

**INSTITUȚIA MEDICO-SANITARĂ PUBLICĂ
INSTITUTUL ONCOLOGIC**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.: 616.411-006.441-07

NICORICI ALIONA

**PARTICULARITĂȚILE IMUNOLOGICE ȘI IMUNOFENOTIPICE
ALE LIMFOAMELOR NON – HODGKIN**

321.20 – ONCOLOGIE ȘI RADIOTERAPIE

Autoreferat (rezumat) /referat științific al tezei de doctor în științe medicale

CHIȘINĂU, 2019

Teza a fost elaborată în cadrul Laboratorului Imunogenetic al IMSP Institutul Oncologic din Republica Moldova

Conducător științific: STRATAN Valentina, dr. șt. biol., conf. cercet.

Consultant științific: CORCIMARU Ion, dr. hab. șt. med., prof. univ., membr. cor. AȘM

Referenți oficiali:

Țurea Valentin - dr. hab. șt. med., prof. univ., IP USMF "NICOLAE TESTEMIȚANU"

Musteață Vasile - dr. șt. med., conf. univ., IP USMF "NICOLAE TESTEMIȚANU"

Membri ai consiliului științific specializat:

Țîbîrnă Gheorghe, **președinte**, dr. hab. șt. med., prof. univ., acad. al AȘM

Robu Maria, **secretar**, dr. șt. med., conf. univ.

Andrieș Lucia - dr. hab. med., prof. univ.

Mereuță Ion - dr. hab. șt. med., prof. univ.

Gudumac Valentin - dr. hab. șt. med.

Sustinerea va avea loc la data de 30. 05. 2019 la ora 14.⁰⁰ în ședința Consiliului științific specializat D 321.20–59 din cadrul IMSP Institutul Oncologic (str. N. Testemițanu nr. 30, mun. Chisinau, MD 2025, Republica Moldova).

Teza de doctor în științe medicale și autoreferatul (rezumatul) /referatul științific pot fi consultate la bibliotecă IMSP Institutul Oncologic și pe pagina web a ANACEC- ului.

Autoreferatul (rezumatul) /referatul științific a fost expediat la 02. 05. 2019

Secretar științific

al Consiliului Științific Specializat,
dr. șt. med., conf. univ.

_____ **Robu Maria**

Conducător științific

dr. șt. biol., conf. cercet.

_____ **Stratan Valentina**

Consultant științific

dr. hab. șt. med., prof. univ.,
membr. cor. AȘM

_____ **Corcimaru Ion**

Autor

Nicorici Aliona

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII. Ошибка! определена.....4	Закладка	не
CONȚINUTUL TEZEI		8
CONCLUZII GENERALE		20
RECOMANDĂRI PRACTICE		21
BIBLIOGRAFIA		22
LISTA PUBLICAȚIILOR LA TEMA TEZEI.....		24
ADNOTARE (ÎN ROMÂNĂ, RUSĂ ȘI ENGLEZĂ).....		27
ANEXĂ(1).....		30

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Limfomul non-Hodgkin (LNH) prezintă proliferarea clonală necontrolată a precursorilor limfoizi imaturi, care își pierd capacitatea de diferențiere și determină hipertrofia organului limfoid care le găzduiește. Cea mai importantă celulă a țesutului limfoid este limfocitul, care aparține liniei albe cu două tipuri principale de limfocite: limfocitul B și limfocitul T [9, 11].

O cauză specifică în identificarea LNH nu se cunoaște, deși oamenii de știință au stabilit faptul că, acest tip de cancer poate fi asociat cu prezența unor factori de risc crescut, cum ar fi:

- **Imunodeficiența congenitală**
 - ataxie telangiectazie
 - sindrom Wiskott- Aldrich
 - sindrom Chediak – Higashi
- **Imunodeficiența dobândită**
 - transplant de organe sau celule
 - imunosupresia iatrogenă (Azathioprina, Ciclofosfamida, Prednison, Ciclosporină)
 - sindromul de imunodeficiență dobândită (SIDA/ HIV) [8, 10, 18].

Studiile imunofenotipice, din punct de vedere statistic vor evidenția faptul că LNH derivă din următoarele linii celulare:

- Majoritatea, peste 90%, din cazuri cu celule B, exprimând Ig de suprafață,
- 10% linia celulară T;
- $\geq 10\%$ neoplazii timpurii ale celulelor B, fără exprimare a Ig de suprafață [20, 21, 23].

