



**עבודת גמר מחקרית**

הפקולטה לרפואה בגליל

אוניברסיטת בר אילן

הנושא בעברית:

**אפיון תאים וסמנים חיסוניים במיקרו-סביבה של חולים בלאוקמיה לימפוציטרית מסוג B ובחינת הקשר בינם לבין סמנים קליניים ותאיים למהלך המחלה**

הנושא באנגלית:

***Characterization of immune cells in the micro-environment of patients with B cell chronic lymphocytic leukemia and their correlation to clinical and cellular markers of disease prognosis***

עבודת גמר לשם מילוי חלקי של הדרישות לקבלת התואר "דוקטור לרפואה"

מאת התלמיד/ה:

שם פרטי בעברית:	משה	שם משפחה בעברית:	מייזלס
שם פרטי באנגלית:	MOSHE	שם משפחה באנגלית:	MAIZELS

בהנחיית:

שמות המנחים : ד"ר אנדריי בראשטר חתימת וחותמת המנחה/ים \_\_\_\_\_

ד"ר דוד אזולאי

מחלקה : המטולוגיה

ביה"ח : גליל מערבי, נהריה

הוגשה לוועדת עבודות גמר בתאריך:

תאריך :



**תוכן עניינים:**

3.....תקציר

5.....תקציר באנגלית

7.....רקע מדעי

11.....חומרים ושיטות

12.....תוצאות

20.....דיון וסיכום

23.....רשימת ספרות

## תקציר

**מבוא:** לאוקמיה לימפוציטרית כרונית של תאי B (B-CLL) היא המחלה הלימפופרוליפרטיבית הנפוצה ביותר במדינות המערב. המחלה נחשבה בעבר כמחלה עצלה (אינדולנתית) עם תוחלת חיים ארוכה של בין 10 ל-20 שנים. כיום ידוע כי פרוגנוזה טובה מתקיימת בפחות מ-30% מהחולים וחלקם אף סובלים ממחלה דוהרת ומתים לאחר כשנתיים עד שלוש מהאבחנה. קביעת שלב (stage) המחלה מתבסס כיום על שיקול של ממצאי בדיקה גופנית ותוצאות ספירת דם. בדיקה זאת אינה מדויקת מספיק ויכולה לפספס חולים בהם המחלה אגרסיבית יותר, לכן ישנו צורך במציאת סמנים קליניים ומעבדתיים נוספים שיוכלו לבדל את קבוצות החולים הללו בכדי לטפל בהם בהתאם. תאי הדם הממאירים באים באינטראקציה עם תאי חיסון במיקרו-סביבה שלהם בלשד העצם, בדם ההיקפי ובקשרי הלימפה. הבנת ההשפעה שיש לתאי החיסון על תאי ה-B הסרטניים ותרומתם בעיכוב או בהאצה של התפתחות הגידול הינה מטרה מחקרית כלל עולמית.

**השערת המחקר:** שכיחות תאים חיסוניים ומולקולות בעלות תפקיד חיסוני בדם יכולים להוות סמן עזר בקביעת שלב המחלה בחולים.

**מטרת העבודה:** בדיקת הקשר בין המדד RAI (אשר משלב מדדים קליניים ומעבדתיים) המקובל כיום לקביעת שלב המחלה לבין:

1. שכיחות אוכלוסיות תאי חיסון ייחודיות במיקרו-סביבה של תאי הגידול.
  2. ביטוי של מולקולות בעלות תפקיד בדיכוי חיסוני על פני התאים הסרטניים.
- שיטות המחקר:** השוואה רטרוספקטיבית של מידע רפואי שנאסף ותועד מחולים, בעת אבחנתם בלאוקמיה לימפוציטרית כרונית של תאי B, במכון ההמטולוגי. החולים סווגו לקבוצות ע"פ רמתו של המדד המקובל RAI

בין קבוצות חולים אלו בוצעה השוואה של:

1. המספר האבסולוטי של לימפוציטים מונוציטים וגרנולוציטים כפי שעלה מספירת התאים הכללית.
2. השכיחות היחסית של תאי חיסון מסוג :  
T-cells (CD3+, CD4-, CD8-),  $\gamma\delta$ , NKT-cells (CD3+/CD56+)
3. רמת הביטוי של מולקולות בעלות תפקיד בדיכוי חיסוני בתאי הגידול: LAIR-1, CD200.
4. ביטוי של מולקולות בעלות חשיבות פרוגנוסטית בתאי הגידול: CD38, ZAP70.

## תוצאות:

ראשית נציין כי הרמה RAI2 הוצאה מהנתונים בעקבות מיעוט חולים שהתייצגו ברמה זאת.



בהשוואה של הממד RAI לספירות התאים שביצענו מצאנו שישנה עלייה במספר האבסולוטי של לימפוציטים ב stage 4 בהשוואה לשאר הרמות. בבדיקה למול ספירה אבסולטית של מונוציטים וגרנולוציטים לא נמצאה מגמה ברורה שעולה מהנתונים.

בהשוואה של הממד הפרוגנוסטי RAI לשכיחות היחסית של התאים החיסוניים מצאנו כי ישנה עלייה בשכיחות היחסית של: T-cells (CD3+, CD4-,CD8-)  $\delta\gamma$  בין RAI 0 לבין RAI 1-4. כמו כן מצאנו כי ישנה ירידה בשכיחות היחסית של NKT-cells (CD3+/CD56+) בין RAI 0-1 לבין RAI 3-4. בהשוואה של הממד RAI לסמנים CD38, ZAP-70, CD200 ו-LAIR-1 לא נמצאה מגמה ברורה בין ה-stage השונים לבין הסמנים.

**מסקנות:** השינויים שמצאנו בשכיחות היחסית של NKT-cells ו-T-cells  $\delta\gamma$  בין שלבי המחלה הקליניים מעידים כי אוכלוסיות תאים חיסוניים אלו מעורבים בתהליכי הניטור החיסוני של B-CLL ובהתקדמות המחלה. מעקב פרוספקטיבי רחב על אוכלוסיות תאים אלו בחולים יעזור לבחון כיצד השינויים שמצאנו תורמים להתקדמות המחלה והאם ניתן להשתמש בהם כסמן ביולוגי תומך בקביעה מדויקת יותר של שלבי המחלה הקליניים.

**מילות מפתח (key words):**

- סמנים פרוגנוסטיים
- tumor immunoediting
- תאי T  $\delta\gamma$
- תאי NKT

## Abstract

**Introduction:** Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common lymphoproliferative disorder of human adults in western countries. CLL is considered an indolent disease. However, in some patients the disease progress rapidly, leading to the patient death within two to three years from diagnosis. The determination of disease progression which is currently based on physical findings and a simple blood count has a limited accuracy. Therefore finding of new clinical and laboratory markers which can help to determine patients with more aggressive disease are needed. Hematopoietic malignant cells interact with immune cells in their microenvironment in the blood, bone marrow and within the lymph nodes. Understanding the effects of the immune cells on the malignant B cells and its contribution to CLL disease progression has become a global research interest.

