

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „CAROL DAVILA”,
BUCUREȘTI
DOMENIUL MEDICINĂ**



**MICROMEDIUL CELULEI MALIGNNE B DIN LEUCEMIA
LIMFOCITARĂ CRONICĂ CORELAȚII CU FACTORI DE
PROGNOSTIC ȘI CONDUITA TERAPEUTICĂ - ROLUL CELULELOR T
DE REGLEMENTARE**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. ANA-MARIA VLĂDĂREANU**

**Doctorand:
ENE ELENA-GEORGIANA**

ANUL

2021

Cuprins

Abrevieri	5
Introducere	8
I. Stadiul actual al cunoașterii	11
1. Micromediul celulei B din LLC.....	12
1.1. Micromediul tumoral descriere	12
1.2. Micromediul leucemiei limfocitare cronice.....	13
2. Celulele T de reglementare.....	25
2.1. Descrierea celulelor T de reglementare.....	25
2.2 Celulele T de reglementare și leucemia limfocitară cronică.....	31
2.3 Biomarkerii și micromediul LLC.....	34
3. Conduita terapeutică.....	45
3.1 Celulele T de reglementare și terapiile medicamentoase.....	45
3.2 Rolul mecanismelor terapeutice asupra celulelor Treg.....	48
II. Contribuția personală	59
1. Obiective generale.....	60
2. Materiale și metode.....	61
2.1. Tipul studiului.....	61
2.2. Criterii de includere.....	61
2.3. Criterii de excludere.....	62
2.4. Protocolul de studiu.....	62
3. Prelucrarea statistică a datelor.....	67
4. Analiza generală a lotului de pacienți studiați.....	69
4.1. Aspecte clinice generale.....	69
4.1.1 Sex	69
4.1.2. Vârsta.....	70
4.1.3. Stadializare.....	71
4.1.4 Deces.....	74
4.2. Aspecte clinice particulare.....	74
4.2.1 Distribuția lotului de pacienți în funcție de sex, stadiul Rai și vârstă.....	75
4.2.2 Distribuția lotului în funcție de vârstă comparativ cu stadiul Rai și grupa de risc.....	77

4.2.3 Aspecte terapeutice.....	80
4.2.4 Factorii de prognostic actuali.....	83
5. STUDIUL 1.....	89
5.1 Evaluarea celulelor T de reglementare caracterizate prin expresia CD25high, corelație cu valorilor IL-2, status IGVH, stadiul Rai și linii terapeutice.....	90
5.2 Evaluarea celulelor T de reglementare caracterizate prin expresia FoxP3, Helios, corelație cu stadiul Rai, linii terapeutice și status IGHV.....	97
5.3Evaluarea celulelor T de reglementare caracterizate prin expresia fenotipică CD4+CD39+, corelație cu stadiul Rai și terapie.....	104
5.4 Evaluarea celulelor T de reglementare prin prisma populației limfocitare T CD și CD8.....	111
6. STUDIUL 2.....	119
6.1 Evaluarea subseturilor limfocitare T funcționale	120
6.2 Studierea unei corelații între subseturile limfocitare T funcționale și stadiul Rai.....	126
6.3 Studierea unei corelații între subseturile limfocitare T funcționale și conduită terapeutică.....	135
6.4 Studierea unei corelații între subseturile limfocitare T funcționale și statusul IGHV.....	146
6.5 Studierea unei corelații între subseturile limfocitare T funcționale și factorul de prognostic CD38.....	150
6.6 Studierea unei corelații între subseturile limfocitare T funcționale și expresia markerului CD57.....	154
6.7 Studierea unei corelații între subseturile limfocitare T funcționale și expresia markerilor CD57 și CD39.....	159
7. Discuții generale.....	163
7.1 Discuții studiul 1.....	166
7.2 Discuții studiul 2.....	170
8. Concluzii generale	174
Bibliografie.....	178
Anexe.....	

INTRODUCERE

În ultimii ani înțelegerea și modularea micromediului tumoral (MT) a fost obiectivul unui interes științific și clinic intens studiat. Rolurile celulelor imunosupresoare printre care celulele T de reglementare sau regulatorii (Tregs) și celulele supresoare derivate din celule stem mioeloide (MDSCs) au fost investigate în ceea ce privește suprimarea răspunsurilor imunitare specifice tumorilor și stabilirea unui micromediu tumoral imunosupresiv.¹

Impactul importanței micromediului tumoral și al Treg-urilor în biologia neoplaziilor hematologice este reflectat asupra oportunităților terapeutice și beneficiilor clinice. Reintegrarea în mare măsură a răspunsurilor imunitare antitumorale fără afectarea echilibrului normal al celulelor T homeostatice va duce la beneficii clinice vitale pacienților hemato-oncologici.

Celulele Treg joacă un rol indispensabil în menținerea homeostaziei imune și în exercitarea activităților supresive, sistemul imunitar fiind în principal mediat de celule T și B.² Marea majoritate a studiilor arată că frecvența și funcția supresivă a Treg-urilor sunt crescute la pacienții oncologici în comparație cu subiecții sănătoși.³ Semnificația prognostică a acestei subpopulații celulare este încă o chestiune de dezbatere, deoarece în general Treg-urile prezic rezultate nefavorabile la pacienții cu cancer, însă unele rapoarte au arătat că un număr crescut de celule T regulatorii se pot asocia cu un prognostic mai bun.^{3,4}

Rolul celulelor T în patogeneza leucemiei limfocitare cronice a câștigat recent o atenție deosebită datorită interacțiunii constante dintre celulele B neoplazice cu substratul micromediului și celulele T. Datele din literatură sugerează că interdependența dintre celulele B leucemice, componentele extracelulare ale micromediului și celulele T modulează cursul clinic al bolii și fiziopatologia, în principal prin reglarea expansiunii, supraviețuirii și diferențierii celulelor B LLC. Important este și faptul că aceste interacțiuni pot produce modificări calitative și cantitative în ceea ce privește numărul, funcția și fenotipul celulelor T normale, influențând astfel capacitatea sistemului imun la pacienții cu LLC.⁵ Adesea există un număr relativ mare de celule T regulatorii în țesuturile limfoide ale pacienților cu LLC, în acest caz acestea ar putea afecta funcția imună normală.⁶

În această lucrare ne vom concentra pe studierea celulelor Treg asociate tumorilor maligne hematologice în mod deosebit cele asociate leucemiei limfocitare cronice, prin prisma mecanismelor care stau la baza stabilității și supraviețuirii lor și a modului prin care acestea nu sunt identificate de strategiile terapeutice. De asemenea, vom discuta abordările terapeutice curente care pot influența funcția Treg și provocările dezvoltării de noi strategii care vizează în mod selectiv Treg-urile.

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. MICROMEDIUL CELULEI B DIN LEUCEMIA LIMFOCITARĂ CRONICĂ

1.1 Micromediul tumoral descriere

Micromediul tumoral este constituit din o multitudine de factori, cum ar fi celulele stromale auxiliare, celule T care favorizează expansiunea tumorii și rezistența ei la tratament și celulele sanguine maligne care se află într-o relație de interdependență cu semnalele din micromediul.

O ipoteză interesantă și care merită menționată, în ceea ce privește micromediul neoplaziilor hematologice este cea a lui **Jan A. Burger și colaboratorii**⁷ care argumentează teoria celor trei tipare, primul model susține teoria interconectării cu rețeaua micromediului, cel de-al doilea model mediul disfuncțional, iar ce de-al treilea model descrie o coexistență amicală și stabilă a celulelor maligne cu micromediul.

1.2 Micromediul leucemiei limfocitare cronice

Leucemia limfocitară cronică este un prototip de boală malignă care nu depinde doar de defectele genetice intrinseci, ci este susținută și prin interacțiunile pe care le are cu celulele spectatoare din nișele micromediului.^{8,10} În multe dintre neoplaziile cu celule B micromediul conferă un avantaj în ceea ce privește creșterea și supraviețuirea prelungită a celulelor B maligne. În leucemia limfocitară cronică, se pot puncta trei probleme:

1. dacă micromediul favorizează dezvoltarea bolii sau progresia ei, sau este implicat în ambele evenimente
2. identificarea și definirea elementelor din micromediul care influențează clona malignă și căile moleculare relevante
3. clarificarea modului în care micromediul afectează relațiile, proliferarea celulară și supraviețuirea lor prelungită.^{9,10}

2. CELULE T DE REGLEMENTARE

2.1 Descrierea celulelor T de reglementare

În ciuda progreselor realizate până acum, în ceea ce privește înțelegerea modului în care celulele Treg funcționează, multe aspecte ale interacțiunilor lor cu tumora și alte celule imune sau non-imune rămân obscure. Celulele T regulatorii constituie o sub-populație de dimensiuni reduse a celulelor T CD4+, care reprezintă circa 1-4% din limfocitele CD4+ circulante umane.³ Celulele T regulatorii cuprind subseturi de celule cu însușiri distincte atât fenotipice cât și funcționale care

ajută la evadarea tumorii din sistemul imunitar gazdă. În timpul diferitelor etape de dezvoltare ale celulelor B, celulele T sunt capabile să controleze soarta celulei B astfel: o poate distruge, poate să promoveze supraviețuirea celulei B prin reglarea mecanismelor anti-apoptotice sau poate să inducă proliferarea acesteia.²

2.2 Celulele T de reglementare și leucemia limfocitară cronică

Anormalitățile care răsar în subseturile de celulele T pot fi asociate cu progresia leucemiei limfocitare cronice. Astfel un număr crescut de celulele T de memorie CD4 pot să ajute la atingerea mai multor aptitudini ale celulelor B LLC, adică mai multe semnale de supraviețuire și proliferare. Prin urmare, înțelegerea și descoperirea acestor mecanisme ar putea duce la o îmbunătățire asupra informațiilor de prognostic și abordărilor terapeutice în LLC.^{5,10} În plus, a fost descrisă o corelație între numărul crescut de celule Treg și caracteristicile clinico-biologice și prognosticul negativ în LLC.^{3,10} Procentul de Treg-uri în LLC este foarte variabil, iar atunci când se ia în calcul numărul absolut, s-a observat că numărul de celule Treg este semnificativ crescut în LLC în comparație cu donatorii sănătoși.³

2.3 Biomarkerii și micromediul LLC

Deși în primul rând evenimentele genetice inițiale sunt considerate responsabile pentru etapa inițială de transformare neoplazică, totuși dezvoltarea și progresia clonei de LLC se consideră a fi afectate de diversele semnale existente în micromediu care reglează și promovează proliferarea și supraviețuirea celulelor maligne B. În timpul acestor procese, alte anomalii pot să apară după leziunea genetică inițială, iar aceste anomalii noi pot include, de exemplu mutațiile somatice ale TP53 sau cele mai recente NOTCH1, SF3B1, MYD88 și/sau alte leziuni încă neidentificate care permit o semnalizare mai eficientă prin BCR sau alte căi, sensibilitate crescută la citokine sau chemokine sau un trafic mai eficient la locurile anatomice, transformând celulele LLC în celule cu un fenotip mai agresiv.¹¹⁻¹⁶

Piatra de temelie în ceea ce privește prognosticul LLC sunt sistemele clinice de stadializare dezvoltate de Rai și Binet, însă indicatori suplimentari sunt disponibili pentru a preconiza prognosticul LLC, în special în primele etape ale bolii, iar printre aceștia se numără markeri serici (microglobulina β 2, timidin kinaza, CD23 solubil), markeri celulari (CD38, ZAP70) și parametrii genetici care includ anomaliile citogenetice și statusul mutațional al genelor IGHV.

3. CONDUITA TERAPEUTICĂ

3.1 Celulele T de reglementare și terapiile medicamentoase

Celulele T de reglementare reprezintă o țintă terapeutică atractivă în terapia imună antitumorală. Chimioterapia tradițională și imunoterapiile clinic eficiente, nu sunt specifice Treg-urile dar sunt capabile să limiteze funcția și proliferarea lor. Dezvoltarea terapiilor care modulează Treg intratumorale poate oferi oportunitatea de a identifica mecanisme specifice tumorale în cadrul micromediului. Un interes deosebit a fost arătat rezistenței celulelor T de reglementare sau sensibilității lor la terapiile hemato-oncologice.

3.2 Rolul mecanismelor terapeutice asupra celulelor Treg

În LLC tratamentul cu fludarabină, ciclofosamidă, talidomidă sau lenalidomidă a fost raportat că subminează funcția supresivă și diminuează frecvența celulelor Treg la acești pacienți, sugerând că eficacitatea acestor terapii se poate datora, cel puțin parțial, efectelor pe care le exercită asupra Treg-urilor.¹⁷⁻¹⁹ Controlul LLC în epoca chimio-imunoterapiei a fost puternic corelat cu calitatea și profunzimea remisiunii. Insuccesul de a obține cel puțin un răspuns parțial după tratamentul R-FC, are un prognostic dezastruos în rândul pacienților, în special la cei care prezintă risc genetic crescut.²⁰

Țintirea celulelor T regulatorii cu chimioterapie reprezintă o abordare generală și neselectivă, astfel încât ar fi necesară schimbarea cu o alternativă terapeutică mai specifică celulelor Treg și mai precisă.

II. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Obiective generale

Obiectivul acestei lucrări a fost de a aborda acele aspecte esențiale ale funcției celulelor Treg, care să ofere o perspectivă asupra importanței celulelor T de reglementare în dezvoltarea leucemiei limfocitare cronice și a progresului său. Un alt obiectiv este monitorizarea: activității celulelor Treg umane în LLC, perspectiva utilizării lor ca biomarkeri de progresie pentru LLC și ca ținte terapeutice în LLC.

Consider că tema de cercetare este una de actualitate în Hematologie și că poate aduce informații utile în adoptarea strategiei terapeutice individualizate și în stratificarea pacienților pe categorii de risc.

Obiectivele acestui studiu analitic au fost reprezentate de următoarele:

- Analiza unui lot de pacienți diagnosticați cu LLC, pe baza unui algoritm de diagnostic ce include parametri clinici, biologici, morfologici, imunofenotipici, imunohistochimici și genetici
- Tipul studiului: caz-martor
- Identificarea markerilor bioumorali și genetici cu valoare prognostică în LLC

- Stratificarea pacienților cu LLC pe categorii de risc, în funcție de factorii de prognostic
- Stabilirea rolului factorilor de prognostic în aprecierea evoluției clinice a bolii
- Stabilirea rolului biomarkerilor în estimarea răspunsului la tratament
- Compararea semnificațiilor prognostice a markerilor identificați (singuri sau în diverse combinații)
- Prin coroborarea markerilor de prognostic s-ar putea încerca elaborarea unui sistem de scor prognostic, care să poată fi aplicat cu ușurință tuturor pacienților cu LLC și care să permită o estimare cât mai corectă privind modul de evoluție a bolii, tipul de răspuns la tratament, dar și atitudinea terapeutică optimă.

2. Materiale și metode

2.1. Tipul studiului

Studiile de tip caz-martor, au fost efectuate pe două loturi de pacienți care au cuprins 51 de pacienți, respectiv 28 de pacienți, diagnosticați cu Leucemie Limfocitară Cronică (conform criteriilor iwCLL 2008: limfocite B atipice CD5+, cu fenotip de LLC, > 5.000/ μ L), aflați în evidența Clinicii de Hematologie a Spitalului Universitar de Urgență București, în perioada octombrie 2013–noiembrie 2019.

În cadrul celor două studii, pacienții au fost evaluați clinic și paraclinic atât la momentul diagnosticului, dar și în dinamică, după tratamentul specific, până la momentul încheierii studiului, deces sau pierderea din evidență.

O abordare complexă și completă a pacientului a fost necesară pentru stabilirea diagnosticului care a înglobat examinarea clinică, evaluarea parametrilor biologici, analiza flowcitometrică și teste de biologie moleculară.

Pentru ambele loturi de pacienți, analiza citogenetică efectuată prin tehnica convențională dar și prin tehnica FISH a fost realizată și aduce informații prognostice importante.

2.2. Criterii de includere

Criteriile de includere în studiu pentru pacienții cu LLC au fost:

- Vârsta pacienților > 18 ani
- Consimțământul informat al pacientului
- Accesul la istoricul medical al pacientului
- Hemograma de la momentul diagnosticului și la momentul înrolării în doctorat
- Analiza imunofenotipică pentru confirmarea diagnosticului de LLC și aprecierea markerilor de prognostic (ZAP-70, CD38) pe platformele Beckman Coulter FC500 și CytoFlex

- Analiza imunofenotipică a celulelor T de reglementare: FoxP3, subseturile limfocitare T
- Analiza citogenetică convențională sau prin tehnica FISH

2.3. Criteriile de excludere

Criteriile de excludere din studiu au fost:

- Prezența altor cauze non-neoplazice responsabile de apariția unor anomalii hematologice asemănătoare: infecții, afecțiuni inflamatorii etc.
- Refuzul pacientului de a fi inclus în studiu și monitorizat în dinamică
- Pacienții cu alte sindroame limfoproliferative cronice decât LLC, cu excepția Limfomului limfocitic cu celulă mică (SLL) conform clasificărilor REAL și WHO.

2.4. Protocolul de studiu

Pentru fiecare caz studiat s-a întocmit o fișă de urmărire, apoi s-a întocmit o bază de date în Excel care a cuprins în jur de 50 de variabile. Am analizat un lot de pacienți diagnosticați cu LLC, la care am studiat prin imunofenotipare celule T de reglementare și subseturile T.

Protocolul de studiu a inclus mai multe etape de evaluare:

1. **Datele de identificare a pacientului (sex, vârstă)** – informații preluate anamnestic și din foaia de observație ale pacienților spitalizați.
2. **Anamneză și examenul clinic** – din anamneză au fost reținute motivele internării sau prezentării în Clinica de Hematologie, antecedentele personale patologice, modalitatea de debut a bolii, simptomatologia la debut. La examenul clinic s-au urmărit: prezența adenopatiilor, a organomegaliei (splenomegalie, hepatomegalie), prezența sau absența simptomatologiei de tip B.
3. **Istoric de tratament chimioterapic:** pacienți fără expunere la chimioterapie anterior introducerii în studiu (**pacienți netratați**) și cel puțin o linie de chimioterapie la momentul înrolării (**pacienți tratați**)
4. **Parametri biologici** – analize uzuale de laborator (hemoleucogramă completă), receptorul solubil de IL-2 lucrat la un laborator privat prin metoda CLIA.
5. **Imunofenotiparea leucocitelor din sângele periferic**

În studiu imunofenotiparea pentru diagnostic a fost efectuată la toți pacienții, utilizând un flowcitolmetru cu 4 culori BD FACS Calibur(Cell QuestSoftware), produs de Becton Dickinson, dotat cu două lasere.

3. Prelucrarea statistică a datelor

Baza de date a fost întocmită pe baza fișelor efectuate pentru fiecare pacient în parte, cu introducerea datelor clinice, biologice și paraclinice ca variabile. Datele colectate au fost prelucrate

și interpretarea statistică a datelor obținute a fost realizată cu ajutorul *Microsoft Office Excel pentru Windows 2007*, *SPSS (Statistical Program for Social Sciences) versiunea 21.0 pentru Windows*, *EpiInfo 3.5.1*. O valoare $p < 0.05$ a fost considerată relevantă statistic.

4. ANALIZA GENERALĂ A LOTULUI DE PACIENȚI STUDIAȚI

4.1. Aspecte clinice generale

4.1.1 Sex

Analizând distribuția pe sex a lotului, s-a remarcat o preponderență a sexului masculin 67% (34 cazuri), față de 33% (17 cazuri) de sex feminin, raportul M/F este de 2, date similare cu cele raportate în literatura de specialitate, în care sex ratio M/F este de aproximativ 1,5.²¹(figura 1)

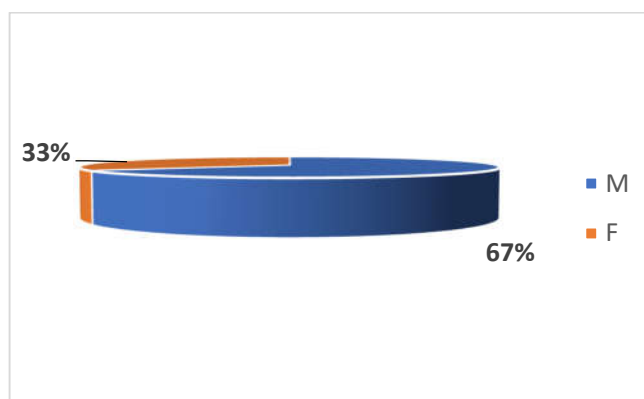


Figura 1: Reprezentarea grafică a distribuției pe sexe

4.1.2. Vârsta

Pacienții incluși în studiu, indiferent de stadiul bolii la momentul înrolării în studiu, au avut o vârstă medie de 65 de ani. Cea mai mică prevalență s-a înregistrat în rândul pacienților tineri, cu vârsta sub 50 ani, cunoscut fiind faptul că LLC este o boală a vârstnicului. Vârsta minimă la înrolare a fost de 39 ani, iar cea maximă de 90 ani.

4.1.3. Stadializare

Analizând distribuția conform stadializării Rai a pacienților din lot la momentul înrolării în studiu, s-a remarcat o preponderență a stadiului 0 Rai - 30%(15 cazuri) și a stadiului 4 Rai- 26% (13 cazuri) (figura 2). Stadiul 0 Rai are o abordare terapeutică de tipul „watch and wait” spre deosebire de stadiul IV Rai care prezintă indicație terapeutică obligatorie.

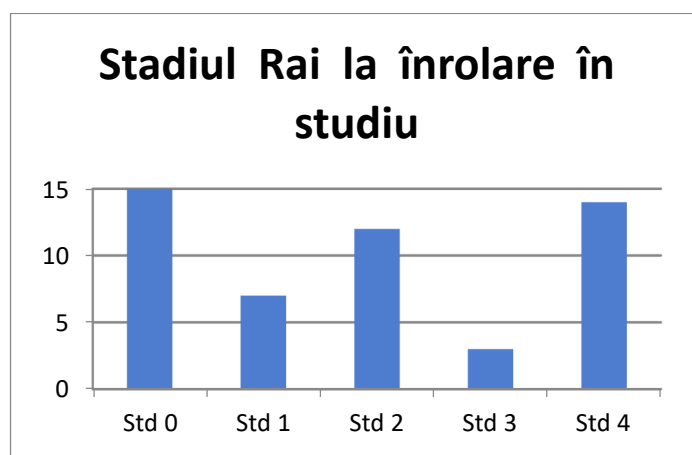


Figura 2: Reprezentare grafică stadializare Rai, la înrolarea în studiu.

4.1.4 Deces

Din numărul total de pacienți diagnosticați cu LLC, un singur pacient a decedat până la încheierea studiului. Cauza decesului a fost progresia de boală, pacientul având o evoluție a bolii de 6 ani, de la momentul diagnosticului.

4.2. Aspecte clinice particulare

Rolurile vârstei și ale sexului și relația lor cu alți factori de prognostic au fost studiate la cei 51 de pacienți cu LLC.

4.2.1 Distribuția lotului de pacienți în funcție de sex, stadiul Rai și vârstă

La momentul diagnosticului predomină stadiile Rai incipiente (0,1,2) cu o preponderență a sexului masculin pentru aceste forme incipiente însă fără semnificație statistică.

4.2.2 Distribuția lotului în funcție de vârstă comparativ cu stadiul Rai și grupa de risc

O serie de factori de prognostic influențează supraviețuirea în LLC, iar vârsta poate fi importantă în prezicerea prognosticului, cursul LLC fiind mai agresiv la pacienții tineri. Acest studiu a încercat să evalueze și puterea de prognostic a vârstei și sexului în LLC și relația cu ceilalți factori de prognostic.

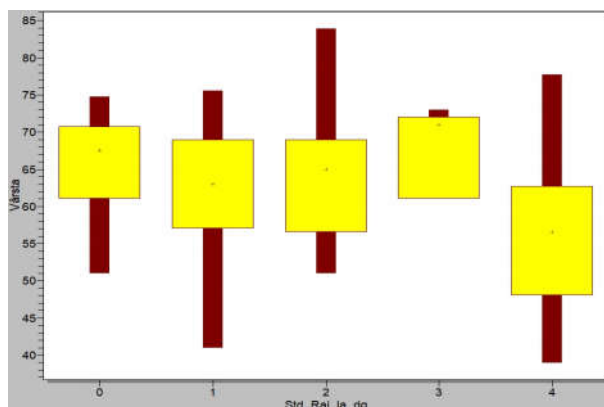


Figura 3. Reprezentare grafică vârsta medie versus stadiul Rai la momentul diagnosticului

Se poate observa că mediana de vârstă în lotul de pacienți pentru stadiul 0 Rai este 69 ani, pentru stadiul I Rai este 65 ani, pentru stadiul II Rai este 65 ani, pentru III Rai este de 78 ani, iar pentru stadiul IV Rai este de 58 ani (figura 3).