Circa 1,5 milioane persoane din întreaga lume trăiesc în prezent cu limfom non-Hodgkin.

Totodată în fiecare an aproximativ 300.000 persoane mor din cauza acestei boli. Incidența bolii se ridică la aproximativ 7% pe an. Boala apare preponderent la adulți, cu o frecvență ridicată la persoane cu vârste cuprinse între 45 și 60 ani.

LNH se situează pe locul 6 în structura morbidității hemoblastozelor, printre bărbați și femeii. Datorită achizițiilor terapeutice în acest domeniu, supraviețuirea a crescut semnificativ în ultimii 20 ani, astfel rata de supraviețuire globală la 5 ani este de 70% în timp ce supraviețuirea la 10 ani este de 60%.

Conform datelor furnizate de SEER numărul cazurilor noi de boală a crescut constant în ultimii 20 - 30 de ani, reprezentând o cauză frecventă de mortalitate prin cancer în țările vestice industrializate.

Astfel indicile morbidității de LNH în Republica Moldova constituie 4,1‰, pentru sexul masculin 4,7‰ versus sexul feminin - 3,6‰.

Morbiditatea crește odată cu vârsta, atingând apogeul la persoanele cuprinse între 49 - 52 ani și cu particularități de răspândire teritorială, crește frecvența formelor agresive la tineri [9, 18].

Limfoamele non-Hodgkin pot avea spectre diferite de manifestare a bolii, cu o multitudine de simptome clinice asociate și o agresivitate clinică diversă, ceea ce face clasificarea tumorilor limfoide uneori dificilă, iar estimarea unui tratament personalizat doar prin folosirea unui sistem de gradare generic, bazat numai pe date morfologice, deseori este imposibilă. Caracteristicile imunologice și imunofenotipice ale LNH sunt puțin elucidate și prezintă o problemă actuală.

Deși majoritatea pacienților cu limfom non-Hodgkin B-celular pot fi vindecați cu rituximab, ciclofosamidă, doxorubicină, vincristină și prednisolon (R-CHOP), iar cei care nu administrează schema R-CHOP au un rezultat discret [3, 6, 7, 25].

Astfel, optimizarea terapiei de primă linie, precum și dezvoltarea unor strategii de salvare mai eficiente, rămâne unul din obiectivele importante în obținerea remisiilor complete în LNH [11, 12, 15].

Progresele în genetica moleculară au îmbunătățit considerabil înțelegerea noastră asupra diversității biologice a LNH B-celulare și au condus la descoperirea unor noi căi oncogene cheie. În plus față de denumirile moleculare majore ale subtipurilor celulelor B din centrul de germeni și ale subtipurilor de cellule B activate, tehnologiile de secvențiere din generațiile următoare au dezvăluit complexitatea remarcabilă a LNH B-celulare și au identificat ținte moleculare unice care pot fi exploatate diferențial pentru beneficii terapeutice [10, 11, 12, 14, 15].

Îmbunătățirea prognosticării și disponibilitatea biomarkerilor predictivi va fi una din căile cruciale ce ne va da posibilitatea dezvoltării unei terapii individualizate adaptate la risc [19, 22].

Scopul lucrării: Studiarea și analiza în dinamică a parametrilor imunobiologici și imunofenotipici la bolnavii cu LNH înainte și după tratamentul aplicat, pentru a demonstra și a argumenta valoarea științifică a factorilor predictivi, întru îmbunătățirea ratei de supraviețuire pe termen lung și recunoașterea remisiilor imunologice și imunofenotipice în alegerea unor metode de tratament personalizat.

Obiectivele lucrării:

1. Evaluarea și analiza indicilor: imunobiologici și imunofenotipici la etapele de diagnostic, tratament și remisie a bolnavilor cu LNH;
2. Analiza malignizării și diferențierii fenotipice a liniilor celulare B și T a LNH prin prisma Ac – monoclonali (AcMo);

3. Identificarea factorilor de pronostic și acțiune predictibilă a răspunsului imun la terapia aplicată și aprecierea remisiei imunologice;
4. Elaborarea, brevetarea, certificarea, implementarea unor metode noi de diagnostic și motitorizarea în tratamentul țintă a LNH în vederea menținerii remisiilor clinice, imunofenotipice și imunologice.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare utilizate:

A fost efectuat un studiu imunologic și imunofenotipic retrospectiv cu un component prospectiv, în cadrul căruia au fost utilizate metode de cercetare imunologice și imunofenotipice specifice în determinarea concentrației totale a claselor de imunoglobuline A, M și G și marcarea limfocitelor cu AcMo (CD19, CD20, CD3, CD5) cu ajutorul microscopiei în câmp întunecat, precum și a procedurilor statistice.

Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute

Am stabilit date semnificativ statistice, privind corelațiile dintre variația factorilor demografici, clinico-biologici și imunofenotipici cu ratele de supraviețuire crescute în dezvoltarea ulterioară a procesului malign la una din generațiile viitoare și de răspuns la terapie cu pronostic favorabil. Analiza datelor imunologice și imunofenotipice, în funcție de tratamentul aplicat și numărul curelor PCHT utilizate, va oferi posibilitatea optimizării protocoalelor terapeutice aplicate cu elemente noi. Administrarea permanentă a consumului de preparate medicamentoase în formele rezistente de LNH indică reapariția recidivelor, ceea ce ne solicită căutarea a noi scheme de tratament PCHT cu includerea de medicamente specifice și în necesitatea dezvoltării ulterioare a tratamentului personalizat. Vom susține importanța centralizării datelor, în scopul creării unui Registru Național complet, cu o evidență clară a pacienților prin LHN, de la diagnostic până la sfârșitul evoluției bolii, pentru fixarea unor protocoale adaptate factorilor de pronostic și cu evidențierea particularităților de evoluție a bolii.

Problema științifică soluționată

Analiza în dinamică a expresiei antigenice de diferențiere limfoidă, cu exprimare, mai mult sau mai puțin, a acelor anticorpi monoclonali ce vor determina predominarea liniei celulare în LNH, în recunoașterea noilor strategii terapeutice indiscutabile, cu efect optim în creșterea semnificativă a ratei de remisiune și duratei remisiunii, scăderea ratei de recăderi, timp de progresie mai lung pentru reducerea procentului de malignizare a LNH și creșterea supraviețuirii totale.

Se va realiza o densitate suficientă de antigeni de pe celulele țintă cu o mare stabilitate a acestora pentru a obține o eficiență maximă în terapia cu AcMo, întrucât majoritatea tratamentelor bazate pe AcMo sunt dependente de caracteristicile antigenelor țintă de pe celulele tumorale. Utilizarea AcMo himerici sau umani, care au timpul de înjumătățire mai mare

comparativ cu cei murini, a diminuat respingerea imună, facilitând o acțiune clinică deosebit de eficientă.

Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a lucrării

În baza rezultatelor științifice concludente, obținute în studiu, s-a stabilit expresia ridicată a AcMo (CD19, CD20) din totalitatea cazurilor cercetate de LNH și pentru majoritatea cazurilor cercetate am determinat predominarea liniei celulare B și doar în unice cazuri s-a stabilit expresia pronunțată a AcMo (CD3 și CD5), stabilind linia celulară T cu o manifestare clinică mai agresivă, comparativ celei B-celulare. În monitorizarea ciclică a valorilor imunoglobulinelor din clasele M, G și A după fiecare etapă de finalizare a protocolului terapeutic, după 3 și 6 cicluri de PCHT, remarcăm tendința de scădere a acestora, cu diminuarea răspunsului imun al organismului.

Sistemul imun reprezintă partea temeinică a micromediului tumoral, cu care tumora exprimă un schimb permanent de semnale biologice. Răspunsul imun, particular celui mediat de celulele T-killer și cele ale sistemului imun înăscut poate fi un mecanism eficace în apărarea anti-tumorală. Neoformațiunea poate altera activitatea sistemului imun, care poate coopera în creșterea și dezvoltarea tumorală.

De asemenea, a fost argumentat științific predispunerea persoanelor la dezvoltarea LNH, la care se determină genotipul Arg/Arg al codului genei XRCC1 suplimentar, fiind determinat și raportul IgM și IgG. În cazul în care raportul constituie 0,03... 0,24, se constată predispunerea persoanei cercetate să dezvolte LNH, iar în cazul când raportul a devenit mai mare de 0,25 posibilitatea dezvoltării LNH este redusă.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere

- Determinarea titrului de celule maligne a liniilor celulelor B și T la bolnavii cu LNH, pentru crearea tratamentului țintă;
- Tratamentul personalizat, bazat pe indici imunologici și imunofenotipici, în scopul micșorării recidivelor și majorării remisiilor.

