



הצעה לעבודת גמר מחקרית:

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

**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 and response to therapy**

שם הסטודנט המגישה: משה מייזלס

מס׳ים/ת שנה ו' בשנה"ל: 2013-2014

שמות המנחים:

1. דר' אנדריי בראשטר

המחלקה: המטולוגיה ביה"ח: המרכז הרפואי לגליל

2. דר' דויד אזולאי

המחלקה: המטולוגיה ביה"ח: המרכז הרפואי לגליל

### 1. תקציר -

מבוא: לאוקמיה לימפוציטרית כרונית של תאי B (B-CLL) היא המחלה הלימפופרווליפרטיבית הנפוצה ביותר במדינות המערב. על מנת שגידול סרטני יוכל לשגשג ולהתפתח עליו להתחמק מהמערכת החיסונית אשר יודעת בבסיסה לזהות תאים ממאירים ולנטרלם. השערת המחקר: סוגי התאים החיסוניים ורמתם במיקרו-סביבה של חולי CLL מצויים במתאם למהלך המחלה ולאפקטיביות התגובה לטיפול. מטרות העבודה: במחקר זה נבדוק האם ישנו קשר בין מדדים קליניים ו או תאיים מקובלים המתארים את מהלך המחלה והתגובה לטיפול לבין אופים ורמתם של תאי חיסון מסוגים שונים במיקרו-סביבה של תאי הגידול. שיטות: הבדיקה הינה רטרופקטיבית והיא מבוצעת על מידע רפואי שנאסף ותועד מחולים בלאוקמיה לימפוציטרית כרונית של תאי B שטופלו במכון ההמטולוגי. במחקר זה נשווה בין השכיחות של תאי חיסון:  $\alpha\beta$  T-cells (CD3+, CD4+ or CD8+),  $\gamma\delta$  T-cells (CD3+, CD4-, CD8-), NK cells (CD3-/CD56+), NKT-cells CD3+/CD56+, Monocytes (CD64++ SSCdim), Immature Myeloid cells (CD64+ SSC high) ורמת הביטוי של מולקולות בעלות תפקיד חיסוני בתאי הגידול (CD200, LAIR-1) כפי שתועדו בתיקי החולים בעת האבחנה ובמהלך הטיפול לבין רמתם של המדד הקליני RAI והסמנים התאיים הבאים:

1. שכיחות תאי B (CD5+) מונוקלונליים מתוך אוכלוסיית התאים הלימפוציטרית.
2. אחוז ועוצמת הביטוי של CD38 בתאי B-CLL.
3. אחוז ועוצמת הביטוי של ZAP-70 בתאי B-CLL.

בחינת הקשר בין המדדים תתבצע באמצעות תוכנה סטטיסטית. תוצאות צפויות: אנו צופים כי יחס מוחלט גבוה בין תאים לימפוציטריים מסוג NK ו-T לבין התאים הסרטניים מעיד על פרוגנוזה טובה שכן בפועל הדבר מעיד על יכולת המערכת החיסונית להתמודד עם התאים הסרטניים. בנוסף אנו צופים גם כי התפלגות התאים  $\alpha\beta$  T-cells, NKT-cells, Monocytes, ו- $\gamma\delta$  T-cells בשילוב עם המולקולות CD200 ו LAIR-1 יהוו מדד לפרוגנוזה המחלה. חשיבות המחקר לרפואה: עבודה זו תרחיב את הבנתנו לגבי מנגנונים חיסוניים הקשורים במחלה ותהווה אולי אמצעי לסיווג והערכה מדויקים יותר של מהלך המחלה והתגובה לטיפול בחולים.

**Keywords:** B-CLL, immune environment, prognostic factors

## 2. מבוא -

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 39-30 שנה [1]. גורמים גנטיים או סביבתיים התורמים באופן ישיר להתפתחות מחלה זו אינם ידועים. 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:  $CD19^+$ ,  $CD20^+$ ,  $CD5^+$ ,  $CD23^+$ . במצבים מסוימים יש קושי באבחון עקב חוסר בביטוי אחד הסמנים האופייניים  $CD5$  ו  $CD23$ . מצב זה מקשה על אבחנה מבלדת בין B-CLL למחלות לימפופרווליפירטיביות אחרות מסוג Mantle Cell Lymphoma או Follicular Lymphoma. 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. כיום ישנם מספר סמנים המצויים במתאם לחומרת המחלה כגון  $CD200$ ,  $LAIR-1$ ,  $CD38$ ,  $zap-70$  ו- $IgVH$  mutation status, אך חשוב לציין כי חוזקם של הסמנים מוטל בספק מכיוון שישנם חולים אשר לא מבטאים את הסמנים ולמרות זאת המחלה דוהרת והפרוגנוזה רעה, ולכן חשוב למצוא סמנים נוספים שיוכלו לסווג את החולים במחלה ולאפשר לנו לבצע מעקב טוב יותר אחרי הטיפול.

