy in lymphoma. *Blood*, 135(8), 523-533. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000847>
- Kohrt, H. E., Thielens, A., Marabelle, A., Sagiv-Barfi, I., Sola, C., Chanuc, F., Fuseri, N., Bonnafous, C., Czerwinski, D., Rajapaksa, A., Waller, E., Ugolini, S., Vivier, E., Romagne, F., Levy, R., Blery, M., & Andre, P. (2014). Anti-KIR antibody enhancement of anti-lymphoma activity of natural killer cells as monotherapy and in combination with anti-CD20 antibodies. *Blood*, 123(5), 678-686. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-519199>
- Kuramoto, K., Sakai, A., Shigemasa, K., Takimoto, Y., Asaoku, H., Tsujimoto, T., Oda, K., Kimura, A., Uesaka, T., Watanabe, H., & Katoh, O. (2002). High expression of MCL1 gene related to vascular endothelial growth factor is associated with poor outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*, 116(1), 158-161. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03253.x>
- Lai, Y., Wei, X., Lin, S., Qin, L., Cheng, L., & Li, P. (2017). Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research. *J Hematol Oncol*, 10(1), 106. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0470-7>
- Lamb, M. G., Rangarajan, H. G., Tullius, B. P., & Lee, D. A. (2021). Natural killer cell therapy for hematologic malignancies: successes, challenges, and the future. *Stem Cell Res Ther*, 12(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02277-x>
- Leidi, M., Gotti, E., Bologna, L., Miranda, E., Rimoldi, M., Sica, A., Roncalli, M., Palumbo, G. A., Introna, M., & Golay, J. (2009). M2 macrophages phagocytose rituximab-opsonized leukemic targets more efficiently than m1 cells in vitro. *J Immunol*, 182(7), 4415-4422. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0713732>
- Lemasson, Q., Akil, H., Feuillard, J., & Vincent-Fabert, C. (2021). Genetically Engineered Mouse Models Support a Major Role of Immune Checkpoint-Dependent Immunosurveillance Escape in B-Cell Lymphomas. *Front Immunol*, 12, 669964. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669964>
- Lin, Y. X., Xu, J. X., & Lan, H. Y. (2019). Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *Journal of Hematology & Oncology*, 12. <https://doi.org/ARTN 76>

10.1186/s13045-019-0760-3

- Lindemann, R. K. (2008). Stroma-initiated hedgehog signaling takes center stage in B-cell lymphoma. *Cancer Res*, 68(4), 961-964. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5500>
- Liu, Y., Zhou, X., & Wang, X. (2021). Targeting the tumor microenvironment in B-cell lymphoma: challenges and opportunities. *J Hematol Oncol*, 14(1), 125. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01134-x>
- Marinaccio, C., Ingravallo, G., Gaudio, F., Perrone, T., Nico, B., Maoirano, E., Specchia, G., & Ribatti, D. (2014). Microvascular density, CD68 and tryptase expression in human diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Res*, 38(11), 1374-1377. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.09.007>
- McWilliams, E. M., Mele, J. M., Cheney, C., Timmerman, E. A., Fiazuddin, F., Strattan, E. J., Mo, X., Byrd, J. C., Muthusamy, N., & Awan, F. T. (2016). Therapeutic CD94/NKG2A blockade improves natural killer cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology*, 5(10), e1226720. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1226720>
- Menter, T., Tzankov, A., & Dirnhofer, S. (2021). The tumor microenvironment of lymphomas: Insights into the potential role and modes of actions of checkpoint inhibitors. *Hematol Oncol*, 39(1), 3-10. <https://doi.org/10.1002/hon.2821>
- Myers, J. A., & Miller, J. S. (2021). Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(2), 85-100. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0426-7>
- Negaard, H. F., Svennevig, K., Kolset, S. O., Iversen, N., Lothe, I. M., Ostensad, B., Sandset, P. M., & Iversen, P. O. (2009). Alterations in regulators of the extracellular matrix in non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma*, 50(6), 998-1004. <https://doi.org/10.1080/10428190902889270>