**Hypothesis:** incidences of immune cell subsets and expression of immunosuppressive molecules in blood stream may serve as a biomarker for patients staging.

**Objectives:** to examine the relationship between the excepted RAI staging system, which include clinical and laboratory findings, and:

1. Incidences of unique immune cell subsets in the tumor microenvironment.
2. Expression of molecules with immunosuppressive function on the tumor cells.

**Research methods:** a retrospective analysis of medical records, which have been documented and assembled from B-CLL patients at diagnosis in the Hematology unit of the Western Galilee Medical Center. The patients were classified and grouped according to the accepted RAI staging tool, and compared for their:

1. Absolute lymphocytes, monocytes, and granulocytes counts as recorded by complete blood cell counter (CBC).
2. Relative incidence of the immune cell subsets:  $\alpha\beta$  T-cells (CD3+, CD4+ or CD8+),  $\gamma\delta$  T-cells (CD3+, CD4-, CD8-) and NKT-cells (CD3+/CD56+).
3. Expression level of the immune inhibitory molecules: CD200 and LAIR-1 in tumor cells.
4. Expression of prognostic valuable markers in tumor cells: CD38 and ZAP70.



**Results:** first we should declare that patients group with RAI 2 were excluded from the study due to insufficient number of patients that we found with this disease stage. Comparison of CBC between the RAI groups, showed an increase in the absolute lymphocytes count in RAI 4 as compared to RAI 0-3. No differences were found in the absolute count of monocytes and granulocytes between patient's groups. Comparison of the relative incidences of the immune cells subsets between the RAI groups, revealed an increase in:  $\gamma\delta$  T-cells (CD3+, CD4-, CD8-) between RAI 0 and RAI 1-4 and a decrease of NKT-cells (CD3+/CD56+) between RAI 0-1 to RAI 3-4. No differences in the expression levels of CD38, ZAP-70, CD200, and LAIR-1 were found between the RAI groups.

**Conclusions:** The alterations in the relative incidences of NKT-cells and  $\gamma\delta$  T-cells that we found indicate their involvement in the immune surveillance of B-CLL. Further research in wide prospective cohort is needed to expose the exact function of NKT-cells and  $\gamma\delta$  T-cells in disease progression and as a supportive biomarker for setting accurate clinical staging for the disease.

## רקע מדעי

לאוקמיה לימפוציטרית כרונית של תאי B (B-CLL) הינה לויקמיה עצלה מקבוצת Non-Hodgkin אשר נחשבת קרובה מבחינה תאית וקלינית למחלת ה Small Lymphocytic Lymphoma. מחלת B-CLL שכיחה יותר בגברים, כאשר היחס נשים/גברים הוא 1 ל 1.7 בהתאמה. שכיחות המחלה בקרב אוכלוסיית ארה"ב היא 6.75 ו 3.65 ל 100,000 בגברים ונשים בהתאמה. מחלת B-CLL נפוצה יותר במבוגרים, כאשר גיל הממוצע באבחנה עומד על 70. עם זאת מחלה זו אינה נדירה באוכלוסייה הצעירה יותר שם הגיל הממוצע באבחנה עומד על 30-39 שנה [1]. גורמים גנטיים או סביבתיים התורמים באופן ישיר להתפתחות מחלה זו אינם ידועים. מחלת B-CLL נחשבת כבעלת פרוגנוזה טובה עם הישרדות גבוהה המוערכת בין 10 ל 20 שנה. ברם ישנם חולים בהם צורת המחלה אגרסיבית יותר ומובילה לתמותת החולה כשנה או שנתיים מזמן האבחנה [2]. על כן, ישנה חשיבות רבה לאיתור סמנים פרוגנוסטיים שיוכלו לנבא את חומרת המחלה בעת האבחנה ובכך לתת מענה טיפולי מותאם יותר לאוכלוסייה שנמצאת בסיכון לפתח מחלה מתקדמת.

קביעת פרוגנוזה למחלת B-CLL מתבצעת ע"י אחת משתי השיטות הבאות: **1. BINET** **2. RAI**. שתי השיטות מקובלות ומשתמשות באותן מדדים לקביעת הפרוגנוזה וההבדל הינו בשיטת הניקוד. במחקרנו השתמשנו ב- RAI ע"פ המקובל במכון ההמטולוגי. מבחינה היסטורית עד 1970 לא נמצאו מדדים אמנים שבאמצעותם יכלו לסווג את חומרת המחלה והטיפול ניתן בצורה אמפירית. באותן שנים פרסמו Boggs ועמיתיו אנליזה על מספר רב של חולים ב- CLL [3] וראו שחולים ששרדו פחות מ-5 שנים הראו עדות לעומס לימפואידי רב יותר (עדות להגדלת בלוטות או טחול או כבד ואבנורמליות בספירת דם). מיד לאחר מכן פרסמו Galton [4] ו-Dameshek [5] ממצאיהם שהובילו להבנת הפתופיסיולוגיה של מחלת CLL. מהממצאים עלה כי במחלה ישנה הצטברות פרוגרסיבית של לימפוציטים שתפקודם לקוי ושקצב ומידת התפשטותם קשורה לחומרה ולפרוגנוזה המחלה. ממצאים אלו חוזקו ע"י תצפיותיו של Hansen [6] שבחן מספר רב של חולים ובאמצעותם Rai פיתח את שיטת הניקוד שלו [7]. תפיסתו של RAI מבוססת על ההנחה שההסתמנות הראשונה של התפשטות התאים הפתולוגיים תופיע בדם, לאחר מכן תהיה עדות בבלוטות לימפה, טחול וכבד ולבסוף תהיה עדות לכשל של מח העצם.

### שיטת ניקוד RAI

RAI 0 – לימפוציטוזיס, ללא עדות ללימפאדנופתיה, ללא הגדלה של כבד או טחול, ללא אנמיה או טרומבוציטופניה.

RAI 1 – לימפוציטוזיס עם לימפאדנופתיה.

RAI 2 – לימפוציטוזיס עם הגדלת כבד או טחול.

RAI 3 – לימפוציטוזיס עם אנמיה.

RAI 4 – לימפוציטוזיס עם טרומבוציטופניה.

### פרוגנוזה לפי Rai (תוחלת חיים במספר חודשים)

Stage 0 – 150 חודשים.

Stage 1 – 101 חודשים.

Stage 2 – 71 חודשים.

Stage 3 – 19 חודשים.

Stage 4 – 19 חודשים.