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 [3]. למערכת החיסון שלושה תפקידים עיקריים בהתמודדות עם גידול. ראשית, הגנה מפני הידבקות ויראלית ומניעת תהליך גידולי שמונע מההדבקה. שנית, חיסול פתוגנים ורזולוציה של סביבה דלקתית אשר מעודדת התפתחות גידולית. שלישית, זיהוי וחסול 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 tumor immunoediting והוא מתאר את תפקוד מערכת החיסון לצד התפתחות הגידול [4]. בתהליך ישנם שלושה שלבים בהם הגידול עובר עד לשלב בו הוא מצליח לחמוק ממערכת החיסון:

1. Designated elimination

2. Equilibrium

3. Escape. [5].

מבין תאי מערכת החיסון נמצא כי תאי Natural Killers (NK) הינם התאים הראשונים בעלי יכולת לחסל תאים סרטניים. לתאים אלו ישנם מספר רצפטורים שמסוגלים לזהות תאים סרטניים ולפעול נגדם. בנוסף לתאים ישנם גם רצפטורים מדכאים אשר מסוגלים בין היתר לזהות מולקולה מסוג MHC1 ובכך למנוע פעילות כנגד תאים בריאים. באמצעות מערכת זאת של גורמים משפיעים מצד אחד וגורמים מדכאים מצד שני מסוגלים תאי NK להבדיל בין תאים בריאים ותאי גידול. במחקרים בחיות מעבדה נמצא כי תאים אלו בעלי תפקיד קריטי בהתמודדות עם גדילת הגידול הסרטני ויצירת גרורות [6]. בעת הפעלתו, תא NK ישחרר ציטוקינים וכימוקינים אשר יעודדו תגובה דלקתית שמפעילה תאים נוספים ממערכת החיסון כנגד הגידול ביניהם מונוציטים, תאים דנדריטים, גרנולוציטים ולימפוציטים.

כיום בין הכלים המעבדתיים שמשמשים להערכת פרוגנוזה המחלה נמצאים הסמנים zap-70, CD-38, CD-200, LAIR-1, Beta-2 microglobulin, IgVH mutation status -ו עליהם נפרט מיד. zap-70: הינו טירוזין קינאז שמבוטא באופן נורמלי על תאי NK ו-T. הוא אינו מבוטא באופן תקין על פני תאים לימפוציטריים מסוג B, אבל הוא נמצא על פני תאים אלו בחלק מחולי CLL ונמצא בקורלציה לתחלואה מהמחלה. כיום אין מדד חתך שמחלק את הפרוגנוזה לפי ביטוי zap-70, אבל עליה בביטוי הסמן קשורה בפרוגנוזה רעה. עוד נמצא כי ישנו קשר חזק בין ביטוי של zap-70 ומצב בו השרשרת העבה המשתנה לא נושאת מוטציה.

IgVH mutation status: מוטציה על השרשרת העבה המשתנה מוגדרת במחקרים 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.

CD38: עדות לנוכחותו קשורה לפרוגנוזה רעה, בתחילה חשבו שישנו מתאם בין אי הופעת המוטציה על השרשרת העבה המשתנה ונוכחותו, אך כיום הוא עומד כמרקר בפני עצמו ללא קורלציה לאי הופעת המוטציה בשרשרת העבה המשתנה.

Beta-2 microglobulin: נמצא כי רמות גבוהות שלו נמצאות בקורלציה לפרוגנוזה רעה [7].  
CD200: נמצא כי ביטוי מוגבר שלו מעקב את פעילות תאי NK כנגד התאים הסרטניים [8] וכי ישנו עתיד בפיתוח נוגדים כנגד המולקולה כטיפול במחלה הסרטנית [9].

LAIR-1: הינו רצפטור שנמצא על פני הממברנה של תאים שונים בינם 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 [10]. חשוב לציין שוב כי כיום ישנם חולים במחלה דוהרת אשר להם אין ביטוי של הסמנים הנ"ל ולכן חשוב למצוא סמנים נוספים שיוכלו לשמש למעקב אחר החולים ויעילות הטיפול שהם מקבלים.