4.2.3 Aspecte terapeutice

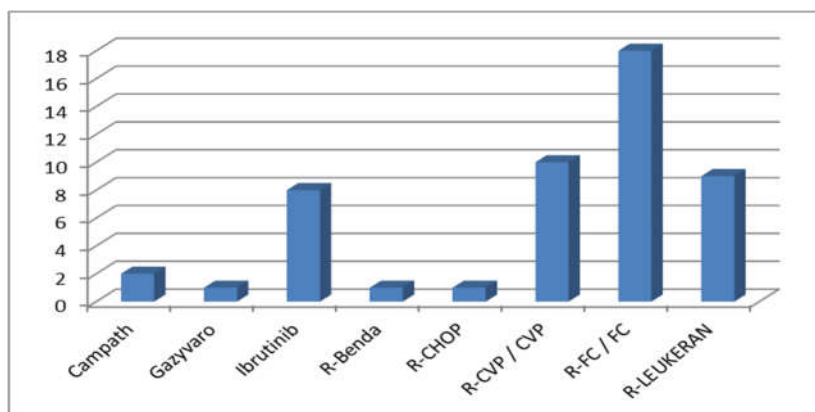


Figura 4. Reprezentare grafică distribuție în funcție de tipul de chimioterapie administrat

Dintre pacienții înrolați în studiu și care au urmat tratament chimioterapic, majoritatea au primit chimioterapie conform protocolului R-FC/FC care reprezintă standardul de aur în tratamentul LLC la pacienții fit, urmat de cure de tip R-CVP/CVP care se adresează pacienților care prezintă risc la tratamentul cu Fludarabină datorită comorbidităților sau vârstei înaintate. A treia categorie utilizată este R-Leukeran care se adresează pacienților vârstnici. Toate celelalte linii terapeutice se adresează formelor chimiorezistente sau refractare.(figura 4)

4.2.2 Factorii de prognostic actuali

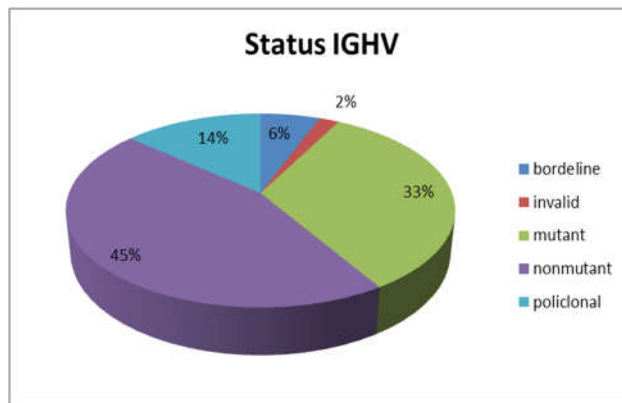


Figura 5. Reprezentarea grafică a lotului de pacienți în funcție de statusul IGHV

Analizând distribuția lotului de pacienți în funcție de statusul IGHV, s-a remarcat o preponderență a statusului IGHV nonmutant 45% (23 cazuri), față de 33% (17 cazuri) status IGHV mutant. (figura 5) Conform literaturii pacienții cu LLC fără mutație în genele IGHV prezintă un prognostic clinic mai nefavorabil.²²

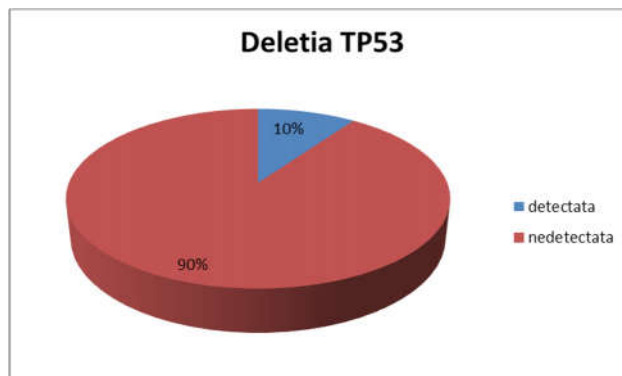


Figura 6. Distribuție în funcție de mutația TP53

Conform literaturii de specialitate pacienții cu LLC cu detecției TP53 sau/și del 17p prezintă un prognostic clinic nefavorabil și sunt refractari la chimioterapie.²³ Analizând distribuția lotului nostru de pacienți în funcție de mutația TP53, s-a observat că 10% dintre pacienții cu LLC au prezentat deleția TP53, iar restul de 90% au fost negativi. (figura 6)

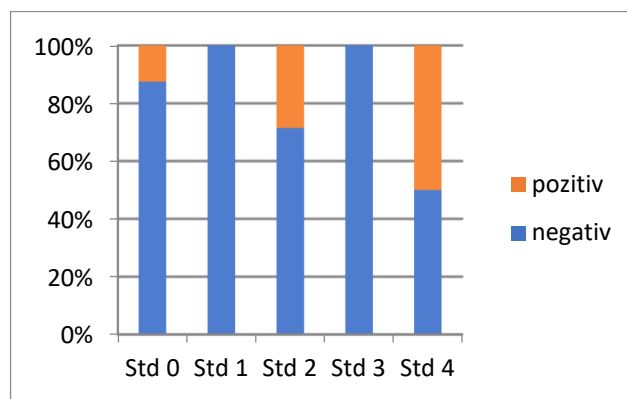


Figura 7. Distribuție în funcție de stadiul Rai și de markerul de prognostic CD38

Este cunoscut faptul că markerul CD38 reprezintă un factor de prognostic negativ prin riscul de progresie. În urma analizei sublotului de 24 de pacienți la care s-a lucrat CD38, stadializarea Rai la momentul înrolării pacienților în studiu nu reprezintă un factor de prognostic care să se coreleze cu nivelul expresiei CD38. (figura 7)

5. STUDIUL 1

Ipoteza de lucru: În primul studiu care a inclus un lot de 51 de pacienți diagnosticați cu LLC și un grup de control format din 10 indivizi sănătoși, am vizat să cercetăm și să analizăm corelațiile dintre celulele T regulatorii și receptorul solubil de IL-2, statusul IGVH, stadiul Rai și liniile terapeutice.

5.1 Evaluarea celulelor T de reglementare caracterizate prin expresia CD25high corelație cu valorile IL-2, status IGVH, stadiul Rai și linii terapeutice

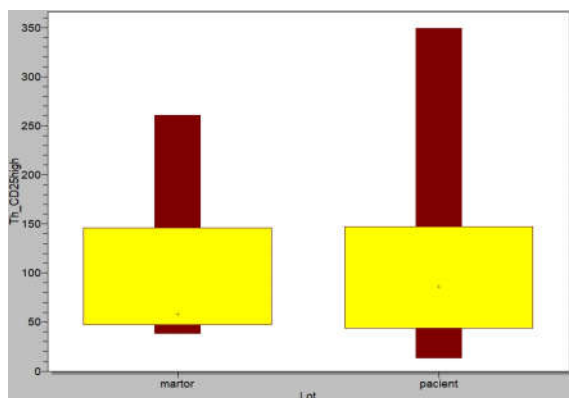


Figura 8. Reprezentare grafică comparație valoare Th CD25 high între lotul maritor și lotul de pacienți

În urma comparației valorilor expresiei CD25high a celulelor T de reglementare, între lotul de pacienți cu LLC și grupul de control, nu s-au remarcat diferențe care să fie semnificativ statistic, cel mai probabil datorită dimensiunii restrânse a grupului de pacienți cu LLC.(figura 8)²⁴

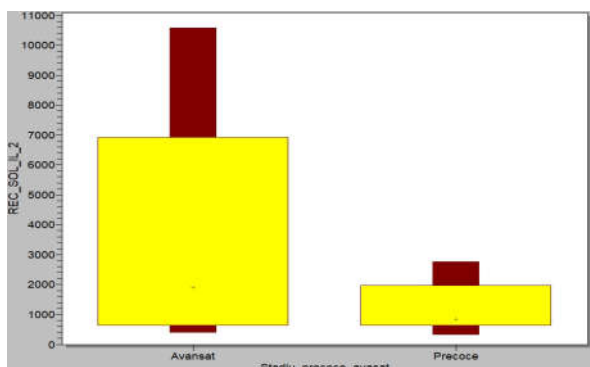


Figura 9. Reprezentare grafică corelație între receptorul solubil de IL-2 și stadiul Rai precoce/avansat la înrolare în studiu

Nivelul seric IL-2, în funcție de clasificarea Rai, nu este factor de prognostic negativ per total dar la subîmpărțirea pe grupe de risc precoce versus avansat (figura 9) tinde să se contureze o valoare care sa fie semnificativă statistic ($p=0.0577$), care ar însemna că în stadiul Rai avansat valoarea IL-2 este crescută față de stadiul Rai precoce, iar IL-2 ar putea să fie considerată factor de prognostic, în concordanță cu datele publicate în literatură.²⁴

5.2 Evaluarea celulelor T de reglementare caracterizate prin expresia FoxP3, Helios corelație cu stadiul Rai linii terapeutice și status IGVH

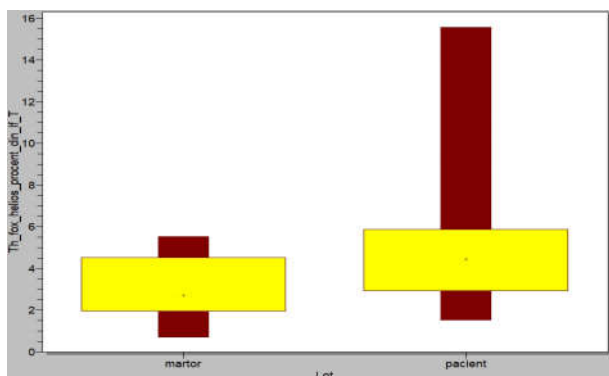


Figura 10. Reprezentare grafică a expresiei FoxP3 Helios (valoare procentuală) comparație lot martor și lot de pacienți

Din punctul de vedere al strategiei de identificare Treg prin expresia FoxP3/Helios, se observă o diferență în ceea ce privește valorile procentuale între lotul de pacienți și lotul martor aproape de limita semnificativă statistic ($p=0.0671$), (figura 10) care s-ar suprapune cu datele din literatură^{17,19,25}, cel mai probabil o creștere a dimensiunilor loturilor ar îndepărta dubiile privind corelația statistică. Această posibilă corelație statistică ar putea să indice că frecvența Treg este înalt crescută în lotul de pacienți cu LLC în comparație cu grupul de control sănătos. Însă din punct de vedere al valorilor absolute nu se observă nici o corelație.

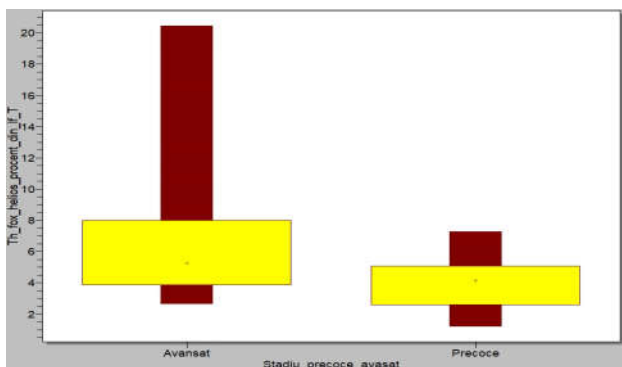


Figura 11. Reprezentare grafică valori Treg FoxP3/Helios (valoare procentuală) corelație cu stadiul Rai precoce/avansat

Din punct de vedere al valorilor procentuale al celulelor Treg cu expresie FoxP3/Helios, cu toate că nu se observă o corelație cu stadializarea Rai generală, la subclasificarea în stadiile precoce/avansat se observă o diferență semnificativă statistic în favoarea formelor avansate ($p=0.0156$) (figura 11), fapt confirmat și de literatura de specialitate care menționează o creștere progresivă a celulelor Treg în stadiile avansate de boală. ^{17,19,25}

5.3 Evaluarea celulelor T de reglementare caracterizate prin expresia fenotipică CD4+CD39+, corelație cu stadiul Rai și terapie

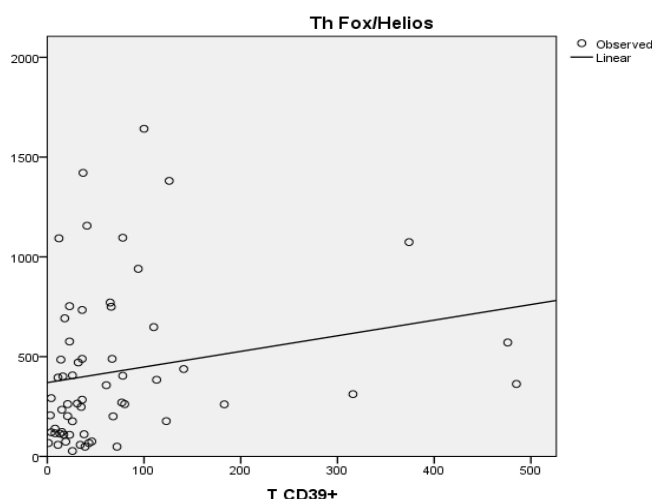


Figura 12. Reprezentare grafică a corelației dintre markerul CD39 și expresia FoxP3 în lotul de studiu (lot pacienți cu LLC și lot martor)

La nivelul întregului lot de studiu (51 pacienți cu LLC și 10 martori), s-a realizat analiza comparativă între valoarea absolută CD39 și valoarea absolută FoxP3 (figura 12) și a fost găsită o corelație semnificativă statistic între cei doi markeri care variază în mod direct proporțional, indicele Spearman's rho este 0.358, astfel încât corelația nu este puternică, cel mai probabil datorită dimensiunii lotului.