CONȚINUTUL TEZEI

În **Capitolul 1 "Conceptele contemporane în diagnosticul LNH"** se va analiza publicațiile curente la tema tezei sub aspectul științifico-istoric a LNH, a oncogenezei, a proceselor evolutive în diagnosticul LNH, cercetările imunologice și imunofenotipice existente și se va discuta perspectivele în diagnosticul de astăzi a LNH.

Diagnosticul precoce și evaluarea pronosticului bolii canceroase sunt, deci, două dintre aplicațiile clinice majore ale metodei de imunofenotipare.

Fenotipul, reprezintă totalitatea caracteristicilor fizice, fiziologice, biochimice ale unei celule sau ale unui organism. S-a constatat faptul că o serie de antigene exprimate de populația neoplazică pot avea semnificație prognostică [10, 11, 18].

Evaluarea fenotipului celulelor tumorale prin metoda de imunofenotipare indirectă constituie una din fragmentele "puzzle-lui" de diagnostic a bolilor limfoproliferative. Metoda permite identificarea antigenelor grupate în sistemul de clasificare CD, utilizând anticorpii monoclonali care se fixează pe antigenele corespunzătoare [13, 19, 23, 25].

Determinarea liniei fenotipice a celulelor tumorale prin imunofenotipare devine o parte integrantă indiscutabilă a diagnosticului în hematologie. Metoda se referă la o tehnică de identificare a moleculelor grupate în sistemul de clasificare în CD, care sunt asociate cu celulele limfomului și care ajută la caracterizarea lor. Moleculele sunt identificate în toate cazurile analizate, deoarece, ele sunt exprimate pe membrana suprafeței celulare externe. Acestea sunt marcate prin utilizarea anticorpilor specifici care se leagă în mod deosebit [19, 20, 25].

Anticorpii însăși au fost manipulați astfel încât să poarte fragmente artificiale de receptori. Tehnica de imunofenotipare poartă acest nume din două motive:

1. Este dependentă de activitatea anticorpilor, care sunt substanțe imunologice;
2. Se utilizează în special pentru a identifica celulele limfoide și hematopoietice care fac parte din sistemul imunitar.

Cum funcționează această metodă:

1. O soluție de anticorpi, numită ser, se toarnă asupra celulelor limfomului, care este în suspensie lichidă.
2. Dacă celulele limfomului poartă molecule, antigene, pentru care anticorpii sunt specifici, anticorpii se leagă de celule.
3. Celulele sunt spălate pentru a preveni legarea nespecifică, anticorpii specifici rămân legați.
4. Celulele cu anticorpii legați sunt manipulați astfel încât fragmentul reporter atașat la anticorpi își declară prezența, specimentul dat se examinează sub un microscop fluorescent, iar celulele cu anticorpii legați vor străluci în întuneric [12, 13, 15, 19].

Imunofenotiparea este determinată și recomandată ca una din strategiile ideale în detectarea exactă a fenotipului limfoproliferărilor neoplazice și poate ajuta la stadializarea și la detectarea bolii minim reziduale. În plus, față de utilizarea sa în diagnostic, imunofenotiparea poate servi drept punct de plecare în selecția unei terapii țintite, precum și în determinarea momentului de apariție și instalare a remisiilor imunologice și imunofenotipice [10, 11].

Limfocitele B și T sunt diferențiate de un proces complex, a căror funcții cu punct de control este de a asigura o protecție rapidă și eficientă a gazdei de o varietate de agresiuni externe, precum și de un astfel de atac asupra celulelor gazdă. Ciclul celular al acestora și moartea lor trebuie să fie un proces reglementat, astfel, încât numărul limfocitelor să fie suficiente pentru combaterea acestor agresori (infecții), dar nu atât de numeroase ca să fie o povară pentru menținerea ciclului celular în normă. Importanța acestui proces este determinată de trei aspecte: 1. imunitatea pentru a răspunde pentru stimuli din afară ce reglementează activarea și divizarea rapidă a ciclului celular; 2. repararea AND-ului ce va contracara erorile din rearanjarea genei receptorului de deviere celulară sau limfocitară; 3. moartea celulelor care nu sunt capabile să îndeplinească punctele de control ale ciclului celular cu eliminarea ulterioară a lor și/sau să reducă autoimunitatea [1, 2, 8, 14, 15, 19].