באוניברסיטה אוביאדו בספרד בוצע מחקר קוהורט שנפרש על פני 10 שנים ובו השתתפו 256 חולים ב-CLL. במחקר בדקו האם ישנה חשיבות פרוגנוסטית לכמות תאי T ו-NK באותם חולים בעת האבחנה. באותו מחקר נמצא כי איפיון התפלגות התאים בסביבה החיסונית יכול לשמש לנו ככלי פרוגנוסטי נוסף להתקדמות המחלה. כאשר אנו בוחנים את התפלגות מערכת החיסון בחולה במחלת B-CLL נמצא כי ישנה עליה באוכלוסיית תאי T ותאי NK, כמו כן נמצא כי ב-39.7% מהחולים היחס בין תאי CD4 ו-CD8 התהפך. במדידת הרמה היחסית של התאים הלימפוציטריים [T/NK cells:Malignant monoclonal B-cells ratio] נמצא כי רמות יחסיות גבוהות של התאים הלימפוציטריים נמצאות בקורלציה לפרוגנוזה טובה של המחלה [11]. המחקרים שבדקו את הסביבה החיסונית בחולי לאוקמיה לימפוציטרית מסוג B ומצאו שישנו קשר בין הסביבה החיסונית לבין פרוגנוזת המחלה לא התייחסו לתאי T מסוג גאמה דלתא ( $\delta$ ). תאי חיסון יחודיים אלו הינם תת קבוצה של תאים לימפוציטרים מסוג T. הם נמצאים בכמויות קטנות בפריפריה, (כ- 2-5% מכלל תאי T), אבל הם שכיחים באיברים בעלי מוקוזה כגון דופן המעי. מיקומם האנטומי מעיד על חשיבותם במודולציה של מערכת החיסון עקב היותם במגע ראשוני עם הגורם הפתוגני. עוד נמצא כי בעלי יכולת ציטוליתית, כי הם משתתפים בתגובה אוטואימונית, תגובה כנגד מזיהמים וגידולים [12]. נמצא כי חלק מהיכולת של תאים אלו להתמודד עם תאים סרטניים נמצא בתת קבוצה שנקראת Vdelta T cells, שהם תאים אשר מסוגלים לזהות את המולקולות MHC class 1 chain related molecules, A and B and UL-16-binding proteins, מולקולות אשר נמצא ביטוי שלהן ברמות משתנות על פני תאים סרטניים אפיתיליים, חלק מהלוקמיות וחלק מהלימפומות. [13]. במחקר שלנו אנו נבחן את

הסביבה החיסונית בחולי לאוקמיה לימפוציטרית מסוג B ובדוק האם ישנם מדדי חתך והתפלגויות בתאי מערכת החיסון באותם חולים שיוכלו לשמש לנו ככלי פרוגנוסטי לאותם חולים. כלים פרוגנוסטיים נוספים שיימצאו חשובים למעקב אחר יעילות הטיפול בכלל החולים וחשוב במיוחד באיתור אותם חולים בהם המחלה דוהרת אבל לא הופיעו בהם הסמנים הנהוגים כיום.

### 3. השערות המחקר -

- מערכת החיסון יודעת לזהות ולחסל תאים סרטניים.
- תאי הגידול מפתחים יכולת לחמוק ממערכת החיסון ובכך מאפשרים התקדמות ושיגשוג של המחלה הממארת.
- במצב בו התאים הסרטניים פיתחו יכולת לגבור על המערכת החיסונית אופי התאים באותה סביבה יהיה שונה מאשר במצב בו המערכת החיסונית עדיין מהווה חסם להתקדמות המחלה.
- בחינת הסביבה החיסונית בחולי לויקמיה לימפוציטרית מסוג B תוכל לסווג את פרוגנוזת המחלה ובכך לשמש ככלי איבחוני לחולים בהם המחלה דוהרת ובנוסף תשמש למעקב אחר יעילות הטיפול.

### 4. משמעות העבודה -

על ידי בדיקת הפרמטרים השונים בסביבה החיסונית של חולי לאוקמיה לימפוציטרית כרונית של תאי B נוכל לאתר את אותה תת קבוצה אשר בה המחלה מתקדמת מהר יותר משאר החולים והסמנים הנהוגים כיום לא הופיעו בה ובכך להתאים גישה טיפולית שונה לחולים אלו. בנוסף מציאת מדדים נוספים לחומרת המחלה תאפשר מעקב טוב יותר על הצלחת הטיפול שהחולה מקבל.

### 5. שיטות המחקר -

- המחקר יתבצע בצורה תצפיתית (סקר), באופן רטרוספקטיבי, אשר ייבנה על מידע רפואי קיים מתיקים של חולים אשר אובחנו באשפוזם כחולים בלאוקמיה לימפוציטרית כרונית של תאי B.
- המידע ייאסף על החולים בעת האבחנה ובמהלך הטיפול.