האבחנה של B-CLL מתבססת כיום בעיקר על אפיון תאים באמצעות Flow cytometry. נוכחות תאי B-CLL בדם ההיקפי, במח העצם או בקשרי הלימפה ניתנת על פי רוב לאיתור על פי ביטוי הסמנים:  $CD19^+$ ,  $CD20^+$ ,  $CD5^+$ ,  $CD23^+$ . כיום ישנם מספר סמנים המבוטאים ע"י התאים הסרטניים המצויים במתאם לחומרת המחלה הניתנים לזיהוי וכימות באמצעות flow cytometry:

**Zap-70**: הינו טירוזין קינאז שמבוטא באופן נורמלי על תאי NK ו-T [8]. הוא אינו מבוטא באופן תקין על פני תאים לימפוציטריים מסוג B, אבל הוא נמצא על פני תאים אלו בחלק מחולי CLL. נמצא כי ישנו קשר חזק בין ביטוי של zap-70 ומצב בו השרשרת העבה המשתנה לא נושאת מוטציה (IgVH mutation status) [9]. מוטציה על השרשרת העבה המשתנה מוגדרת כשינוי של 2 אחוזים ברצף הנוקליאוטידים בהשוואה לשורת הנבט. נמצא כי בתאים אשר נמצאת המוטציה ביטוי המחלה פחות אלים והפרוגנוזה טובה יותר בעוד חולים שלהם אין את המוטציה סובלים מתחלואה קצרה וסיכוי גבוה יותר של חזרת המחלה לאחר טיפול. כיום אין מדד חתך שמחלק את הפרוגנוזה לפי ביטוי zap-70, אבל עליה בביטוי הסמן קשורה בפרוגנוזה רעה [10].

**CD38**: הינו גליקופורטאין המבוטא על פני שטח תאי ה B החשוב ברגולציה של סידן תוך תאי והפעלה של התאים [11]. ביטוי מוגבר בתאי CLL קשורה לפרוגנוזה רעה באופן בלתי תלוי במוטציה בשרשרת העבה המשתנה [12].

כמו בכל סוג של התפתחות תקינה של תאי דם גם תאי דם ממאירים באים באינטראקציה עם תאי חיסון במיקרו סביבה שלהם בלשד העצם, בדם ההיקפי ובקשרי הלימפה. קיימת מגמה מחקרית כלל עולמית שמטרתה להבין את מכלול הקשרים ודרכי הפעולה המתקיימים בין התאים הממאירים לתאים החיסוניים במיקרוסביבה שלהם. חקר מנגנונים אלו יוכלו אולי לשמש בסיס לאבחון ולגילוי טיפולים חדשניים המבוססים על חיזוק הפעילות האנטי סרטנית. על מנת שגידול סרטני יוכל לשגשג ולהתפתח עליו להתחמק מהמערכת החיסונית אשר יודעת בבסיסה לזהות תאים ממאירים ולנטרלם. יכולת זו של מערכת החיסון נחקרה במשך שנים רבות. מחקרים שונים, שבוצעו גם במודלים של



גידולים בעכברים וגם בגידולים בבני אדם, מוכיחים שסוגים מסוימים של תאי מערכת חיסון, מולקולות אפקטוריות ומסלולים חיסוניים שונים יכולים לגרום לדיכוי ולעיכוב הגידול [13]. למערכת החיסון שלושה תפקידים עיקריים בהתמודדות עם גידול. ראשית, הגנה מפני הידבקות ויראלית ומניעת תהליך גידולי שמונע מהדבקה. שנית, חיסול פתוגנים ורזולוציה של סביבה דלקתית אשר מעודדת התפתחות גידולית. שלישית, זיהוי וחיסול ממוקד של התאים הסרטניים. התהליך האחרון מכונה - tumor immune surveillance. כיום המונח אינו בשימוש מכיוון שגם במצב בו מערכת החיסון מתפקדת ישנם תאים סרטניים שמסוגלים לחמוק ממנה ולכן המונח המקובל כיום הינו immunoediting והוא מתאר את תפקוד מערכת החיסון לצד התפתחות הגידול [14]. בתהליך ישנם שלושה שלבים בהם הגידול עובר עד לשלב בו הוא מצליח לחמוק ממערכת החיסון:

1. Designated elimination

2. Equilibrium

3. Escape. [15]

מערכת החיסון מורכבת ממספר אוכלוסיות תאים שמשתתפים בהתמודדות כנגד הגידול הסרטני. בין אותן אוכלוסיות נתמקד בשתיים שנחקרו פחות: 1. NKT cells 2.  $\gamma\delta$  T cells

**NKT cells**: זוהי אוכלוסיה של תאי T נושאי רצפטור מסוג TCR אשר להבדיל מתאי T קונבנציונליים הם מזהים ליפידים ולא פפטידים. נמצא כי תאים אלו משחקים תפקיד גם כתאים משפעלים וגם כתאים רגולטוריים במחלות אוטואימוניות וזיהומיות. במחלות סרטניות מצאו שתי תת

**Type 2 NKT** .2

**type 1 NKT** .1

האוכלוסיה הראשונה (type 1 NKT) מפרישה Interferon gamma ( $\text{IFN}\gamma$ ) אשר באמצעותו משפעלת את תאי NK ואת תאי  $\text{CD8}^+$  T בצורה ישירה. בדרך עקיפה תאי NKT מבצעים קישור לתאים דנדריטים ע"י קישור הליגנד  $\text{CD40L}$  שעל פני התא לקולטן  $\text{CD40}$  שעל פני תא הדנדריט ובכך גורם לאקטיבציה של תא הדנדריט ושחרור של  $\text{IL-12}$  אשר מגביר מצידו את שיחרור  $\text{IFN}\gamma$  ו- $\text{IL-2}$  מתא  $\text{NKT type 1}$  וגורם לאקטיבציה של תאי  $\text{NK}$ ,  $\text{CD8}^+$  ומאקרופגים כנגד הגידול. האוכלוסייה השנייה (Type 2 NKT) משחררת בעת הפעלתה  $\text{IL-13}$  שמצידו גורם לתאים המיאולואידיים לשחרר  $\text{TGF-}\beta$  אשר מעקב את הפעלת תאי  $\text{CD8}^+$  T ובכך מעקב את הפעלת מערכת החיסון כנגד הגידול. עוד נמצא כי שתי האוכלוסיות השונות משפיעות אחת על השנייה, וכי תאי NKT מגיבים במהרה לסביבה ולכן שליטה ברמתם עלולה להיות קריטית להתפתחות המחלה [16]. בעזרת ההבנה של המערכת החיסונית ודרכי התמודדותה עם מחלת הסרטן אנו יכולים לפתח שיטות אימונוטרפיות להפעלת המערכת החיסונית כנגד תאי הגידול. בבדיקות מעבדה בחולי B-CLL נמצא כי לתאי  $\text{NKT}$  ו-  $\text{NK}$

ישנו גם תפקיד ציטוטוקסי כנגד תאי הגידול וכי ניתן להרחיב את אוכלוסיות התאים הנ"ל כאופציה טיפולית [17].