În **Capitolul 2 “Caracteristica materialului de observație clinică, de laborator și a metodelor de cercetare”** se va prezenta caracteristica generală a lotului studiat și a metodologiei cercetărilor efectuate. În scopul asigurării reprezentativității lotului de cercetare, conform formulei de calculul a studiului descriptiv, în cercetare au fost incluși 122 pacienți, diagnosticați cu LNH confirmat histopatologic și/sau imunohistochimic cu prezentarea indicelui de proliferare (Ki-67). În rezultat s-a creat următorul dizain al studiului cu criteriile de includere și criteriile de excludere (Fig. 2.1)

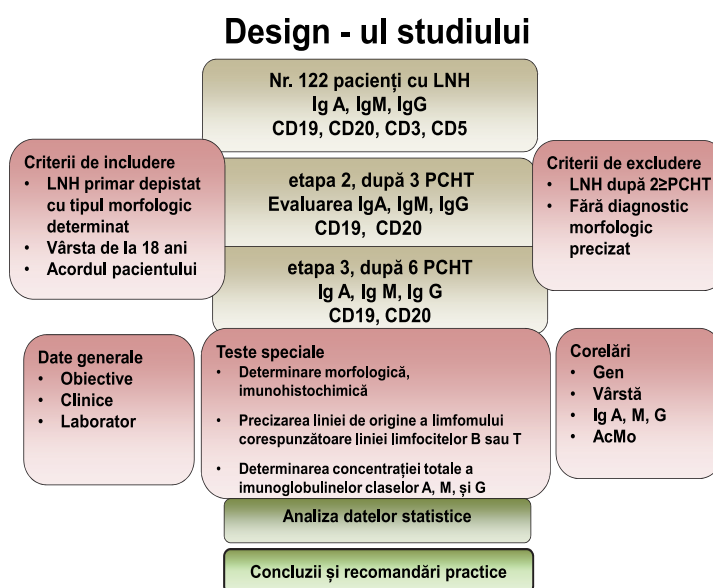


Figura 2.1 Designul studiului

După efectuarea unei raportări procentuale a pacienților din lotul suspus cercetării, se atestă un rezultat ce conservă tendința generală, astfel pentru grupul de vârstă 41-50 de ani, distribuția este de 1,7 bărbați la o femeie și pentru vârsta mai mare de 71 ani raportul este de 1,5 bărbați la o femeie. Și, totuși pentru majoritatea absolută în grupele de vârstă 51-70 ani și 21-40 ani raportul calculat practic este identic, cu divergențe nesemnificative. (Fig. 2.2)

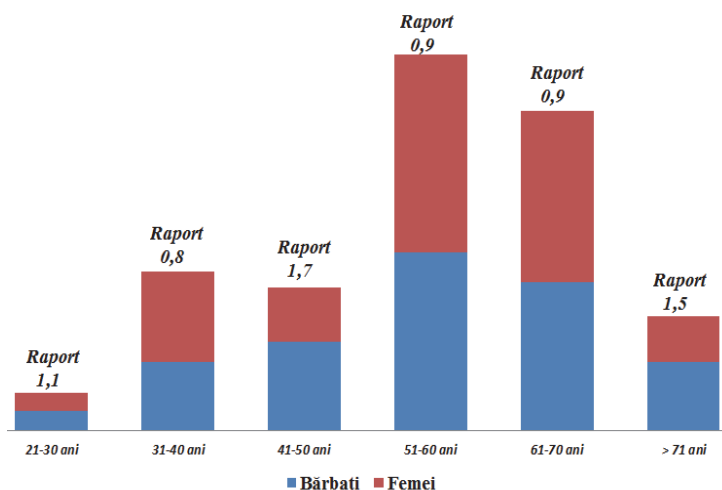


Figura 2.2 Raportul pe gen și vârstă al pacienților incluși în cercetare

Datele studiate în continuare menționează, cu siguranță, că în totalitatea lotului cercetat, persoanele tinere, cu vârsta până la 50 ani constituie 29 % din totalitatea dată, ceea ce constituie 1/3, ce ne poate pune în evidență fenomenul de "întinerire" a bolii și merită de tratat cu o deosebită atenție, fapt relevat în tabelul 2.1.