Având în vedere că CD39 conform datelor din literatură ²⁶ este reprezentativ pentru subsetul de celule Treg de memorie efectoră, o explicație a acestei corelații statistice ar putea fi următoarea: celule Treg sunt determinate prin intermediul expresiei Foxp3/Helios, iar markerul CD39 ar putea funcționa ca un marker surrogat în ceea ce privește identificarea Treg-urilor mai precis celulele Treg efectoră de memorie.

Tabel 1. Celulele Treg caracterizate prin expresia markerului CD39 (valoare procentuală) corelație cu stadiul Rai precoce/avansat în lotul de pacienți cu LLC

	Obs	Total	Media	Varianta	Dev Std
--	-----	-------	-------	----------	---------

	Avansat	17	74.7897	4.3994	110.0493	10.4904
	Precoce	34	22.8113	0.6709	0.5647	0.7515
	Minim	25%	Mediana	75%	Maxim	Dominanta
Avansat	0.1005	0.2391	0.8994	3.2224	44.2181	0.1005
Precoce	0.0633	0.2551	0.4418	0.7191	3.5770	0.0633

Testul Mann-Whitney/Wilcoxon (Testul Kruskal-Wallis pentru doua populatii)

Kruskal-Wallis H (echivalent cu Chi patrat) = 3.3793

Grad de libertate = 1

Valoare P = 0.0660

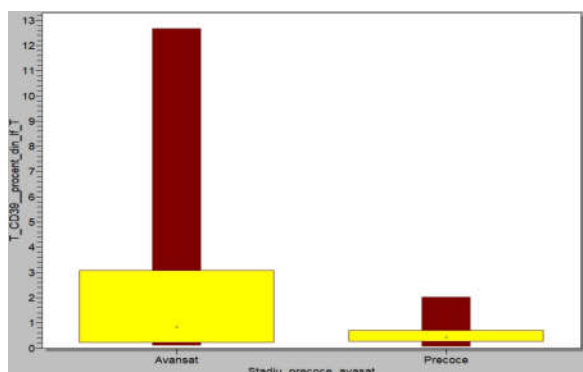


Figura 13. Reprezentare grafică a expresiei markerului CD39 (valoare procentuală) corelație cu stadiul Rai precoce/avansat în lotul de pacienți cu LLC

După cum se observă în tabelul 1, există o creștere semnificativă statistic ($p=0.0660$) (figura 13) a valorilor procentuale ale markerului CD39, pentru grupa de risc Rai forma avansată, în conformitate cu datele din literatură care menționează o creștere progresivă a valorii markerului CD39 în stadiile avansate de LLC.²⁷ Însă, din punct de vedere al valorilor absolute ale markerului CD39 nu se observă o corelație cu stadializarea Rai la subclasificarea în stadiile precoce/avansat.

Acest lucru ar putea avea o însemnătate în evoluția leucemiei limfocitare cronice, prin utilizarea markerul CD39 ca un posibil factor de prognostic, însă această ipoteză necesită o aprofundare a studiului.

5.4 Evaluarea celulelor de reglementare T (Treg) prin prisma populației limfocitare T CD4 și CD8

Tabel 2. Mediana populației limfocitare T CD4+ (valoare absolută) – analiză comparativă între lotul martor și lotul de pacienți cu LLC

	Obs	Total	Media	Varianta	Dev Std	
martor	10	76417.0000	7641.7000	29882520.6778	5466.4907	
pacient	51	259140.0000	5081.1765	41857670.9882	6469.7505	
	Minim	25%	Mediana	75%	Maxim	Dominanta
martor	1376.0000	4048.0000	6084.5000	9749.0000	17228.0000	1376.0000
pacient	545.0000	1863.0000	3307.0000	5967.0000	42650.0000	545.0000

Testul Mann-Whitney/Wilcoxon (Testul Kruskal-Wallis pentru doua populatii)

Kruskal-Wallis H (echivalent cu Chi patrat) = 3.6448

Grad de libertate = 1
 Valoare P = 0.0562

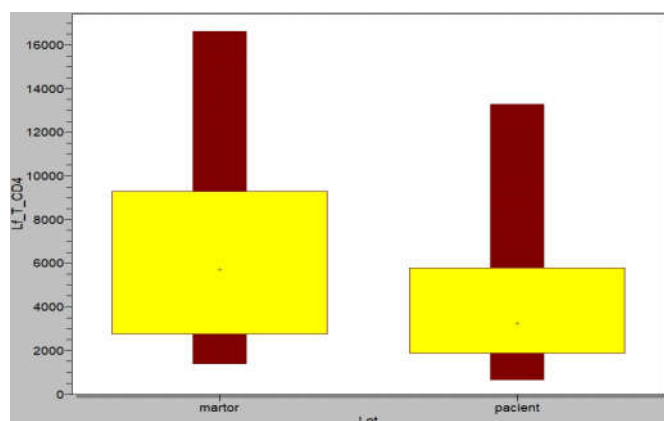


Figura 14. Reprezentare grafică populația limfocitară T CD4 (valoare absolută) lot martor versus lot pacient

Tabel 3. Mediana populației limfocitare T CD4+ (valoare procentuală) – analiză comparativă între lotul martor și lotul de pacienți cu LLC

	Obs	Total	Media	Varianta	Dev Std
martor	10	617.6973	61.7697	121.3707	11.0168
pacient	51	2685.5414	52.6577	191.3510	13.8330

	Minim	25%	Mediana	75%	Maxim	Dominanta
martor	40.1587	54.1845	62.1436	69.7208	75.6295	40.1587
pacient	24.5176	42.9238	52.0348	58.7743	88.9264	24.5176

Testul Mann-Whitney/Wilcoxon (Testul Kruskal-Wallis pentru doua populatii)
 Kruskal-Wallis H (echivalent cu Chi patrat) = 4.6759
 Grad de libertate = 1
 Valoare P = 0.0306

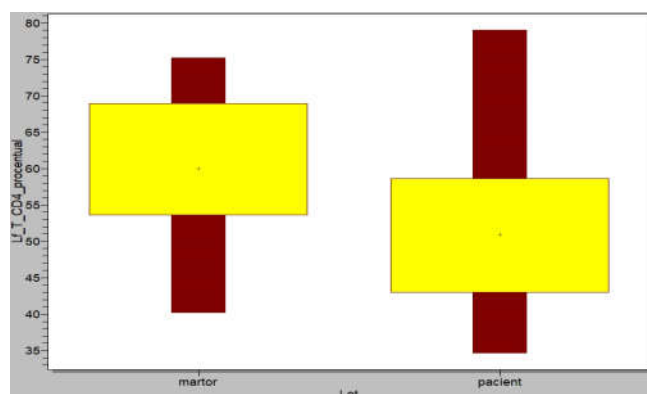


Figura 15. Reprezentare grafică populația limfocitară T CD4 (valoare procentuală) lot martor versus lot pacient

După cum se poate observa în tabelul 2, 3 și figurile 14 și 15, oligoclonalitatea pare să fie substanțial mai frecventă în populațiile de celule T CD4+ ale pacienților cu LLC, decât în grupul de control, fapt care a fost corelat cu un stadiul de boală mai avansat în literatura de specialitate.²⁸

Această constatare obiectivează faptul că celulele T CD4+ sunt crescute în sângele periferic al pacienților cu LLC.

Tabel 4. Mediana populației limfocitare T CD8+ (valoare absolută) – analiză comparativă între lotul martor și lotul de pacienți cu LLC

	Obs	Total	Media	Varianta	Dev Std
martor	10	43539.0000	4353.9000	6385632.9889	2526.9810
pacient	51	202074.0000	3962.2353	10418530.5035	3227.7749

	Minim	25%	Mediana	75%	Maxim	Dominanta
martor	918.0000	1923.0000	4866.0000	6032.0000	7883.0000	918.0000
pacient	290.0000	1877.0000	3470.0000	5199.0000	18603.0000	290.0000

Testul Mann-Whitney/Wilcoxon (Testul Kruskal-Wallis pentru doua populatii)

Kruskal-Wallis H (echivalent cu Chi patrat) = .6380
 Grad de libertate = 1
 Valoare P = 0.4245

Tabel 5. Mediana populației limfocitare T CD8+ (valoare procentuală) – analiză comparativă între lotul martor și lotul de pacienți cu LLC

	Obs	Total	Media	Varianta	Dev Std
martor	10	382.3027	38.2303	121.3707	11.0168
pacient	51	2414.4586	47.3423	191.3510	13.8330

	Minim	25%	Mediana	75%	Maxim	Dominanta
martor	24.3705	30.2792	37.8564	45.8155	59.8413	24.3705
pacient	11.0736	41.2257	47.9652	57.0762	75.4824	11.0736

Testul Mann-Whitney/Wilcoxon (Testul Kruskal-Wallis pentru doua populatii)

Kruskal-Wallis H (echivalent cu Chi patrat) = 4.6759
 Grad de libertate = 1
 Valoare P = 0.0306

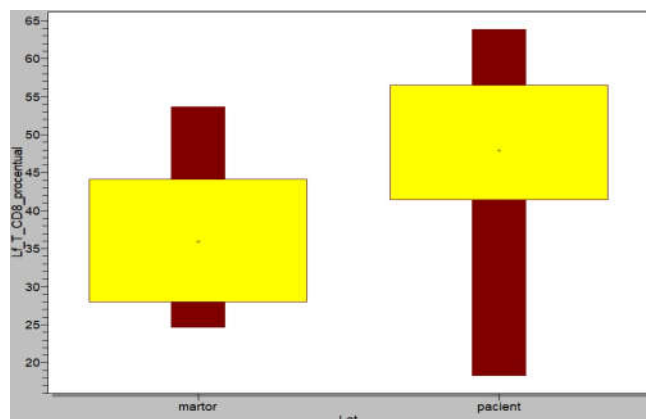


Figura 16. Reprezentare grafică populația limfocitară T CD8 (valoare procentuală) lot martor versus lot pacient

Același lucru se remarcă și în privința oligoclonalității în populațiile de celule T CD8+, cel puțin din punct de vedere al valorii procentuale pare să fie mai frecventă în grupul pacienților cu LLC, decât în grupul de control. (tabelul 4,5 și figura 16)

Tabel 6. Raport populație limfocitară T CD4/CD8 lot martor versus lot pacient

	Obs	Total	Media	Varianta	Dev Std
martor	10	18.1607	1.8161	.6446	.8029
pacient	51	74.0282	1.4515	1.8773	1.3702

	Minim	25%	Mediana	75%	Maxim	Dominanta
martor	0.6711	1.1827	1.6502	2.3026	3.1033	0.6711
pacient	0.3248	0.7520	1.0848	1.4257	8.0305	0.3248

Testul Mann-Whitney/Wilcoxon (Testul Kruskal-Wallis pentru doua populatii)

Kruskal-Wallis H (echivalent cu Chi patrat) = 4.6759

Grad de libertate = 1

Valoare P = 0.0306

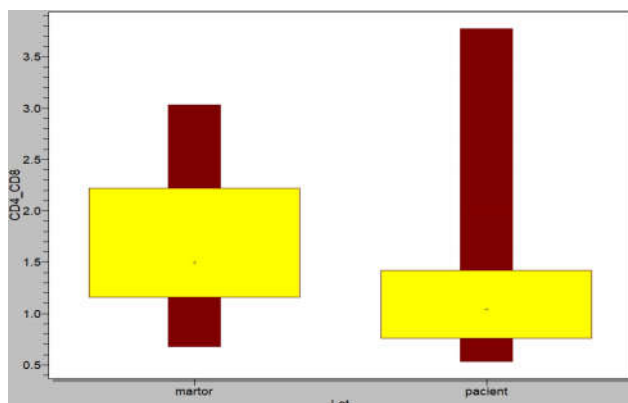


Figura 17. Reprezentare grafică raport populație limfocitară T CD4/CD8 lot martor versus lot pacient

Raportul populației limfocitare T CD4/CD8 (tabel 6, figura 17) este scăzut în cadrul cazurilor de LLC ($p=0.0306$), cu raport inversat pentru 19% din cazuri, fapt confirmat și de datele din literatură.²⁹ Cazurile de LLC care prezintă raport inversat se asociază cu prognostic nefavorabil.

Această modificare de raport se realizează prin scăderea procentuală a compartimentului CD4 ($p=0.0306$) și creșterea CD8 ($p=0.0306$) (tabel 6). Prin urmare se identifică o creștere a activității citotoxice, CD8, confirmată de asemenea și de activarea antitumorală CD39 în grupul pacienților cu LLC. Această populație de celule T potențial citotoxice ar putea să contribuie la supraviețuirea celulelor tumorale leucemice cât și la starea de imunodeficiență frecvent observată la pacienții cu LLC.

Aceste date documentează alterări profunde în ceea ce privește repertoriul de celule T al pacienților cu leucemie limfocitară cronică și indică importanța rolului populației de celule T clonale în patogeneza acestei boli.