- Noble, J. N., & Mishra, A. (2019). Development and Significance of Mouse Models in Lymphoma Research. *Curr Hematol Malig Rep*, 14(2), 119-126. <https://doi.org/10.1007/s11899-019-00504-0>
- Noy, R., & Pollard, J. W. (2014). Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*, 41(1), 49-61. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>
- Okita, R., Saeki, T., Takashima, S., Yamaguchi, Y., & Toge, T. (2005). CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, 14(5), 1269-1273. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16211295>
- Pascual, M., Mena-Varas, M., Robles, E. F., Garcia-Barchino, M. J., Panizo, C., Hervas-Stubbs, S., Alignani, D., Sagardoy, A., Martinez-Ferrandis, J. I., Bunting, K. L., Meier, S., Sagaert, X., Bagnara, D., Guruceaga, E., Blanco, O., Celay, J., Martinez-Baztan, A., Casares, N., Lasarte, J. J., . . . Roa, S. (2019). PD-1/PD-L1 immune checkpoint and p53 loss facilitate tumor progression in activated B-cell diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, 133(22), 2401-2412. <https://doi.org/10.1182/blood.2018889931>
- Ping, Q., Yan, R., Cheng, X., Wang, W., Zhong, Y., Hou, Z., Shi, Y., Wang, C., & Li, R. (2021). Correction: Cancer-associated fibroblasts: overview, progress, challenges, and directions. *Cancer Gene Ther*, 28(9), 1074. <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00343-3>
- Rabenhorst, A., Schlaak, M., Heukamp, L. C., Forster, A., Theurich, S., von Bergwelt-Baildon, M., Buttner, R., Kurschat, P., Mauch, C., Roers, A., & Hartmann, K. (2012). Mast cells play a protumorigenic role in primary cutaneous lymphoma. *Blood*, 120(10), 2042-2054. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-415638>
- Ranganathan, R., Shou, P. S., Ahn, S., Sun, C., West, J., Savoldo, B., & Dotti, G. (2021). CAR T cells Targeting Human Immunoglobulin Light Chains Eradicate Mature B-cell Malignancies While Sparing a Subset of Normal B Cells. *Clinical Cancer Research*, 27(21), 5951-5960. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-20-2754>
- Ren, P., Zhang, C. Y., Li, W. P., Wang, X., Liang, A. B., Yang, G., Xu, H. T., & Ma, P. X. (2022). CAR-T Therapy in Clinical Practice: Technical Advances and Current Challenges. *Advanced Biology*, 6(8). <https://doi.org/ARTN 2101262 10.1002/adbi.202101262>
- Ribatti, D., Molica, S., Vacca, A., Nico, B., Crivellato, E., Roccaro, A. M., & Dammacco, F. (2003). Tryptase-positive mast cells correlate positively with bone marrow angiogenesis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 17(7), 1428-1430. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402970>
- Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D. G., Egeblad, M., Evans, R. M., Fearon, D., Greten, F. R., Hingorani, S. R., Hunter, T., Hynes, R. O., Jain, R. K., Janowitz, T., Jorgensen, C., Kimmelman, A. C., Kolonin, M. G., Maki, R. G., Powers, R. S., Pure, E., . . . Werb, Z. (2020). A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*, 20(3), 174-186. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1>
- Salven, P., Orpana, A., Teerenhovi, L., & Joensuu, H. (2000). Simultaneous elevation in the serum concentrations of the angiogenic growth factors VEGF and bFGF is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin lymphoma: a single-institution study of 200 patients. *Blood*, 96(12), 3712-3718. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090051>

- Scott, D. W., & Gascoyne, R. D. (2014). The tumour microenvironment in B cell lymphomas. *Nat Rev Cancer*, *14*(8), 517-534. <https://doi.org/10.1038/nrc3774>
- Singh, R. R., Kim, J. E., Davuluri, Y., Drakos, E., Cho-Vega, J. H., Amin, H. M., & Vega, F. (2010). Hedgehog signaling pathway is activated in diffuse large B-cell lymphoma and contributes to tumor cell survival and proliferation. *Leukemia*, *24*(5), 1025-1036. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.35>
- Smits, N. C., & Sentman, C. L. (2016). Bispecific T-Cell Engagers (BiTEs) as Treatment of B-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, *34*(10), 1131-+. <https://doi.org/10.1200/Jco.2015.64.9970>