**$\gamma\delta$  T cells**: אוכלוסיית תאים שנחקרה מעט, מהווה כ-2-5% מכלל התאים הלימפוציטריים באופן נורמלי באדם הבוגר. ממחקרים חדשים עולה כי תאים אלו בעלי יכולת ציטוטקסית כנגד תאי גידול, ההפעלה שלהם מבוצעת ע"י TCR (T cell antigen receptor) בתת אוכלוסיה אחת וע"י fas-fasL interactions בתת אוכלוסיה אחרת. במחקר בו הצליחו לבודד תתי אוכלוסיות הראו שישנה תת אוכלוסיה שנקראת GDTc-V $\delta$ 1 ולה יכולת ציטוטקסית כנגד תאי B-CLL. מחקר שבדק תאי T  $\gamma\delta$  בחולי B-CLL והשווה עם אנשים בריאים מצא כי ישנה התרחבות של שתי תת אוכלוסיות: 1. V $\delta$ 3 בכ-10% מהמקרים 2. V $\delta$ 1 בכ-60% מהמקרים. ההתרחבות לפי מחקר זה הייתה משמעותית יותר בחולים RAI STAGES 3/4 [18].

כאמור תאי הגידול משפיעים גם הם מצידם על יכולת הזיהוי שלהם ע"י מערכת החיסון. נמצא שתאי הגידול מבטאים מולקולות שלהן תפקיד במיסוך או עיכוב תגובה חיסונית שיכולה לפעול כנגדם. בין המולקולות הללו ניתן למצוא בתאי CLL ביטוי של:

**CD200**: גליקופורטאין השייך למשפחת האימונוגלובולינים. נמצא כי ביטוי מוגבר שלו מעקב את פעילות התאים המיאלואידיים ותאי NK כנגד התאים הסרטניים [19] וכי ישנו עתיד בפיתוח נוגדים כנגד המולקולה כטיפול במחלה [20].

**LAIR-1**: הינו רצפטור שנמצא על פני הממברנה של תאים שונים ובניהם תאי B. הוא מכיל טירוזין-קינאז ציטופלסמתי אשר מוביל לדפוספורילציה של קינאזות שונות אשר בהיעדרו אותן קינאזות עובדות בצורה מוגברת. נמצא כי במחלה דוהרת אין ביטוי שלו על פני התאים הממאירים בעוד באנשים בריאים ישנו ביטוי על פני תאי B [21].

במחקר שלנו אנו נבחן את הסביבה החיסונית בחולי לאוקמיה לימפוציטרית מסוג B ונעקוב אחר הקשר בין השינויים ברמתם לבין השינויים בשלבי המחלה השונים כפי שניתן לאפיינם ע"פ המדד המקובל RAI .



## חומרים ושיטות

סוג המחקר הוא תיאורי, תצפיתי, רטרוספטיבי. המחקר התבסס על מידע הקיים בתיקים רפואיים של חולים שהיו במעקב במכון ההמטולוגי של בית חולים גליל מערבי. המקרים שנבחרו נאספו ממטופלים אשר אובחנו כחולים ב-B-CLL ע"י הקליניקה שלהם ועל פי אפיון התאים הממאירים ב-Flow cytometry.

## משתנים

1. מין החולים
2. מספר תאים אבסולוטי של לימפוציטים, מונוציטים וגרנולוציטים בדם.
3. שכיחות (אחוז) התאים הפתולוגיים (CD19+/CD5+) מכלל התאים הלימפוציטריים.
4. סוג השרשרת הקלה בתאים הפתולוגיים (LAMBDA או KAPPA)
5. עוצמת הביטוי (גבוהה, בינונית וחלשה) של הסמנים: CD38, CD200, Zap70, LAIR-1 בתאי הגידול.
6. שכיחות (אחוז) תתי אוכלוסיות התאים: CD3+/CD4+, CD3+/CD8+, CD3+/CD56+, CD3+/CD4-/CD8-  $\gamma\delta$  T cells, NKT cells.

## שיטות סטטיסטיות

במחקר השתמשנו בסטטיסטיקה תיאורית, אספנו נתונים לכל רמת RAI ובחנו את התפלגות הנתונים בכל רמה כאשר השתמשנו להשוואה ב-Kruskal-Wallis Test. במחקר בדקנו מדדי חתך משמעותיים ולמטרה זאת איחדנו קבוצות RAI שונות על מנת לקבל מובהקות ובמקרים אלו השתמשנו ב-Mann-Whitney Test.

## תוצאות

### פירוט ממצאי המחקר:

המחקר הקיף מידע שהצטבר מתיקים של 54 מטופלים שאובחנו ב- B-CLL, מהם 27 גברים ו-27 נשים. במחקר חילקנו את המטופלים ל-5 קבוצות לפי חומרת מחלה שנמדדה לפי מדד RAI (רמות 0-4, כאשר 0 הינה מחלה קלה והשאר מייצגות מחלה מתקדמת בהתאם). הרמה RAI=2 הושמטה מהמחקר מכיוון שלא נמצאו מספר תיקים סטטיסטי מינימלי. מתוך המשתתפים 33 היו בעלי תאים פתולוגיים נושאי שרשרת KAPPA ו-19 נושאי שרשרת LAMBDA. יחס  $K/L = 1.73$ . (נתוני החולים ע"פ הרמות מרוכזים בטבלה 1).

בהשוואות שערכנו בין מדד RAI לבין ספירת התאים נמצא כי ישנה עלייה בספירה הלבנה שעיקרה נובעת מהעלייה בספירה האבסולוטית של לימפוציטים בין הרמות 0 עד 3 לבין רמה 4 (טבלה 2 ואיור 1). בהשוואה שביצענו בין הספירה האבסולוטית של התאים המונוציטים וגרנולוציטים לא מצאנו שינויים שקשורים עם התקדמות המחלה (איור 2 ואיור 3 בהתאמה). בהשוואה שערכנו בין מדד RAI לבין הסמנים CD38 ו- ZAP70 לא מצאנו קשר בין ביטוי הסמנים והתקדמות המחלה. בהשוואה שערכנו בין מדד RAI לבין הסמנים LAIR-1 ו- CD200 לא מצאנו קשר בין הופעת הסמנים והתקדמות המחלה. בהשוואה שערכנו בין מדד RAI לבין שכיחות תת אוכלוסיית התאים החיסוניים  $\delta$  T-cells מצאנו כי ישנו קשר שמתבטא בעלייה של תאים אלו עם התקדמות המחלה כאשר ישנו חתך בין שלב חומרת מחלה 0 RAI לבין שלבי המחלה 1-4 RAI (טבלה 3 ואיור 4). בהשוואה שערכנו בין מדד RAI לבין שכיחות תת אוכלוסיית התאים החיסוניים NKT נמצא כי ישנה ירידה ברמות תאי NKT עם התקדמות המחלה שבאה לידי ביטוי בין חומרת מחלה 0-1 RAI לחומרת מחלה 3-4 RAI (טבלה 4 ואיור 4).