Tabel 7. Raportul populației limfocitare T CD4/CD8 a lotului de pacienți cu LLC corelație cu stadiul Rai

	Obs	Total	Media	Varianta	Dev Std
0	15	25.2364	1.6824	3.4379	1.8541
1	7	7.4882	1.0697	.1374	.3707

2	12	12.0281	1.0023	.5126	.7160
3	3	10.8698	3.6233	5.2622	2.2940
4	14	18.4058	1.3147	.7766	.8813

	Minim	25%	Mediana	75%	Maxim	Dominanta
0	0.4836	0.8651	1.1517	1.6978	8.0305	0.4836
1	0.5757	0.7231	1.2610	1.4160	1.4466	0.5757
2	0.3248	0.6282	0.8390	1.0512	3.1300	0.3248
3	1.2530	1.2530	3.7842	5.8325	5.8325	1.2530
4	0.6056	0.7844	0.9852	1.5700	3.7724	0.6056

Testul Mann-Whitney/Wilcoxon (Testul Kruskal-Wallis pentru doua populatii)

Kruskal-Wallis H (echivalent cu Chi patrat) = 7.5154

Grad de libertate = 4

Valoare P = 0.1110

Tabel 8. Raportul populației limfocitare T CD4/CD8 a lotului de pacienți cu LLC corelație cu stadiul Rai precoce/avansat

	Obs	Total	Media	Varianta	Dev Std
Avansat	17	29.2755	1.7221	2.1117	1.4532
Precoce	34	44.7526	1.3163	1.7640	1.3282

	Minim	25%	Mediana	75%	Maxim	Dominanta
Avansat	0.6056	0.8078	1.1398	1.6929	5.8325	0.6056
Precoce	0.3248	0.7509	0.9725	1.3149	8.0305	0.3248

Testul Mann-Whitney/Wilcoxon (Testul Kruskal-Wallis pentru doua populatii)

Kruskal-Wallis H (echivalent cu Chi patrat) = .9981

Grad de libertate = 1

Valoare P = 0.3178

Raportul populației limfocitare T CD4/CD8 este scăzut în lotul de pacienți cu LLC și în 19% din cazuri este inversat, iar acest raport inversat ar trebui sa se asocieze cu un prognostic nefavorabil, cu un stadiu Rai avansat conform literaturii de specialitate³⁰. Însă în lotul de studiu, nu se regăsește această corelație cu stadializarea Rai, fie că este analizată la toate stadiile Rai (tabel 7) sau doar la formele avansat și precoce (tabel 8). La baza acestei necorelații ar putea sta dimensiunea redusă a lotului de pacienți și faptul că majoritatea pacienților cu LLC aparțineau unei stadializări Rai de rang mic. (0,I,II)

6. STUDIUL 2

Ipoteza de lucru: În cel de-al doilea studiu care a inclus un lot de 28 de pacienți diagnosticați cu LLC și un grup de control format din 17 indivizi sănătoși, am vizat să cercetăm și să analizăm subseturile funcționale T, atât din prisma valorilor absolute cât și procentuale. De asemenea, au fost observate și corelațiile dintre subseturile limfocitare T și statusul IGVH, stadiul Rai și liniile terapeutice.

6.1 Evaluarea subseturilor limfocitare T funcționale

În ceea ce privește populația limfocitară de celule T cu funcție de memorie efectoră, prin compararea lotului martor cu lotul de pacienți cu LLC, nu s-a observat nici o diferență semnificativă statistic, nici din punct de vedere al valorii absolute sau procentuale.

Aceeași constatare o putem observa și în ceea ce privește populația limfocitară de celule T cu funcție de memorie centrală, prin compararea lotului martor cu lotul de pacienți cu LLC, nu s-a observat nici o diferență semnificativă statistic, nici din punct de vedere al valorii absolute sau procentuale.

Celulele T cu funcție de memorie centrală au rol în imunitatea de lungă durată, iar în lotul nostru de pacienți cu LLC această funcție nu pare să fie afectată.

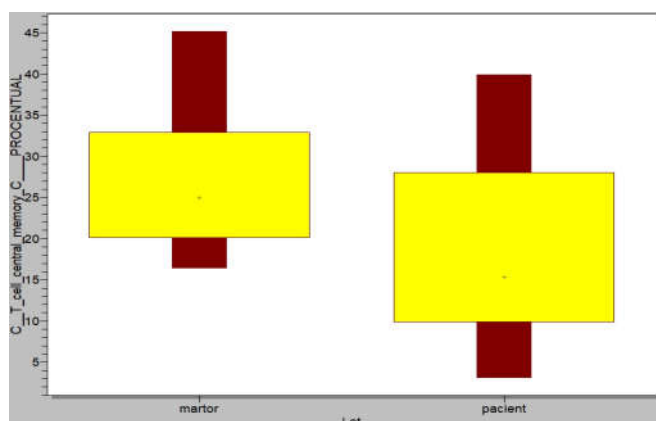


Figura 18. Reprezentare grafică populația limfocitară T CD4+ cu funcție efectoră (valoare procentuală) lot martor versus lot pacient

În schimb, în urma analizei comparative între lotul de pacienți cu LLC și lotul martor, al populației limfocitare T cu funcție efectoră s-a putut observa o diferență semnificativă statistic, atât prin prisma valorii procentuale cât și a valorii absolute. (figura 18). Această diferență statistică, aduce în prim plan o scădere a compartimentului de limfocite T efectoră, în detrimentul grupului de pacienți cu leucemie limfocitară cronică. Reducerea numărului de celule T activate poate indica o reducere a stării de imuno-competență a pacientului cu LLC.

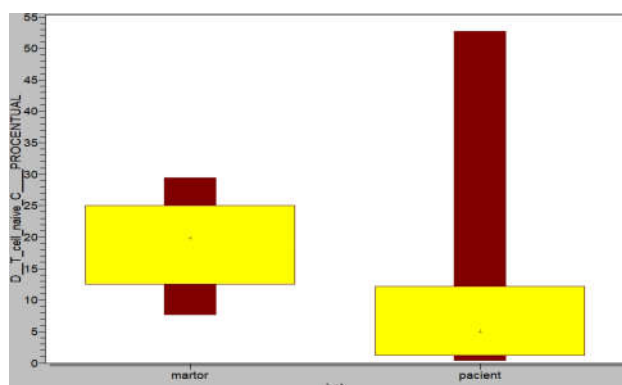


Figura 19. Reprezentare grafică a populației limfocitare T CD4+ naive (valoare procentuală) lot martor versus lot pacient

Analiza efectuată pe compartimentul celulelor T naive arată o scădere importantă în compartimentul celulelor T naive în lotul de pacienți cu LLC comparativ cu grupul de control.(figura 19). Celulele T naive sunt celule precursorale ale subseturilor de limfocite T efectoare și de memorie. Diminuarea acestui compartiment poate să aibă multiple cauze precum absența sau afectarea reconstruirii celulelor T sau prejudicierea producției timice.

Tabel 9. Centralizarea valorilor P obținute prin evaluarea subseturile limfocitare T

Valoarea p subseturi T	CD4+ (C-/-) cu funcție de memorie efectoare	CD4+ (C+/-) cu funcție de memorie centrala	CD4 (C-/+) cu funcție efectoare	CD4 (C+/+) Naive
Număr absolut	0.1979	0.1434	0.0002	0.0000
Număr procentual	0.1899	0.6065	0.0131	0.0017

În cadrul subseturilor T funcționale, se observă o scădere a valorilor absolute și numerice pentru segmentele de populație limfocitară T naive și limfocite T cu funcție efectoare. (tabel 9).

Celulele limfocitare T naive sunt predominante la naștere și numărul lor scade treptat după pubertate.³¹ Datorită scăderii numărului de celule T naive o dată cu înaintarea în vârstă, la persoanele vârstnice vom avea număr scăzut de celule T naive, posibilă explicație pentru depleția compartimentului de celule T observată în lotul nostru de LLC ar putea fi chiar vârsta pacienților (mediana de vârstă fiind 65 ani), leucemia limfocitară cronică fiind predominant o boală a vârstnicului.

6.2 Studiarea unei corelații între subseturile limfocitare T funcționale și stadiul Rai

Tabel 10. Centralizarea valorilor P obținute prin evaluarea subseturilor limfocitare T în funcție de stadiul Rai și stadiul precoce/avansat

Raport subseturi T	CD4+ C-/- de memorie efectoare	CD4+ C+/- de memorie centrală	CD4 C-/+ efectoare	CD4 C+/+ Naive
Stadiul Rai				
Număr absolut	0.3906	0.3071	0.4104	0.3535
Număr procentual	0.2759	0.2866	0.3525	0.6482
Stadiu precoce/avansat				
Număr absolut	0.4456	0.1544	0.3091	0.0933
Număr procentual	0.0419	0.0599	0.4158	0.2855

În tabelul 10, am centralizat datele obținute și am concluzionat că comparativ cu evaluarea generală a subseturilor T față de populația normală, unde se observă o depleție a sectorului precoce nefuncțional sau efector (T naive, T efectoare), la evaluarea în funcție de stadializarea Rai generalizată nu s-a observat nici o modificare semnificativ statistică. Însă la evaluarea pe grupe de risc (stadiu avansat, stadiu precoce) s-a observat un aspect în oglindă, respectiv corelații semnificativ statistice sau la limită pentru segmentul de memorie centrală de lungă durată și cel de memorie efector (celule T de memorie efector, celule T de memorie centrală) prin creșterea valorilor procentuale în stadiile avansate, care se asociază cu o încărcătură tumorală crescută.

6.3 Studiarea unei corelații între subseturile limfocitare T funcționale și conduita terapeutică

Tabel 11. Centralizarea valorilor P obținute din evaluarea subseturilor T funcționale în funcție de expunerea la chimioterapie.

Raport subseturi T	CD4 C-/- cu funcție de <i>memorie efector</i>	CD4 C+/- cu funcție de <i>memorie centrală</i>	CD4 C-/+ cu funcție <i>efector</i>	CD4 C+/+ <i>Naive</i>
Expunere la chimioterapie naivi versus tratați				
Număr absolut	0.1468	0.3332	0.1892	0.0322
Număr procentual	0.0287	0.5340	0.1020	0.0688

În funcție de expunerea la chimioterapie, se observă o creștere a celulelor T CD4 cu funcție de memorie efector în lotul de pacienți cu LLC care au fost tratați însă fără o creștere a segmentului de celule T cu funcție efector (tabel 11). Această concluzie este superpozabilă cu o altă concluzie pe care o putem regăsi în această lucrare și anume că limfocitele T CD4+ cu funcție de memorie efector se regăsesc în număr crescut în stadiul avansat de boală, comparativ cu stadiul precoce, explicația cea mai plauzibilă fiind că în stadiul avansat de boală, pacienți primesc chimioterapie.

Celulele T cu funcție de memorie centrală rămân neafectate, însă se remarcă o slabă semnificație statistică pentru segmentul naiv, celulele T naive regăsindu-se în număr scăzut în lotul de pacienți tratați cu chimioterapie comparativ cu lotul de pacienți cu LLC netratați.

Cel mai probabil am putea afirma că există o tentativă de activare a imunității celulare prin creșterea potențialului de recrutare (celule T CD4 naive și CD4 de memorie efectoare), dar fără o creștere a celulelor efectorii. (care sunt distruse fie prin consum sau supresie).

Tabel 12. Centralizarea valorilor P obținute din evaluarea subseturilor T funcționale în funcție de numărul de linii terapeutice

Raport subseturi T	CD4+ C-/- cu funcție de memorie efectoare	CD4+ C+/- cu funcție de memorie centrală	CD4 C-/+ cu funcție efectoare	CD4 C+// Naive
Expunere chimioterapie naivi/tratați				
Număr absolut	0.1468	0.3332	0.1892	0.0322
Număr procentual	0.0287	0.5340	0.1020	0.0688
Număr linii terapeutice				
Număr absolut	0.1728	0.2542	0.3439	0.3132
Număr procentual	0.2332	0.5651	0.4537	0.4273

Observând tendința de slabă corelație statistică pentru segmentul de limfocite T CD4 naive, cu expunerea la tratament, am considerat oportun explorarea posibilității impactului toxicității medicamentoase prin cumularea liniilor terapeutice (tabel 12). Însă, în urma acestei evaluări se observă o îndepărtare și mai mare de limita semnificativă statistic, prin urmare numărul de linii de chimioterapie cumulate, nu influențează compartimentul funcțional al limfocitelor T.