- Stadlbauer, K., Andorfer, P., Stadlmayr, G., Ruker, F., & Wozniak-Knopp, G. (2022). Bispecific mAb(2) Antibodies Targeting CD59 Enhance the Complement-Dependent Cytotoxicity Mediated by Rituximab. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(9). <https://doi.org/ARTN 5208.0.3390/ijms23095208>
- Steidl, C., Lee, T., Shah, S. P., Farinha, P., Han, G., Nayar, T., Delaney, A., Jones, S. J., Iqbal, J., Weisenburger, D. D., Bast, M. A., Rosenwald, A., Muller-Hermelink, H. K., Rimsza, L. M., Campo, E., Delabie, J., Braziel, R. M., Cook, J. R., Tubbs, R. R., . . . Gascoyne, R. D. (2010). Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, *362*(10), 875-885. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0905680>
- Stewart, M., Talks, K., Leek, R., Turley, H., Pezzella, F., Harris, A., & Gatter, K. (2002). Expression of angiogenic factors and hypoxia inducible factors HIF 1, HIF 2 and CA IX in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology*, *40*(3), 253-260. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2002.01357.x>
- Sugio, T., Miyawaki, K., Kato, K., Sasaki, K., Yamada, K., Iqbal, J., Miyamoto, T., Ohshima, K., Maeda, T., Miyoshi, H., & Akashi, K. (2018). Microenvironmental immune cell signatures dictate clinical outcomes for PTCL-NOS. *Blood Adv*, *2*(17), 2242-2252. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018018754>
- Takahashi, M., Ikeda, U., Masuyama, J., Funayama, H., Kano, S., & Shimada, K. (1996). Nitric oxide attenuates adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Cytokine*, *8*(11), 817-821. <https://doi.org/10.1006/cyto.1996.0109>
- Takheaw, N., Sittithumcharee, G., Kariya, R., Kasinrerak, W., & Okada, S. (2021). Anti-human CD99 antibody exerts potent antitumor effects in mantle cell lymphoma. *Cancer Immunology Immunotherapy*, *70*(6), 1557-1567. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02789-0>
- Tarte, K. (2017). Role of the microenvironment across histological subtypes of NHL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, *2017*(1), 610-617. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.610>
- Thandra, K. C., Barsouk, A., Saginala, K., Padala, S. A., Barsouk, A., & Rawla, P. (2021). Epidemiology of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Med Sci (Basel)*, *9*(1). <https://doi.org/10.3390/medsci9010005>
- Tian, X., Shen, H., Li, Z., Wang, T., & Wang, S. (2019). Tumor-derived exosomes, myeloid-derived suppressor cells, and tumor microenvironment. *J Hematol Oncol*, *12*(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0772-z>
- Tjin, E. P., Bende, R. J., Derksen, P. W., van Huijstee, A. P., Kataoka, H., Spaargaren, M., & Pals, S. T. (2005). Follicular dendritic cells catalyze hepatocyte growth factor (HGF) activation in the germinal center microenvironment by secreting the serine protease HGF activator. *J Immunol*, *175*(5), 2807-2813. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.2807>
- Townsend, E. C., Murakami, M. A., Christodoulou, A., Christie, A. L., Koster, J., DeSouza, T. A., Morgan, E. A., Kallgren, S. P., Liu, H. Y., Wu, S. C., Plana, O., Montero, J., Stevenson, K. E., Rao, P., Vadhi, R., Andreeff, M., Armand, P., Ballen, K. K., Barzaghi-Rinaudo, P., . . . Weinstock, D. M. (2016). The Public Repository of Xenografts Enables Discovery and Randomized Phase II-like Trials in Mice (vol 29, pg 574, 2016). *Cancer Cell*, *30*(1), 183-183. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.06.008>
- Tripodo, C., Gri, G., Piccaluga, P. P., Frossi, B., Guarnotta, C., Piconese, S., Franco, G., Vetri, V., Pucillo, C. E., Florena, A. M., Colombo, M. P., & Pileri, S. A. (2010). Mast Cells and Th17 Cells Contribute to the Lymphoma-Associated Pro-Inflammatory Microenvironment of Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma. *American Journal of Pathology*, *177*(2), 792-802. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091286>