- מבין כל החולים ייבחרו החולים שלהם נאספו הסמנים האימונוהיסטוכימיים zap-70 , CD38 , LAIR-1 ו-CD200.
- מהחולים הללו נאסוף נתונים על התפלגות התאים החיסונים בדם ההיקפי ונשווה למדדים הפרוגנוסטיים שנהוגים כיום. אנחנו נשתמש בשיטת הניקוד על שם RAI לצורך המחקר.

### סטטיסטיקה ומשתנים

- המשתנים העיקריים במסגרת המחקר יהיו חולים בלאוקמיה לימפוציטרית כרונית של תאי B שלהם נאספו הסמנים האימונוהיסטוכימיים zap-70 , CD38 , LAIR-1 ו-CD200. לאותם חולים נאסוף נתונים לגבי כמות התאים  $\alpha\beta$  T-cells (CD3+, CD4/CD8),  $\gamma\delta$  T-cells , NK cells (CD3-/CD56+), NKT-cells CD3+/CD56+ , Monocytes (CD64++ SSCdim) , Immature Myeloid cells (CD64+ SSC high) במחקר נאסוף נתונים מכ-50 חולים.

לצורך הניתוח הסטטיסטי נשתמש במבחן לא פרמטרי, מבחן Kruskal-Wallis H, עם רמת מובהקות של 5%. במחקר עצמו נחלק את אוכלוסיות המחקר ל-5 קבוצות אשר מייצגות את חומרת המחלה, כפי שנהוג בשיטת RAI. לכל קבוצה נבצע ניתוח של המשתנים שצוינו בפסקה הקודמת ונחפש האם ישנה קורלציה בין חומרת המחלה לבין המצאות והתפלגות התאים והסמנים שנלקחו. על מנת לקבל מובהקות סטטיסטית עלינו לאסוף נתונים מ-7 מטופלים לפחות לכל קבוצה בעלת דירוג RAI זהה. מכיוון שאיננו יודעים כעת האם ישנם 7 מטופלים לפחות לכל קבוצה ייתכן כי חלק מהרמות לא תילקחנה בחשבון.

### היבטים אתיים

העבודה הוגשה לוועדת הלסינקי וקיבלה אישור.

### 6. חלקו המעשי של הבוגר בביצוע העבודה –

- סקירה ספרותית.
- כתיבת הצעה לעבודת גמר.
- כתיבת בקשה לוועדת הלסינקי, קבלת אישור למחקר.
- זיהוי חולים המתאימים להכללה במחקר.



- איסוף הנתונים מתיקי החולים.
- עיבוד הנתונים.
- כתיבת העבודה.



## .7 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. 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1857231>
4. 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407406>
5. 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032581>
6. Wu, J.; Lanier, L. L. *Natural killer cells and cancer*. Advances in Cancer Research. 2003; 90:127-56. PMID:14710949. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14710949>
7. Kanti R Rai; Michael J Keating. Staging and prognosis of chronic lymphocytic leukemia. Oct 2013. UpToDate.
8. 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3093357/> [Epub 2011, Jan 28].
9. 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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442942>
10. 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 <http://web.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=08876924&AN=32004624&h=UKkFTTrLklrgZMaFzeIIOWk3eDMSj8qcdMNurzWjMJesUz5GpNFDzEB%2b69LPyHg2JWr%2bHLQaMN9AOw1x2lswQKA%3d%3d&crI=c>
11. Gonzalez-Rodriguez, A. P.; Contesti, J.; Huergo-Zapico, L.; Lopez-Soto, A.; Fernández-Guizán, A.; Acebes-Huerta, A.; Gonzalez-Huerta, A. J.; Gonzalez, E.; Fernandez-Alvarez, C.; Gonzalez, S. *Prognostic significance of CD8 and CD4 T cells in chronic lymphocytic*. Leukemia&Lymphoma. 2010, Oct.; 51(10): 1829-1836. ISSN 1042-8194 print/ISSN 1029-2403. DOI: 10.3109/10428194.2010.503820. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20846097>
12. Marquez-Medina, D.; Salla-Fortuny, J.; Salud-Salvia, A. *Role of gamma-delta T-cells in cancer: another opening door to immunotherapy*. Clinical&Translational Oncology. 2012, Dec; 14(12):891-5. DOI: 10.1007/s12094-012-0935-7. PMID: 23054752. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23054752> [Epub 2012, Oct 2.].
13. Kabelitz, D.; Wesch, D.; He, W. *Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology*. Cancer Research. 2007, Jan 1; 67(1):5-8. PMID:17210676. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/1/5.long>