6.4 Studiarea unei corelații între subseturile limfocitare T funcționale și statusul IGHV

Tabel 13. Centralizarea valorilor P obținute din evaluarea subseturilor T funcționale în funcție de statusul IGHV mutant/nonmutant

Raport subseturi T	CD4+ C-/- cu funcție de memorie efectoare	CD4+ C+/- cu funcție de memorie centrală	CD4 C-/+ cu funcție efectoare	CD4 C+// Naive
Comparație cu status IGHV mutant/nonmutant				
Număr absolut	0.3321	0.7369	0.8229	0.0622
Număr procentual	0.5506	0.6544	1	0.0622

În cazul evaluării subpopulațiilor limfocitare T în funcție de statusul IGHV (tabel 13), se observă o slabă corelare a valorilor procentuale și absolute a celulelor T CD4 naive, dar și o lipsă totală de corelație ($p=1$) în cazul populațiilor limfocitare T efectoare, fapt care ar putea fi pus pe dimensiunea redusă a lotului de pacienți cu LLC. (28 de pacienți)

Drept urmare, activitatea celulelor T cu funcție de memorie efectoare și efectoare nu pare să fie deloc influențată de statusul IGHV mutant ori nonmutant. Însă se observă o tendință ușoară de creștere a celulelor T naive (posibil datorită răspunsului imun care tinde înspre celulele T cu funcție efectoare).

6.5 Studiarea unei corelații între subseturile limfocitare T funcționale și factorul de prognostic CD38

Tabel 14. Centralizarea valorilor P obținute din evaluarea subseturilor T funcționale în funcție de factorul de prognostic CD38

Raport subseturi T	CD4+ C-/- cu funcție de memorie efectorie	CD4+ C+/- cu funcție de memorie centrală	CD4 C-/++ cu funcție efec- toare	CD4 C+/+ Naive
Comparație cu expresia CD38				
Număr absolut	0.665	0.1939	0.3865	0.7728
Număr procentual	0.8618	0.223	0.1172	0.223

Cu toate că expresia CD38 este un factor de prognostic care este legat de răspunsul la chimioterapie (în special la Fludarabină), în lucrările de specialitate nu s-au găsit deficiențe majore în dezvoltarea, activarea sau diferențierea celulelor T, iar prezența CD38 în aceste procese ar putea să fie importantă dar nu indispensabilă, ceea ce poate indica o activitate redundantă a CD38.³²

După cum se observă, în lotul nostru de studiu nivelul expresiei CD38 nu induce modificări de micromediu la nivelul subseturilor limfocitelor T (tabel 14), rezultate care sunt contradictorii cu literatura de specialitate³². Explicația ar putea fi dată de dimensiunea redusă a lotului (15 pacienți) sau că CD38 este legat strict de funcția de receptor/transductor de semnal, canal de calciu.

6.6 Studiarea unei corelații între subseturile limfocitare T funcționale și expresia markerului CD57

Tabel 15. Mediana populației limfocitare T CD4+/CD57+ (valoare absolută) lot martor versus lot pacient cu LLC

	Obs	Total	Media	Varianta	Dev Std
martor	17	518.0000	30.4706	659.0147	25.6713
pacient	28	11803.0000	421.5357	464061.9616	681.2209

	Minim	25%	Mediana	75%	Maxim	Dominanta
martor	3.0000	13.0000	23.0000	41.0000	81.0000	3.0000
pacient	9.0000	55.5000	140.0000	373.0000	2774.0000	9.0000

Testul Mann-Whitney/Wilcoxon (Testul Kruskal-Wallis pentru doua populatii)
 Kruskal-Wallis H (echivalent cu Chi patrat) = 18.9652
 Grad de libertate = 1
 Valoare P = 0.0000

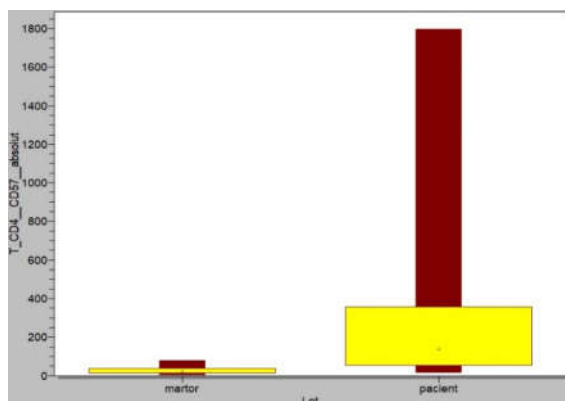


Figura 20. Reprezentare grafică populație limfocitară T CD4+/CD57+ (valoare absolută) lot martor versus lot pacient

Tabel 16. Mediana populației limfocitare T CD4+/CD57+ (valoare procentuală) lot martor versus lot pacient

	Obs	Total	Media	Varianta	Dev Std
martor	17	7.5600	.4447	.1252	.3538
pacient	28	38.5830	1.3780	5.0407	2.2451

	Minim	25%	Mediana	75%	Maxim	Dominanta
martor	0.0500	0.2100	0.3500	0.6000	1.1500	0.4000
pacient	0.0185	0.3592	0.7220	1.3213	11.4546	0.0185

Testul Mann-Whitney/Wilcoxon (Testul Kruskal-Wallis pentru doua populatii)
 Kruskal-Wallis H (echivalent cu Chi patrat) = 5.7022
 Grad de libertate = 1
 Valoare P = 0.0169

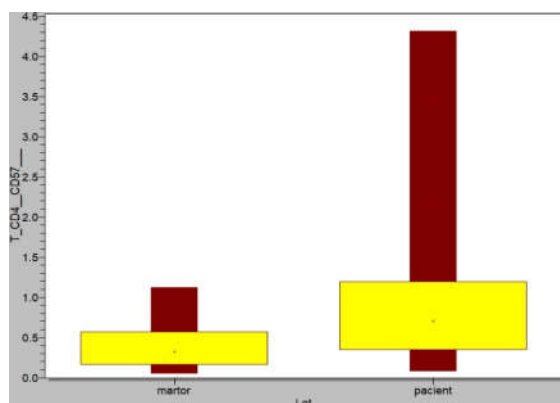


Figura 21. Reprezentare grafică populație limfocitară T CD4+/CD57+ (valoare procentuală) lot martor versus lot pacient

După cum se poate observa în tabelele 15, 16 și figurile 20,21 există o corelație semnificativ statistică atât prin prisma valorilor absolute cât și procentuale ale populației de limfocite T CD4+/CD57+ care sunt crescute în lotul pacienților cu LLC față de lotul martor.

Am putea concluziona ca există o activarea imună prin celule T CD4 Killer (CD4+/CD57+) la nivelul lotului de pacienți diagnosticați cu LLC, fapt care este în conformitate și cu datele științifice^{33,34}. În literatură s-a observat și faptul că în formele avansate de LLC valorile expresiei CD57 sunt crescute semnificativ.³⁵

6.7 Studiarea unei corelații între subseturile limfocitare T funcționale și expresia markerilor CD57 și CD39

Tabel 17. Mediana populației limfocitare T CD4+/CD57+ corelație cu expresia CD39

			T CD4+ /CD57+	T CD4+ /CD57+ absolut	T CD4+ /CD57+ procentual	T CD39+ Absolut	TCD39+ procentual
Spearman's rho	T CD4+/CD57+	Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) N	1.000 .000 45	.591** .000 45	.881** .000 45	-.336* .045 36	-.330* .049 36
	T CD4+/CD57+ absolut	Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) N	.591** .000 45	1.000 .000 45	.605** .000 45	-.386* .020 36	-.145 .398 36
	T CD4+/CD57+ procentual	Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) N	.881** .000 45	.605** .000 45	1.000 .000 45	-.501** .002 36	-.418* .011 36
	T CD39+ absolut	Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) N	-.336* .045 36	-.386* .020 36	-.501** .002 36	1.000 .000 61	.714** .000 61
	TCD39+ procentual	Correlation Coefficient Sig. (2-tailed) N	-.330* .049 36	-.145 .398 36	-.418* .011 36	.714** .000 61	1.000 .000 61

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

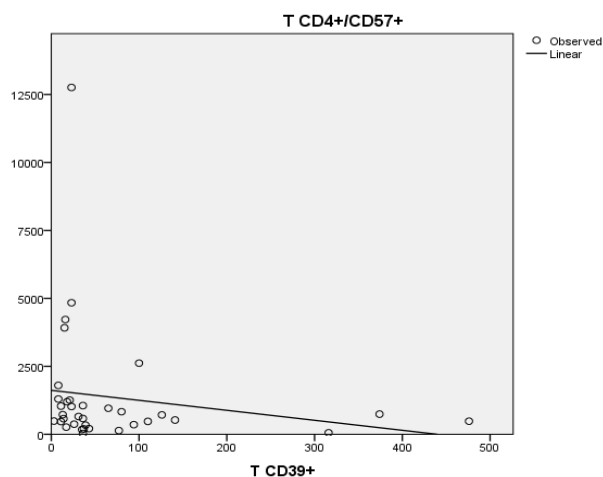


Figura 22. Reprezentare grafică sub-populația limfocitară T CD4+/CD57+ corelație cu expresia CD39

Sub-populația limfocitară T CD4+/CD57+ se corelează semnificativ statistic cu sub-populația limfocitară T CD39+ ($p=0.045$) și variază invers proporțional (indicele= -0.336). (figura 22)

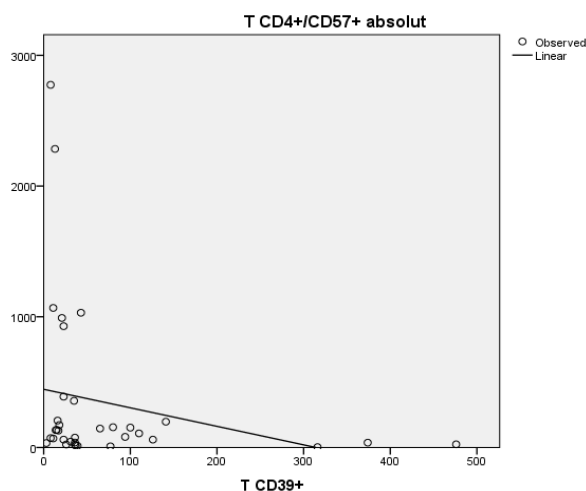


Figura 23. Reprezentare grafică sub-populația limfocitară T CD4+/CD57+ cu expresia CD39 (valoare absolută)

Valoarea absolută a sub-populației limfocitare T CD4+/CD57+ se corelează semnificativ statistic cu sub-populația limfocitară T CD39+ ($p=0.020$) și variază tot invers proporțional (indicele= -0.386). (figura 23)

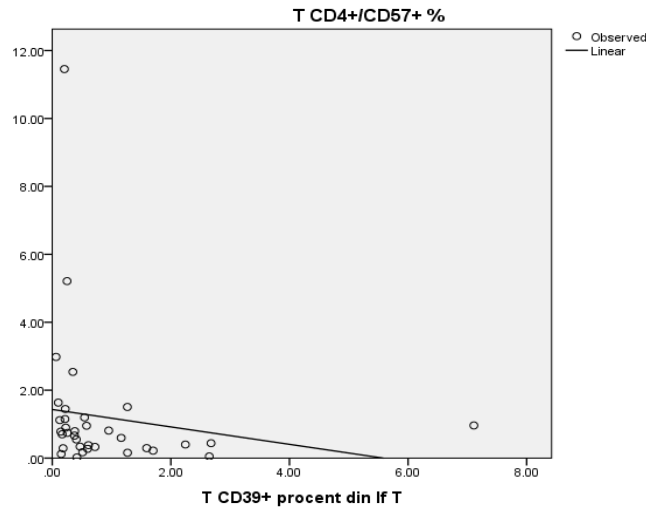


Figura 24. Reprezentare grafică sub-populația limfocitară T CD4+/CD57+ cu expresia CD39 (valoare procentuală)

Valoarea procentuală a sub-populației limfocitare T CD4+/CD57+ se corelează semnificativ statistic cu sub-populația limfocitară T CD39+ (valoare procentuală din limfocitele T) și variază tot invers proporțional (indicele= -0.418).(figura 24)

În absența unei corelații semnificativ statistică a nivelul expresiei CD4+/CD57+ în funcție de grupele de risc, se observă însă o corelație de invers proporționalitate între diminuarea valorilor expresiei CD4+/CD57+ și creșterea valorilor expresiei CD4+/CD39+, adică o scădere a funcției efectoare cu creșterea funcției de memorie efectoare.(tabel 17)

Această corelație statistică, aduce în prim plan o scădere a compartimentului de limfocite T efectoare, în grupul de pacienți cu leucemie limfocitară cronică, concluzie care este consolidată și de alte statistici care se regăsesc pe parcursul studiului doi, și care aduce în prim plan reducerea numărului de celule T activate care poate justifica starea de imunodeficiență a pacientului cu LLC.

DISCUȚII GENERALE

În primul rând, o înțelegere mai aprofundată a biologiei celulelor Treg în micromediul tumoral LLC este justificată, deoarece această analiză ar putea să identifice alte potențiale ținte terapeutice și să evidențieze biomarkeri adiționali care ar putea fi utilizați pentru a evalua funcția celulelor Treg.