**הצגה טבלאית של הנתונים**

**טבלה 01: חלוקת המדדים שנאספו לפי רמות RAI השונות.**

משתנים	RAI 0	RAI 1	RAI 3	RAI 4
N	19	13	10	10
גברים	10	9	6	4
נשים	9	4	4	6
KAPPA	14	8	5	6
LAMBDA	5	5	5	4
WBC	23646	28233	28065	61892
Lymp absolute	14315	15522	20416	44385
Gran absolute	6792	10374	4421	6007
Mono absolute	888	1652	775	1509
CD38%	10	19.23	27.77	10
CD200%	100	100	100	100
LAIR-1%	27	44.44	21.42	75
ZAP70%	25	0	37.5	0
CD3 %	22.98	30.33	28.04	15.12
CD3+/CD4+ %	63.92	52.9	62.73	54.74
CD3+/CD8+ %	32.48	41.14	31.42	40.83
CD3+/CD56+%	10.53	11.66	11.66	6.03
CD4-/CD8-%	2.86	5.27	5.11	4.65

**טבלה 02:** עלייה בספירה האבסולוטית של WBC בקבוצת החולים עם רמת RAI4 לעומת קבוצת החולים עם רמות RAI0-3, העלייה נובעת מעלייה במספר הלימפוציטים.

Descriptive Statistics				
RAI		N	Mean	Std. Deviation
0-3	WBC	42	26118.5714	28402.26172
	abs lymph	42	16141.8430	23401.54458
	abs mono	42	1097.6652	1549.04451
	abs gran	42	7337.0555	9235.51656
	Valid N (listwise)	42		
4	WBC	10	61892.0000*	66311.92683
	abs lymph	10	44385.2890**	44189.42344
	abs mono	10	1509.9875	2134.67134
	abs gran	10	6007.3260	2985.08891
	Valid N (listwise)	10		

Test Statistics <sup>a</sup>				
	WBC	abs lymph	abs mono	abs gran
Mann-Whitney U	121.000	117.500	202.500	200.000
Wilcoxon W	1024.000	1020.500	257.500	255.000
Z	-2.067	-2.148	-.174	-.232
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.39	.032	.862	.816

\* ה**בדל ברמת מובהקות של 0.039**.

\*\* ה**בדל ברמת מובהקות של 0.032**.



**טבלה 03:** עלייה בשכיחות תאי T δγ (CD4-\CD8-) בקבוצות החולים עם רמות RAI 1-4 לעומת קבוצת החולים עם רמת RAI 0.

Descriptive Statistics				
Std. Deviation	Mean	N		
6.60812	10.5389	18	CD3+CD56+	RAI 0
1.76043	2.8632	19	CD4-\CD8-	
		18	Valid N (listwise)	
5.80836	8.2187	32	CD3+CD56+	RAI 1-4
3.16107	5.0364*	33	CD4-\CD8-	
		32	Valid N (listwise)	

Test Statistics<sup>a</sup>

CD4-\CD8-	CD56	
185.500	226.000	Mann-Whitney U
375.500	754.000	Wilcoxon W
-2.434	-1.253	Z
.015	.210	Asymp. Sig. (2-tailed)

\* **הבדל ברמת מובהקות של 0.015.**



**טבלה 04:** ירידה בשכיחות תאי NKT (CD3+/CD56+) בקבוצות החולים עם רמות RAI 3-4 לעומת קבוצות החולים עם רמות RAI 0-1.

Descriptive Statistics				
Std. Deviation	Mean	N		
6.33	10.99	30	CD3+CD56+	RAI 0-1
2.55	3.84	32	CD4-\CD8-	
		30	Valid N (listwise)	
4.64	6.15*	20	CD3+CD56+	RAI 3-4
3.39	4.88	20	CD4-\CD8-	
		20	Valid N (listwise)	

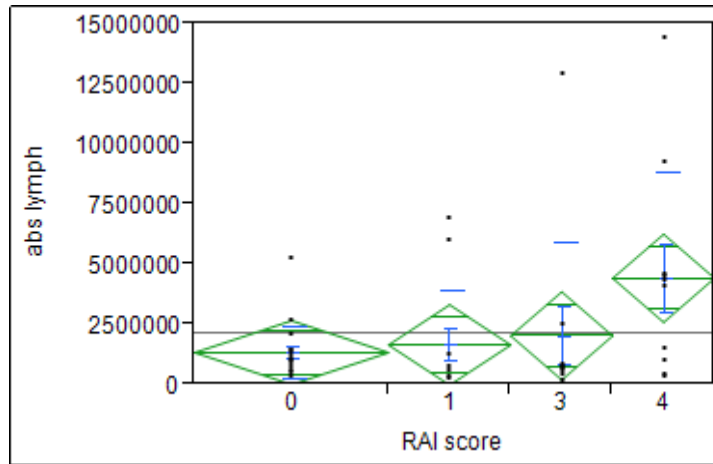
Test Statistics <sup>a</sup>		
CD4-\CD8-	CD3 +CD56+	
271.000	165.500	Mann-Whitney U
799.000	375.500	Wilcoxon W
-.922	-2.664	Z
.356	.008	Asymp. Sig. (2-tailed)

\*הבדל ברמת מובהקות של 0.008.