- Vesela, P., Tonar, Z., Salek, D., Vokurka, S., Trneny, M., Kodet, R., Moulis, M., Kasparova, P., Vernerova, Z., Velenska, Z., Stritesky, J., Michal, M., & Boudova, L. (2014). Microvessel density of mantle cell lymphoma. A retrospective study of its prognostic role and the correlation with the Ki-67 and the mantle cell lymphoma international prognostic index in 177 cases. *Virchows Archiv*, *465*(5), 587-597. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1632-4>
- Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., Lichtor, T., Decker, W. K., Whelan, R. L., Kumara, H. M. C. S., Signori, E., Honoki, K., Georgakilas, A. G., Amin, A., Helferich, W. G., Boosani, C. S., Guha, G., Ciriolo, M. R., Chen, S., . . . Kwon, B. S. (2015). Immune evasion in cancer:

- Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S185-S198. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.004>
- Wang, J., Li, D. Y., Cang, H. X., & Guo, B. (2019). Crosstalk between cancer and immune cells: Role of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Medicine*, 8(10), 4709-4721. <https://doi.org/10.1002/cam4.2327>
- Wong, H. K., Mishra, A., Hake, T., & Porcu, P. (2011). Evolving Insights in the Pathogenesis and Therapy of Cutaneous T-cell lymphoma (Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome). *British Journal of Haematology*, 155(2), 150-166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08852.x>
- Woo, X. Y., Giordano, J., Srivastava, A., Zhao, Z. M., Lloyd, M. W., de Bruijn, R., Suh, Y. S., Patidar, R., Chen, L., Scherer, S., Bailey, M. H., Yang, C. H., Cortes-Sanchez, E., Xi, Y., Wang, J., Wickramasinghe, J., Kossenkov, A. V., Rebecca, V. W., Sun, H., . . . Eur, O. C. (2021). Conservation of copy number profiles during engraftment and passaging of patient-derived cancer xenografts. *Nat Genet*, 53(1), 86-99. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00750-6>
- Yang, Q. X., Pei, X. J., Tian, X. Y., Li, Y., & Li, Z. (2012). Secondary cutaneous Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma in a patient with angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a case report and review of literature. *Diagn Pathol*, 7, 7. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-7-7>
- Yang, Z. Z., Novak, A. J., Ziesmer, S. C., Witzig, T. E., & Ansell, S. M. (2009). Malignant B cells skew the balance of regulatory T cells and TH17 cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res*, 69(13), 5522-5530. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0266>
- Yu, B., Miao, Z. H., Jiang, Y., Li, M. H., Yang, N., Li, T., & Ding, J. (2009). c-Jun protects hypoxia-inducible factor-1alpha from degradation via its oxygen-dependent degradation domain in a nontranscriptional manner. *Cancer Res*, 69(19), 7704-7712. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0808>
- Zhang, L., Nomie, K., Zhang, H., Bell, T., Pham, L., Kadri, S., Segal, J., Li, S., Zhou, S., Santos, D., Richard, S., Sharma, S., Chen, W., Oriabure, O., Liu, Y., Huang, S., Guo, H., Chen, Z., Tao, W., . . . Wang, M. (2017). B-Cell Lymphoma Patient-Derived Xenograft Models Enable Drug Discovery and Are a Platform for Personalized Therapy. *Clin Cancer Res*, 23(15), 4212-4223. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2703>
- Zhao, W. L., Mourah, S., Mounier, N., Leboeuf, C., Daneshpouy, M. E., Legres, L., Meignin, V., Oksenhendler, E., Le Maignin, C., Calvo, F., Briere, J., Gisselbrecht, C., & Janin, A. (2004). Vascular endothelial growth factor-A is expressed both on lymphoma cells and endothelial cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related to lymphoma progression. *Laboratory Investigation*, 84(11), 1512-1519. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700145>
- Zhou, J., Nefedova, Y., Lei, A. H., & Gabrilovich, D. (2018). Neutrophils and PMN-MDSC: Their biological role and interaction with stromal cells. *Seminars in Immunology*, 35(C), 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.12.004>
- Zullo, K., Amengual, J. E., O'Connor, O. A., & Scotto, L. (2012). Murine models in mantle cell lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 25(2), 153-163. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2012.04.009>