În al doilea rând, tehnicile utilizate pentru caracterizarea fenotipică și funcțională a celulelor Treg umane, au influențat proiectarea și monitorizarea celor 2 studii clinice. Spre exemplu în timp ce FoxP3 este un marker sigur și autentic al celulelor Treg la șoareci, în cadrul studiului nostru s-a dovedit a fi un marker limitat și care nu prezintă fiabilitate. Astfel, ar fi de dorit dezvoltarea de

markeri și/sau abordări suplimentare care să poată identifica în mod fiabil toate celulele Treg umane. În plus, ar fi necesar și un panel de markeri care să identifice mai multe populații de celule Treg suprimatoare din punct de vedere funcțional în micromediul tumoral care ar putea fi studiate selectiv.

În al treilea rând, în timp ce potențialele beneficii terapeutice pot fi obținute din abordările curente concepute pentru epuizarea sau limitarea temporară a celulelor Treg, este posibil ca acest lucru să conducă la observații clinice foarte variabile. Astfel, există o nevoie clară de a dezvolta abordări mai selective care să limiteze funcția celulelor Treg, și care să determine dacă există subpopulații definite, care sunt implicate mai mult în promovarea creșterii tumorale și/sau în blocarea imunității antitumorale.

În al patrulea rând, rolul modulator al funcției celulelor Treg rămâne neclar și necesită investigații și clarificări suplimentare. Astfel, în timp ce rămân multe lacune, iar adevărata eficacitate a direcționării celulelor Treg în leucemia limfocitară cronică nu a fost încă determinată, observațiile din ambele studii clinice sunt încurajatoare.

DISCUȚII STUDIUL 1

În primul studiu care a inclus un lot de 51 de pacienți diagnosticați cu LLC și un grup de control format din 10 indivizi sănătoși, s-au analizat corelațiile dintre celulele T regulatorii și receptorul solubil de IL-2, statusul mutațional IGVH, stadiul Rai și liniile terapeutice.

Nivelul seric de IL-2, în funcție de clasificarea Rai, nu a reprezentat un factor de prognostic negativ per ansamblu, însă la subîmpărțirea Rai pe grupe de risc stadiul precoce versus stadiul avansat, tinde să se contureze o valoare care să fie semnificativă statistic ($p=0.0577$), care ar putea însemna că în stadiul Rai avansat valoarea IL-2 este crescută față de stadiul Rai precoce, iar IL-2 ar putea să fie luată în considerare ca factor de prognostic, în concordanță cu datele publicate în literatură.²⁴

În urma analizei expresiei markerului CD25 între lotul pacienților cu LLC și grupul de control atât prin prisma valorii procentuale cât și valorii absolute, nu a fost găsită o corelație care să fie semnificativă din punct de vedere statistic. Identificarea celulelor Treg prin expresia CD25 high și compararea lor cu stadiul Rai toate grupele de risc sau Rai subîmpărțit pe grupele de risc, cu statusul IGHV sau cu istoricul de expunere la chimioterapie al pacienților cu LLC nu a găsit corelații semnificative statistic. Concluzia fiind că expresia markerului CD25 nu s-a definit nici ca factor de prognostic, nici ca criteriu de răspuns la tratament, contrar ipotezei de lucru.

În ceea ce privește strategia de identificare a celulelor Treg prin expresia FoxP3/Helios, am găsit o diferență privind valorile procentuale (lotul de pacienți cu LLC versus lotul martor) aproape

de limita semnificativă statistic ($p=0.0671$), care se suprapune cu datele din literatură^{17,19,25} iar o creștere a dimensiunilor loturilor ar putea îndepărta dubiile privind corelația statistică.

Valorile absolute ale celulelor Treg cu expresie FoxP3/Helios, nu se corelează cu stadializarea Rai generală sau subîmpărțită în stadiul precoce/avansat, însă nu același lucru îl putem afirma din prisma valorilor procentuale ale celulelor Treg cu expresie FoxP3/Helios, care la subclasificarea în stadiile precoce/avansat prezintă o diferență semnificativă statistic în favoarea formelor avansate ($p=0.0156$), fapt confirmat și de literatura de specialitate care menționează o creștere progresivă a celulelor Treg în stadiile avansate de boală.^{17,19,25}

În concluzie, am arătat că pacienții cu leucemie limfocitară cronică prezintă valori procentuale mai mari ale celulelor Treg cu expresie FoxP3/Helios comparativ cu martorii, iar valorile procentuale ale Treg-urilor FoxP3/Helios circulante cresc simultan cu stadiul de LLC, sugerând că ar putea exista o inhibiție puternică a celulelor care împiedică progresia tumorală și o extindere mai rapidă a celulelor leucemice tip LLC.

În schimb o lipsă totală de corelație statistică se observă la relația dintre celulele Treg FoxP3 Helios și conduita terapeutică. În acest studiu, frecvența celulelor Treg cu expresie FoxP3 Helios a fost comparată și cu starea mutațională IGHV a celulelor LLC, însă statusul IGHV nu pare că influențează numărul sau funcția inhibitorie a celulelor de reglementare T, fapt demonstrat și de alte studii.³⁶

În această lucrare am descris și markerul CD39 și rolul funcțional al acestuia la nivelul subseturilor T de repaus și activate, iar datele indică că CD39 este o parte integrantă a componentei supresoare Treg care se limitează la subsetul de celule Treg de memorie efectoare. Valorile expresiei CD39 se mențin crescute la nivelul lotului LLC în conformitate cu literatura de specialitate, cu o slabă corelație între valoarea absolută CD39 și valoarea absolută FoxP3, însă fără corelație cu valorile lor procentuale. De reținut că valorile procentuale CD39 sunt crescute pentru formele de risc Rai tip precoce/avansat, însă nu s-a găsit vreo corelație în funcție de statusul chimioterapic al pacientului. În concluzie expresia procentuală a markerului CD39 ar putea fi folosită drept marker de prognostic dar nu și ca o condiție în vederea inițierii tratamentului chimioterapic.

În lucrarea de față am întreprins și o analiză a repertoriului de celule T CD4+ și CD8+ în populația de pacienți cu LLC și lotul martor. Raportul populației limfocitare T CD4/CD8 este scăzut în cadrul cazurilor de LLC ($p=0.0306$), cu raport inversat pentru 19% din cazuri, fapt confirmat și de datele din literatură.²⁹ Cazurile de LLC care prezintă raport inversat se asociază cu prognostic nefavorabil, cu un stadiu Rai avansat conform literaturii de specialitate³⁰, însă în lotul de studiu, această corelație cu stadializarea Rai nu se regăsește, fie că este realizată cu toate stadiile Rai sau cu subclasificarea Rai în formele avansat și precoce.

DISCUȚII STUDIUL 2

În cel de-al doilea studiu care a inclus un lot de 28 de pacienți diagnosticați cu LLC și un grup de control format din 17 indivizi sănătoși, am vizat să cercetăm și să analizăm subseturile funcționale T, atât din prisma valorilor absolute cât și procentuale.

Populația limfocitară de celule T cu funcție de memorie efectoare și de memorie centrală, comparare între lotul martor și lotul de pacienți cu LLC, nu a înregistrat nici o diferență semnificativă statistic, nici din punct de vedere al valorii absolute și nici procentual.

În schimb, analiza comparativă a populației limfocitare T cu funcție efectoare a lotului de pacienți cu LLC și lotul martor, a pus în evidență diferențe semnificativ statistic, atât procentuale cât și absolute. Această distincție statistică, a adus în prim plan o scădere a compartimentului de limfocite T efectoare, în detrimentul grupului de pacienți cu leucemie limfocitară cronică. O reducere a numărului de celule T activate poate indica o reducere a stării imunocompetente a pacientului cu LLC.

De asemenea, a fost observată o scădere importantă în compartimentul celulelor T naive în lotul de pacienți cu LLC comparativ cu grupul de control. Celulele T naive sunt celule precursorale ale subseturilor de limfocite T efectoare și de memorie. Scăderea acestui compartiment poate să aibă multiple cauze precum absența sau afectarea refacerii celulelor T sau prejudicierea producției timice.

La evaluarea generală a subseturilor T la pacienții cu LLC față de populația normală s-a observat o depleție a sectorului precoce nefuncțional sau efector (T naive, T efectoare). Însă la evaluarea în funcție de stadializarea Rai generalizată nu s-a înregistrat nici o modificare semnificativ statistică, dar la evaluarea pe grupe de risc (stadiu avansat versus precoce) s-a observat un aspect în oglindă, respectiv corelații semnificativ statistice sau la limită pentru segmentul de memorie centrală de lungă durată și cel de memorie efectoare (celule T de memorie efectoare, celule T de memorie centrală) prin creșterea valorilor procentuale în stadiile avansate, fapt care se asociază cu o încărcătură tumorală crescută, în consecință cu progresia LLC.

În funcție de expunerea la chimioterapie, se observă o creștere a celulelor T CD4 cu funcție de memorie efectoare în lotul de pacienți cu LLC care au fost tratați însă fără o creștere a segmentului de celule T cu funcție efectoare. Această concluzie este superpozabilă cu o altă concluzie pe care o putem regăsi în această lucrare și anume că limfocitele T CD4+ cu funcție de memorie efectoare se regăsesc în număr crescut în stadiul avansat de boală, comparativ cu stadiul precoce, explicația cea mai plauzibilă fiind că în stadiul avansat de boală, pacienți primesc chimioterapie. Celulele T cu funcție de memorie centrală rămân neafectate, însă se remarcă o slabă semnificație statistică pentru segmentul naiv, celulele T naive regăsindu-se în număr scăzut în lotul de pacienți tratați cu chimioterapie comparativ cu lotul de pacienți cu LLC netratați. Cel mai

probabil am putea afirma că există o tentativă de activare a imunității celulare prin creșterea potențialului de recrutare (celule T CD4 naive și CD4 de memorie efectoare), dar fără o creștere a numărului de celule efectorii. (care sunt distruse fie prin consum , fie prin supresie).

În cazul evaluării subpopulațiilor limfocitare T în funcție de statusul IGHV, s-a observat o slabă corelare a valorilor procentuale și absolute a celulelor T CD4 naive, dar și o lipsă totală de corelație ($p=1$) în cazul populațiilor limfocitare T efectoare, fapt care ar putea fi pus pe dimensiunea redusă a lotului de pacienți cu LLC.(28 de pacienți)

Nivelul expresiei CD38 în lotul nostru de studiu nu induce modificări de micromediu la nivelul subseturilor limfocitelor T, rezultate care sunt contradictorii cu literatura de specialitate³². Explicația ar putea fi dată de asemenea de dimensiunea redusă a lotului (15 pacienți) sau de faptul că CD38 este legat strict de funcția de receptor/transductor de semnal, canal de calciu.

În acest studiu am cercetat și expresia celulelor limfocitare T CD4+CD57+ din lotul de LLC și lotul de control sănătos și răspunsul lor funcțional la mai mulți factori. Există o corelație semnificativ statistică atât prin prisma valorilor absolute cât și procentuale ale populației de limfocite T CD4+/CD57+ care sunt crescute în lotul pacienților cu LLC față de lotul martor. Am putea concluziona ca există o activare imună prin celule T CD4 Killer (CD4+/CD57+) la nivelul lotului de pacienți diagnosticați cu LLC, fapt care este în conformitate și cu datele științifice.^{33,34}

În primul studiu s-a realizat analiza comparativă între valoarea absolută CD39 și valoarea absolută FoxP3 și a fost găsită o corelație semnificativă statistic între cei doi markeri care variază în mod direct proporțional, la nivelul întregului lot de studiu, iar o explicație plauzibilă a fost că markerul CD39 ar putea funcționa ca un marker surogat în ceea ce privește identificarea Treg-urilor mai precis celulele Treg efectoare de memorie.

În această lucrare s-a studiat și relația între producția de limfocite T CD4+/CD57+ care prezintă atât caracteristici efectoare cât și de memorie³³ și limfocite T CD4+/CD39+ care au funcție efectoare de memorie. Sub-populația limfocitară T CD4+/CD57+ se corelează semnificativ statistic cu sub-populația limfocitară T CD39+ și variază invers proporțional. Pe măsură ce crește influența de imunosupresie a micromediului prin CD4+/CD39+, valorile limfocitelor T Killer CD4+/CD57+ ar trebui să fie în scădere, însă în cadrul lotului nostru, nu a fost observată o diminuare semnificativă statistic o dată cu creșterea stadiului de boală.

În absența unei corelații semnificativ statistice a nivelului expresiei CD4+/CD57+ în funcție de grupele de risc, se observă însă o corelație de invers proporționalitate între diminuarea valorilor expresiei CD4+/CD57+ și creșterea valorilor expresiei CD4+/CD39+, adică o scădere a funcției efectoare cu creșterea funcției de memorie efectoare. Această corelație statistică, aduce în prim plan o scădere a compartimentului de limfocite T efectoare, în grupul de pacienți cu leucemie limfocitară cronică, concluzie care este consolidată și de alte statistici care se regăsesc pe parcursul

studiului doi, și care aduce în prim plan reducerea numărului de celule T activate care poate justifica starea de imunodeficiență a pacientului cu LLC.