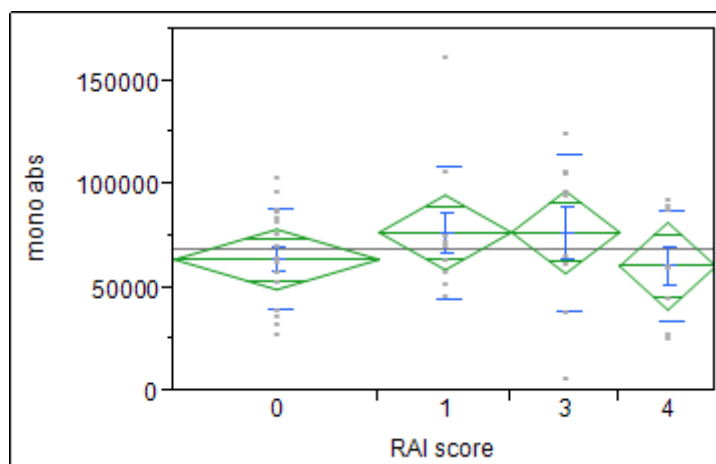
## הצגה גרפית של הנתונים

### 1. מספר אבסולוטי של לימפוציטים בקבוצות ה RAI



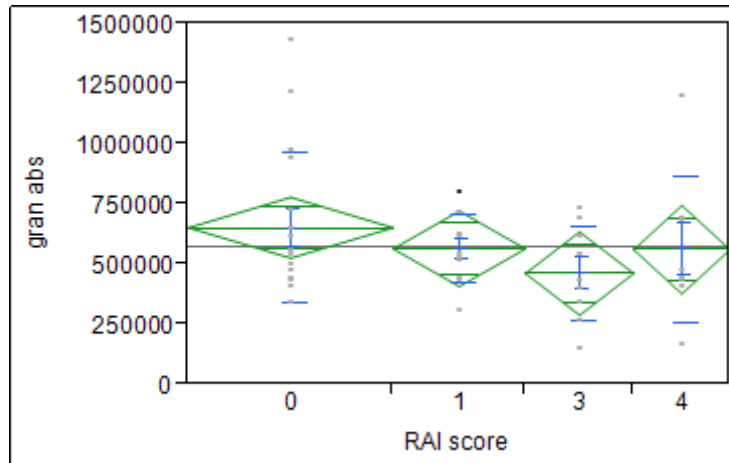
איור מס' 1: גרף המתאר את הקשר בין הספירה האבסולוטית של לימפוציטים עם התקדמות המחלה לפי מדד RAI. ניתן לראות ספירת לימפוציטים גבוהה ברמה RAI4 ביחס לרמות הנמוכות יותר.

### 2. מספר אבסולוטי של מונוציטים בקבוצות ה RAI



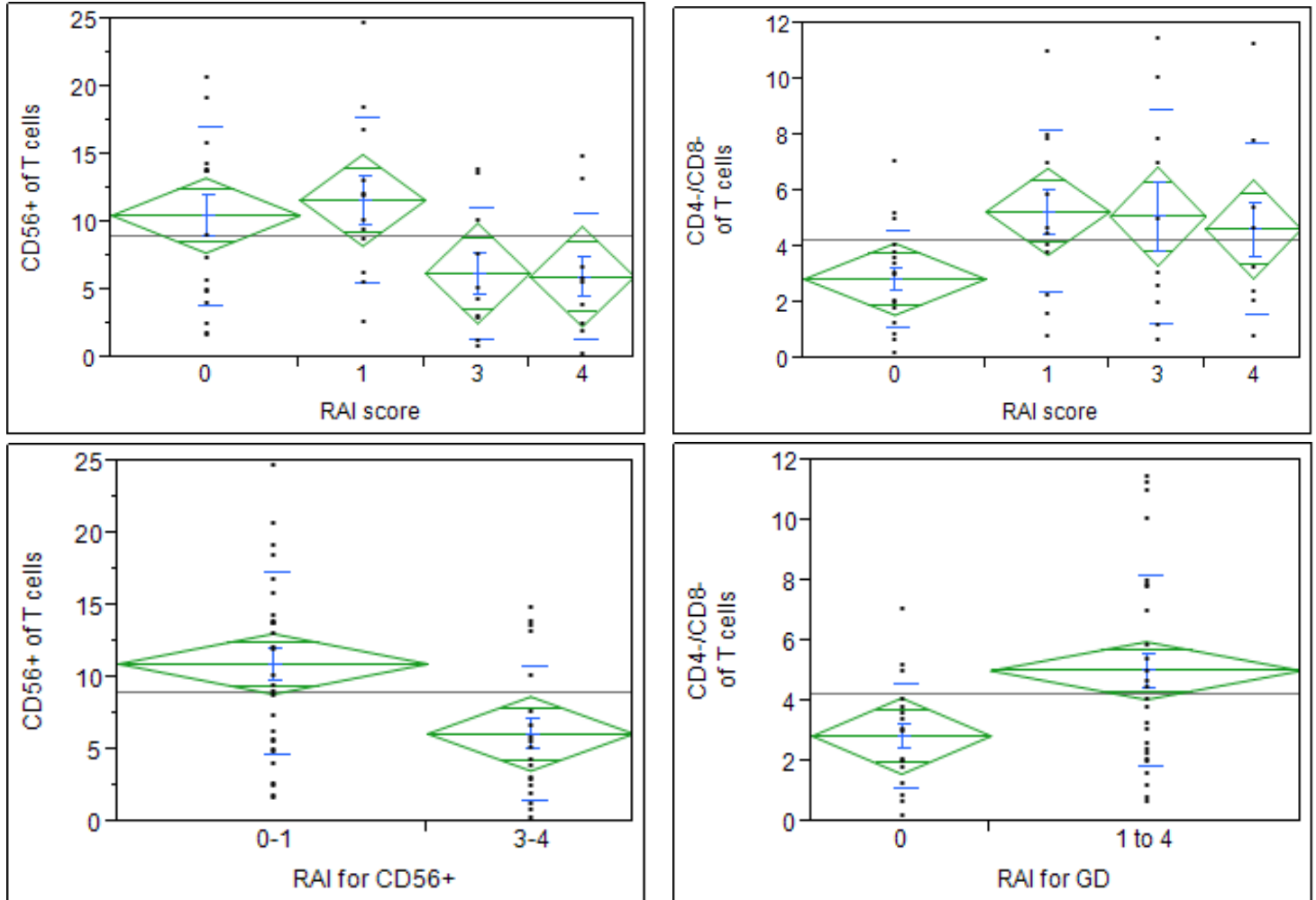
איור מס' 2: הגרף המתאר את השינוי ברמות האבסולוטיות של מונוציטים לאורך המחלה. ניתן לראות שאין מגמה ברורה בין רמות ה RAI השונות.

**3. מספר אבסולוטי של גרנולוציטים בקבוצות ה RAI**



איור מס' 3: הגרף המתאר את השינוי ברמות האבסולוטיות של גרנולוציטים לאורך המחלה. ניתן לראות שאין מגמה ברורה בין רמות RAI השונות.

**4. שכיחות NKT cells ו T-cells דע בדם בין בקבוצות ה RAI**



**איור מס' 4:** באיורים העליוניים ניתן לראות את הקשר שבין רמות תאי T דע (מימין) ו-NKT (משמאל) לבין חומרת המחלה לפי מדד RAI. באיורים התחתונים ניתן לראות את העלייה בשכיחות T cells דע כאשר מבצעים חתך בין רמה RAI0 לבין RAI1-4 (מימין) ואת הירידה בשכיחות NKT cells כאשר מבצעים חתך בין רמות RAI0-1 לבין RAI3-4 (משמאל).

## דיון וסיכום:

במחקר זה בדקנו האם ישנה קורלציה בין חומרת מחלת B-CLL כפי שנמדדה לפי המדד המקובל RAI לשכיחות של תתי אוכלוסיות ייחודיות של תאי חיסון ולרמת הביטוי של מולקולות בעלות תפקיד ידוע בדיכווי פעילות חיסונית בתאי המחלה.

במחקר נמצא כי ישנו קשר בין חומרת המחלה לפי המדד RAI לבין: 1. עלייה במספר האבסולוטי של תאים לבנים שמתוכם בולטת העלייה במספר האבסולוטי של לימפוציטים. 2. ירידה בשכיחות היחסית של תאי NKT 3. עלייה בשכיחות היחסית של תאי T $\gamma\delta$ .

בהשוואה של חומרת המחלה לספירת התאים הלבנים מצאנו כי עלייה זו נובעת בעיקרה מהעלייה ברמה האבסולוטית של לימפוציטים וזאת עם התקדמות המחלה כאשר ישנו חתך בין חומרת מחלה RAI 0-3 לבין RAI 4. ממצא זה מתיישב עם הבנת הפתופיסיולוגיה הבסיסית כי במחלה מצטברים תאים לימפוציטריים ממאירים בזרם הדם ובמח העצם. הצטברות התאים הממאירים במח העצם פוגעת בייצור הטסיות וכדוריות דם אדומות, דבר שבא לידי ביטוי באנמיה וטרומבוציטופניה המאפיינות את שלבי המחלה המתקדמים. מבחינה טיפולית אפשר להניח מהממצאים שיישנם חולים שהמחלה מתקדמת אצלם בעיקר בעקבות עומס לימפואידי וטיפולים אשר יצליחו להקטין את העומס יוכלו להאט את התקדמות המחלה ואולי להפוכה לכתונית. מבחינה פרוגנוסטית אמנם לימפוציטוזיס אבסולוטי נלקח בחישוב של שלב המחלה לפי RAI אבל הימצאותו ללא כל ממצא נוסף מסווגת את החולה בשלב RAI 1 שהינו שלב ראשוני כפי שהסברנו. על פי הממצאים שהתקבלו ייתכן וניתן יהיה לקבוע רמת חתך אשר תסווג חולים בעלי פוטנציאל למחלה דוהרת וזאת בהסתמך על גובה הספירה הלימפוציטרית בלבד ובכך נוכל לחסוך בדיקות לאותם חולים שמתייצגים עם ספירה אבסולוטית מעל אותו חתך, אך על מנת לאשש הנחה זאת יש לבצע מחקר פרוספקטיבי בנושא. עוד עולה מהמדידות כי מספר המונוציטים והגרנולוציטים אינו משתנה במהלך המחלה מבחינת פתופיסיולוגית המחלה ממצא זה יכול להעיד על קיום פקטורים שמופרשים ע"י התאים הממאירים אשר גורמים לדיכווי התפתחות טסיות וכדוריות דם באופן סלקטיבי. קיום והבנה של תהליך בו מתרחש הדיכווי יביא לשיטת טיפול חדשה שתמנע מהמחלה להתקדם לשלבים האלימים שלה. בבחינת רמות תאי NKT מצאנו כי בין חומרת מחלה RAI 0-1 לבין RAI 3-4 ישנה ירידה בשכיחות היחסית של התאים. ירידה ברמות היחסיות של תאי NKT עם התקדמות המחלה מהווה תמיכה בכך שאוכלוסיית תאים זו בעלת תפקיד חשוב במניעת ההתרבות של תאי המחלה והצטברותם במח העצם. עם זאת ברקע לעבודה הסברנו כי מוכרות אוכלוסיות של תאי NKT שהן אפקטוריות-ציטוטוקסיות ואוכלוסיות של תאי NKT רגולטוריות כאשר ע"י שפעולן הראשונה מנטרלת וממיתה את התאים הסרטנים בעוד האחרונה מדכאת את הפעלת מערכת החיסון כנגד הגידול [16]. במחקר שלנו לא בצענו מדידה

יחסית של 2 תת האוכלוסיות בעלות הפונקציה השונה ולכן איננו יכולים לשייך את הירידה הנצפית באופן ספציפי לאחת מאוכלוסיות תאים אלו. מבחינה פרוגנוסטית נדרש מחקר רחב יותר על-מנת לבסס את הממצא אך במידה וממצא זה יקבל חיזוק במחקרים נוספים הוא יוכל לשמש כמדד פרוגנוסטי במחלה גם ללא התחשבות בתת האוכלוסייה הספציפית שמהווה את השינוי במדידות. מבחינת הבנת תהליכי התקדמות המחלה אל מול רמות אותם תאים המחקר מחזק את התפיסה כי הדינמיקה בין מערכת החיסון לתאים הסרטנים מהווה את אחד המוקדים העיקריים ליכולת שלו להתקדם ולשגשג וטיפול שיתמקד בחיזוק המערכת החיסונית אל מול התא הסרטני יכול להוות נקודת מפנה בהתמודדות עם המחלה. אומנם מהמחקר אנחנו לא יודעים לשים את האצבע על תת האוכלוסייה הספציפית שאחראית על מניעת התקדמות המחלה אבל המגמה של התא אל מול מערכת החיסון ברורה. בכדי להבין את התהליכים בין תאי NKT לתאים הממאירים וגם על מנת לחדד את המדד ככלי פרוגנוסטי יש צורך במחקר רחב יותר שבו ייבחנו רמתם של 2 תת אוכלוסיות ה NKT באופן פרוספקטיבי בחולים משלב האבחנה ולאורך תקופת מעקב ארוכה. בבחינת רמות תאי T  $\delta\gamma$  לבין חומרת המחלה על פי מדד RAI מצאנו עליה ברמות היחסיות של תאים אלו בין חומרת המחלה RAI 0 לבין RAI 1-4. עליה זו מתיישבת עם ממצאים שהוצגו במחקרים אחרים שהראו כי לתאים אלו יש תפקיד ציטוטוקסי כנגד תאי הגידול [18] ואם ממצא זה יקבל תוקף במחקרים נוספים ניתן לנסות ולבנות מערך טיפולי כנגד המחלה שיתבסס על שגשוג אוכלוסיית תאים זאת אשר תוכל לזהות את התאים הסרטניים ולפעול כנגדם. מבחינה פתופיסיולוגית העלייה היחסית ברמות התאים בשלבים האלימים יותר של המחלה מרמזת אולי על תגובת מנע נוספת של מערכת החיסון שנועדה לבלום את התרבות התאים הסרטניים ואת פלישתם לבלוטות ולמח העצם אך למרות הממצאים ההנחה לגבי ההתמודדות של תאי T  $\delta\gamma$  למול התאים הסרטניים דורשת בדיקה מעמיקה מכיוון שהתרבות תאי הגידול על אף העלייה ברמה היחסית של התאים האנטי-סרטניים הללו מעלה שאלה לגבי האפשרות שהתאים הסרטניים מבטאים בנקודת זמן זאת מולקולות שלהן תפקיד בעיכוב ובמיסוך הזיהוי והתגובה של תאי T-cells  $\delta\gamma$  כנגד תאי הגידול כגון CD158b [22] ובכך ליצור פעולה הפוכה. מבחינה פרוגנוסטית מהמחקר שלנו עולה כי ניתן להשתמש ברמות תאי T  $\delta\gamma$  ככלי פרוגנוסטי נוסף שיוכל לסווג חולים ללא סמנים שמעידים על מחלה מתקדמת, אך יש צורך במחקרים מעמיקים ופרוספקטיביים שיבדקו את רמות תאי T  $\delta\gamma$  משלב ההבחנה ולאורך תקופת מעקב ארוכה. לסיכום, מהמחקר עולה כי רמות התאים במיקרו סביבה של חולי B-CLL יכולה לשמש כמדד שייסווג את התקדמות המחלה ואולי יוכל לאתר את אותם חולים שהמדדים הפרוגנוסטיים הנהוגים כיום (Binet/Rai) אינם מבחינים בחומרה האמתית של המחלה ובכך להעניק טיפול שונה לאותם חולים על פי קריטריונים חדשים שייקבעו. מההיבט הטיפולי, המחקר מחזק את ההבנה כי התפיסה