CONCLUZII GENERALE

1. În lotul nostru de studiu s-a remarcat o preponderență a sexului masculin față de sexul feminin în privința diagnosticului de leucemie limfocitară cronică, iar mediana perioadei de evoluție de când pacientul a fost diagnosticat cu LLC și până la momentul înrolării în doctorat a fost de 4,8 ani.
2. Sexul nu reprezintă un factor de risc în ceea ce privește stadiul Rai, inclusiv împărțirea pe grupe de risc tip precoce/avansat.
3. Distribuția lotului de studiu în funcție de statusul IGHV, a relevat o predominanță a pacienților cu LLC fără mutație în genele IGHV care asociază un prognostic clinic mai nefavorabil, față de statusul IGHV mutant.
4. În lotul de studiu s-a observat că 10% dintre pacienții cu LLC au prezentat deleția TP53, care se asociază cu o supraviețuire clinică inferioară.
5. Din analiza lotului de studiu 21% dintre pacienți sunt CD38 pozitivi, factor de prognostic negativ, iar sexul și stadiul Rai nu reprezintă factor de risc pentru nivelul expresiei CD38.
6. Valorile procentuale Treg FoxP3/Helios se corelează statistic cu subclasificarea Rai precoce/avansat, în favoarea formelor avansate, însă chimioterapia nu pare să influențeze procentul de celule Treg caracterizate prin expresia FoxP3/Helios.
7. Statusul IGHV nu influențează frecvența sau funcția inhibitorie a celulelor T regulatorii.
8. Există o corelație semnificativă statistic între valoarea absolută CD39 și valoarea absolută FoxP3, care variază în mod direct proporțional iar în cazul valorilor procentuale CD39 pentru grupa de risc Rai avansată se observă o creștere semnificativă statistic.
9. Markerul CD39 ar putea fi utilizat ca un posibil factor de prognostic, dar nu și ca o condiție în vederea inițierii tratamentului chimioterapic, fapt care ar putea avea o însemnătate în evoluția leucemiei limfocitare cronice.
10. Raportul populației limfocitare T CD4/CD8 scăzut, precum și raportul inversat pentru cele 19% din cazuri, nu se corelează cu statusul pacientului cu LLC tratat versus netratat și nici cu factorii de prognostic precum statusul IGHV sau del TP53.

11. În cadrul subseturilor T funcționale din lotul de LLC comparativ cu grupul de control, s-a observat o scădere a valorilor absolute și numerice pentru segmentele de populație T cu funcție efectoră și T naive.
12. Evaluarea generală a subseturilor T, lot cu LLC față de populația normală relevă o depleție a sectorului precoce nefuncțional sau efector (T naive, T efectoră).
13. Numărul de linii de chimioterapie cumulate, nu influențează compartimentul funcțional al limfocitelor T.
14. În lotul nostru de studiu nivelul expresiei CD38 nu induce modificări de micromediu la nivelul subseturilor limfocitare T.
15. Valorile absolute și procentuale ale populației de limfocite T CD4+/CD57+ sunt crescute în lotul pacienților cu LLC față de lotul martor și am putea concluziona că există o activarea imună prin celule T CD4 Killer (CD4+/CD57+) la nivelul lotului nostru de pacienți cu LLC.
16. Sub-populația limfocitară T CD4+/CD57+ se corelează semnificativ statistic cu sub-populația limfocitară T CD39+ și variază invers proporțional.
17. Se observă o corelație de invers proporționalitate între diminuarea valorilor expresiei CD4+/CD57+ și creșterea valorilor expresiei CD4+/CD39+, adică o scădere a funcției efectoră cu creșterea funcției de memorie efectoră.

Bibliografie :

1. Deepesh P. Lad, Subhash Varma, Neelam Varma et al. Regulatory T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia: their role in disease progression and autoimmune cytopenias, *Leukemia & Lymphoma*, May 2013; 54(5): 1012–1019
2. Camilla A. Lindqvist and Angelica S. I. Loskog T regulatory cells in B-cell malignancy – tumour support or kiss of death *Immunology* 2011, 135, 255–260
3. Giovanni D’Arena, Candida Vitale, Marta Coscia, Agostino Festa, Nicola Matteo Dario Di Minno, Vincenzo De Feo, Michele Caraglia, Gioacchino Calapai, Luca Laurenti, Pellegrino Musto, Giovanni Di Minno, and Daniela Fenoglio Regulatory T Cells and Their Prognostic Relevance in Hematologic Malignancies *Hindawi Journal of Immunology Research* Volume 2017, Article ID 1832968, 13 pages
4. T. L. Whiteside, The role of regulatory T cells in cancer immunology, *ImmunoTargets and Therapy*, vol. 4, pp. 159– 171, 2015
5. Rodolfo Patussi Correiaa, Flávia Amoroso Matos e Silva, Nydia Strachman Bacal, Paulo Vidal Campregher, Nelson Hamerschlag, Gustavo P. Amarante-Mendes Involvement of memory T-cells in the pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2014;36(1):60-64
6. Jessie-F. Fecteau, Thomas J. Kipps, Structure and function of the hematopoietic cancer niche: focus on chronic lymphocytic leukemia *Front Biosci (Schol Ed)*.(2004) ; 4: 61–73.
7. Jan A. Burger, Paolo Ghia, Andreas Rosenwald, and Federico Caligaris-Cappio The micro-environment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies *Blood*. 2009; 114:3367-3375
8. Martijn HA van Attekum, Eric Eldering and Arnon P Kater Chronic lymphocytic leukemia cells are active participants in microenvironmental cross-talk *Haematologica* 2017 Volume 102(9):1469-1476
9. Caligaris-Cappio F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 2003, Nov, 123, 380–388.
10. **Georgiana Ene**, Ion Dumitru, Horia Bumbea ,Ana-Maria Vlădăreanu, Regulatory T cells and the microenvironment of the malignant B cell of chronic lymphocytic leukemia June 2019 *Romanian Medical Journal* 66(2):132-141
11. Michele Dal Bo, Riccardo Bomben, Antonella Zucchetto, Giovanni Del Poeta, Gianluca Gaidano, Silvia Deaglio, Dimitar G. Efremov and Valter Gattei, Microenvironmental Interactions in Chronic Lymphocytic Leukemia: Hints for Pathogenesis and Identification of Targets for Rational Therapy, *Current Pharmaceutical Design*, 2012, 18, 3323-3334

12. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, Grunn A, Fangazio M, Capello D, Monti S. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208:1389-1401
13. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, Marasca R, Laurenti L, Brusca A, Cerri M. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119:521-529.
14. Rossi D, Brusca A, Spina V, Rasi S, Khiabani H, Messina M, Fangazio M, Vaisitti T, Monti S, Chiaretti S. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011;118:6904-6908.
15. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood* 2011; 117: 1781-91.
16. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 995-1004
17. Angélique Biancotto, Pradeep K Dagur, John C Fuchs, Adrian Wiestner, C Bruce Bagwell, and J Philip McCoy Jr Phenotypic complexity of T regulatory subsets in patients with B-chronic lymphocytic leukemia *Mod Pathol* . 2012 February ; 25(2): 246–259.
18. Beyer M, Kochanek M, Darabi K, et al. Reduced frequencies and suppressive function of CD4+ CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine . *Blood* 2005; 106: 2018– 2025
19. Giannopoulos K, Schmitt M, Wlasiuk P, et al. The high frequency of T regulatory cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia is diminished through treatment with thalidomide. *Leukemia*. 2008; 22:222–224.
20. Tam CS, O'Brien S, Wierda W, et al. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008;112(4): 975-980.
21. Eduardo S. Cantú, John R. McGill, Christine F. Stephenson, Heidi M. Hoffmann, Lihua Tang, Jim Yan, and Armand B. Glassman Male-To-Female Sex Ratios of Abnormalities Detected by Fluorescence in Situ Hybridization in a Population of Chronic Lymphocytic Leukemia, *Patients Hematol Rep*. 2013 Jan 25; 5(1): 13–17.
22. T J Hamblin, Z Davis, A Gardiner, D G Oscier, F K Stevenson Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia *Blood*. 1999 Sep 15;94(6):1848-54.

23. J Malcikova , E Tausch D Rossi , L A Sutton T Soussi , T Zenz , A P Kater , C U Niemann , D Gonzalez , F Davi , M Gonzalez Diaz , C Moreno , G Gaidano , K Stamatopoulos , R Rosenquist , S Stilgenbauer , P Ghia , S Pospisilova . ERIC recomandations for TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia-update on methodological approaches and results interpretation Review Leukemia 2018 May; 32(5):1070-1080
24. **Georgiana Ene**, Ion Dumitru, Horia Bumbea, Minodora Onisâi, Ana-Maria Vlădăreanu Correlation of regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia characterized by high-affinity CD25 expression with serum IL-2 values, IGVH mutational status, Rai stage, and therapeutic lines / Corelația celulelor T de reglementare din leucemia limfocitară cronică caracterizate prin expresia cu afinitate ridicată CD25 cu valorile IL-2 serice, status mutațional IGVH, stadiul Rai și linii terapeutice Ref: Ro Med J. 2020;LXVII(3).
25. Giannopoulos K, Schmitt M, Kowal M, et al. Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Rep.* 2008; 20:677–682.
26. K. M. Dwyera,c,1, D. Hanidziard,1, P. Puthetid,1,P. A. Hillb, S. Pommeya,J.L.Mc Raea,A. Winterhaltera, G. Dohertyd,S.Deaglio,e,M. Koulmandad,W.Gaod, S. C. Robsond, and T.B.Stromd, Expression of CD39 by Human Peripheral BloodCD4+CD25+T Cells Denotes a Regulatory Memory Phenotype *American Journal of Transplantation* 2010; 10: 2410–2420 Wiley Periodicals Inc
27. Dianne Pulte, Richard R.Furman, M. Johan Broekman, Joan H.F.Drosopoulos, Harold S.Ballard, Kim E.Olson, Jorge R.Kizer, Aaron J.Marcus, CD39 Expression on T Lymphocytes Correlates With Severity of Disease in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia , Elsevier *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, Volume 11, Issue 4, August 2011, Pages 367-372
28. D. Serrano, J. Monteiro, P. Gregersen Clonal expansion within the CD4+CD57+ and CD8+CD57+ T cell subsets in chronic lymphocytic leukemia.-Abstract Published 1997 *Biology, Medicine Journal of immunology*
29. Jiazhu Wu,1,2,3 Xiaojing Xu,4 Eun-Joon Lee,3 Austin Y. Shull,3,5 Lirong Pei,3 Farrukh Awan,6 Xiaoling Wang,4 Jeong-Hyeon Choi,3 Libin Deng,7 Hong-Bo Xin,7 Wenxun Zhong,8 Jinhua Liang,1,2 Yi Miao,1,2 Yujie Wu,1,2 Lei Fan,1,2 Jianyong Li,1,2 Wei Xu,1,2 and Huidong Shi3,5 Phenotypic alteration of CD8⁺ T cells in chronic lymphocytic leukemia is associated with epigenetic reprogramming, *Oncotarget.* 2016 Jun 28; 7(26): 40558–40570.
30. Georgiana E. Grigore, Angela Dascalescu, Mihaela Zlei, Iuliu C. Ivanov, Catalin Danaila, Tudor Petreus, Eugen Carasevici Rai stage-related changes within T/NK cell populations from B-CLL patients *Revista Română de Medicină de Laborator* Vol. 21, Nr. 3/4, Septembrie 2013

31. Todd N. Eagar, Stephen D. Miller Helper T-Cell Subsets and Control of the Inflammatory Response in Clinical Immunology (Fifth Edition), 2019
32. Claudia Sandoval-Montes Leopoldo Santos-Argumedo CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines Journal of Leukocyte Biology Volume 77, April 2005
33. Hassen Kared, Serena Martelli, Tze Pin Ng, Sylvia L.F. Pender, Anis Larbi, CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes Cancer Immunol Immunother
34. Van den Hove LE, Vandenberghe P, Van Gool SW, Ceuppens JL, Demuyneck H, Verhoef GE, Boogaerts MA (1998) Peripheral blood lymphocyte subset shifts in patients with untreated hematological tumors: evidence for systemic activation of the T cell compartment. Leuk Res 22(2):175–184
35. Serrano, D., Monteiro, J., Allen, S.L., Kolitz, J., Schulman, P., Lichtman, S.M., et al. (1997) Clonal expansion within the CD4+CD57+ and CD8+CD57+ T cell subsets in chronic lymphocytic leukemia, J. Immunol., 158, 1482–1489.
36. Farhad Jadidi-Niaragh, Mehdi Yousefi, Ali Memarian, Mohammad Hojjat-Farsangi, Jalal Khoshnoodi, Seyed Mohsen Razavi, Mahmood Jeddi-Tehrani, and Fazel Shokri Increased Frequency of CD8+ and CD4+ Regulatory T Cells in Chronic Lymphocytic Leukemia: Association with Disease Progression Cancer Investigation, 31:121–131, 2013