הטיפולית במחלת B-CLL, ואולי במחלות סרטניות נוספות, צריך להתמקד בשיפור ההתמודדות של מערכת החיסון כנגד התאים הממאירים דבר שעשוי להוות נקודת מפנה בהתפתחות המחלה ממחלה סופנית למחלה כרונית או אפילו מחלה שניתנת לריפוי, אך ראוי לציין כי נדרש מחקר רב ומעמיק בנושא שיכלול תת אוכלוסיות שונות גם מאותן אוכלוסיות שבדקנו במחקר וגם נוספות שלא נבדקו במחקר שלנו.

## רשימת ספרות

1. Kanti R RAI; Michael J; Keating. Epidemiology and clinical manifestations of chronic lymphocytic leukemia. Nov 2013. UpToDate.
2. Kanti R RAI; Michael J; Keating. Pathologic features, diagnosis, and differential diagnosis of chronic lymphocytic leukemia. Nov 2013. UpToDate.
3. Boggs DR, Sofferan SA, Wintrobe MM, Cartwright GE. Factors influencing the duration of survival of patients with chronic lymphocytic leukemia. Am J Med.1966;40:243–54. [[PubMed](#)].
4. Galton DAG. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. Can Med Assoc J.1966;94:1005–10. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)].
5. Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia: an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. Blood. 1967;29:566–584. [[PubMed](#)].
6. Hansen MM. Chronic lymphocytic leukaemia clinical studies based on 189 cases followed for a long time. Scand J Haematol Suppl. 1973;18:3–286. [[PubMed](#)].
7. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP. et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1975;46:219–34. [[PubMed](#)].
8. Colucci F, Schweighoffer E, Tomasello E, Turner M, Ortaldo JR, Vivier E, Tybulewicz VL, Di Santo JP. Natural cytotoxicity uncoupled from syk and ZAP-70 intracellular kinases. Nat Immunol. 2002 Mar;3(3):288-94. Epub 2002 Feb 11.

9. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, Zhao H, Ibbotson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003 Jun 15;101(12):4944-51. Epub 2003 Feb 20.
10. Dürig J, Nüchel H, Cremer M, Führer A, Halfmeyer K, Fandrey J, Möröy T, Klein-Hitpass L, Dührsen U. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2426-34.
11. Antonio, D. F; Elena, Z; Lucrezia, G; Luisa, F; Santina, B. Autocrine and Paracrine Calcium Signaling by the CD38/NAD<sup>+</sup>/Cyclic ADP-Ribose System. *Annals of the New York Academy of Sciences Volume 1028, Signal Transduction and Communication in Cancer Cells pages 176–191, December 2004.*
12. Malavasi F, Deaglio S, Damle R, Cutrona G, Ferrarini M, Chiorazzi N. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. *Blood*. 2011 Sep 29;118(13):3470-8. doi: 10.1182/blood-2011-06-275610. Epub 2011 Jul 15.
13. Swann, J. B.; Smyth, M. J. Immune surveillance of tumors. *Journal of Clinical Investigation*. 2007, May 1; 117(5): 1137–1146. DOI: 10.1172/JCI31405.  
[\[PubMed\]](#).



14. Dunn, G. P.; Bruce, A. T.; Ikeda, H.; Old, L.J.; Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*. 2002, Nov; 3(11):991-8. PMID: 12407406.
15. Dunn, G. P.; Old, L.J.; Schreiber, R. D. The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology*. 2004; 22:329-60. PMID: 15032581.
16. Masaki Terabe; Jay, A. Berzofsky. The Role of NKT Cells in Tumor Immunity. National institute of health, NIH Public Access Author Manuscript. *Adv Cancer Res*. 2008 ; 101: 277–348. doi:10.1016/S0065-230X(08)00408-9.
17. H, Guven; M, Gilljam; BJ, Chambers; HG, Ljunggren; B, Christensson; E, Kimbly; MS, Dilber. Expansion of natural killer (NK) and natural killer-like T (NKT)-cell populations derived from patients with B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a potential source for cellular immunotherapy. *Leukemia* (2003) 17, 1973–1980 & 2003 Nature Publishing Group All rights reserved 0887-6924/03.
18. Gabrielle M. Siegers. Anti-leukemia activity of human gamma delta T cells. *OncolImmunology* 1:2, 237–239; March/April 2012; G 2012 Landes Bioscience.
19. Coles, S. J.; Wang, E. C.; Man, S.; Hills, R. K.; Burnett, A. K.; Tonks, A.; Darley, R.L. CD200 expression suppresses natural killer cell function and directly inhibits patient anti-tumor response in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011, May; 25(5):792-9. DOI: 10.1038/leu.2011.1. PMID:21274000.



20. Kretz-Rommel, A.; Qin, F.; Dakappagari, N.; Ravey, E. P.; McWhirter, J.; Oltean, D.; Frederickson, S.; Maruyama, T.; Wild, M. A.; Nolan, M. J.; Wu, D.; Springhorn, J.; Bowdish, K. S. CD200 expression on tumor cells suppresses antitumor immunity: new approaches to cancer immunotherapy. *Journal of Immunology*. 2007, May 1; 178(9):5595-605. PMID: 17442942.
  
21. Poggi, A.; Catellani, S.; Bruzzone, A.; Caligaris-Cappio, F.; Gobbi, M.; Zocchi, M. R. Lack of the leukocyte-associated Ig-like receptor-1 expression in high-risk chronic lymphocytic leukaemia result in the absence of a negative signal regulating kinase activation and cell division. *Leukemia*. 2008, May; 22(5):980-8. DOI:10.1038/leu.2008.21
  
22. Dolstra, H; Fredrix, H; van der Meer, A; de Witte, T; Figdor, C; van de Winkel, J. TCR gamma delta cytotoxic T lymphocytes expressing the killer cell-inhibitory receptor p58.2 (CD158b) selectively lyse acute myeloid leukemia cells. *Bone Marrow Transplant*. 2001 May;27(10):1087-93. PMID:11438826.