Tabelul 2.1 Distribuția lotului cercetat conform grupelor de vârstă

Grupele de vârstă (ani)	№ abs.	(%)	E. st ± %
21 – 30	4	3,28	± 1,61
31 -40	17	13,93	± 3,14
41 -50	15	12,30	± 2,97
51 -60	40	32,79	± 4,25
61 – 70	34	27,87	± 4,06
≥ 71	12	9,84	± 2,70
Total	122	100,0	

În conformitate cu cercetarea mediului de proveniență a lotului analizat am urmărit o următoare distribuție, cu o predominare semnificativ crescută a mediului urban comparativ mediului de proveniență rural. (Fig. 2.3)

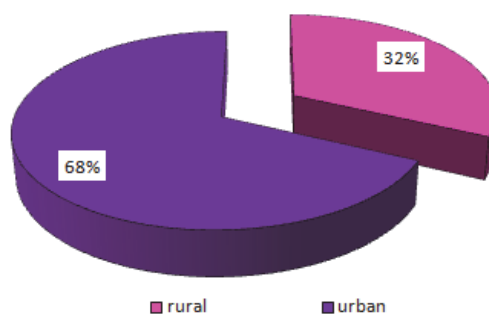


Figura 2.3 **Repartizarea lotului confor mediului de proveniență**

Prin analiza univariată a lotului de studiu cercetat, s-a pus în evidență recunoașterea prevalenței stadiilor avansate asupra celor locale cu 52% stadiul IV-IVA-IVB-IVEA asupra stadiului I-IA-IEA cu 9%. (Fig. 2.4)

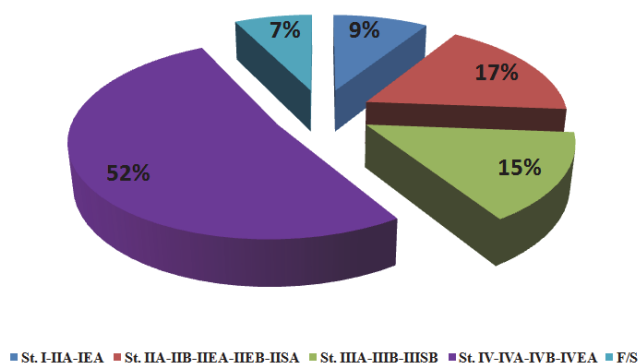


Figura 2.4 **Distirbuția stadiilor de LNH din lotul de cercetare**

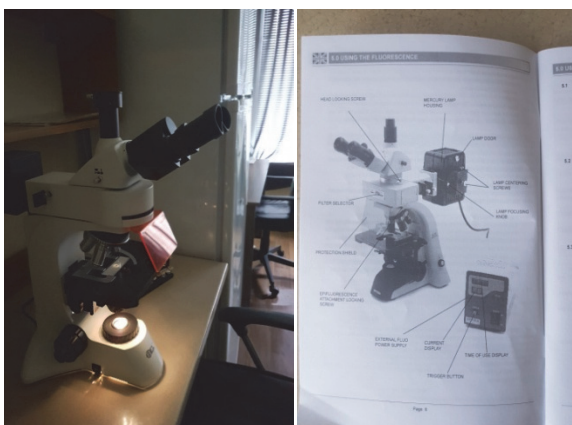
La fel, rezultatele analizelor concludente au permis identificarea în lotul urmărit a variatelor subtipuri morfologice de limfoame non – Hodgkin incluse în cercetare. Astfel, limfomul non – Hodgkin cu varianta prolomfocitară/difuz/nodulară a reprezentat subtipul cel mai răspândit (32,0%); pe când subtipurile de limfom non - Hodgkin limfoblastic și limfocitar au manifestat o răspândire egală (3,3%), date relatate în tabelul 2.2.

Tabelul 2.2 **Tipurile morfologice ale LNH**

Tipul morfologic prezent	№ abs.	(%)	E.st ± %
<i>LNH prolomfocitar/difuz/nodular</i>	39	32,0	4,2
<i>LNH limfoblastic</i>	32	26,2	4,0
<i>LNH difuz/difuz cu celule mici</i>	13	10,7	2,8
<i>LNH limfoblastic cu afectarea ggl./organelor</i>	8	6,6	2,2
<i>LNH B-celular</i>	6	4,9	2,0
<i>LNH folicular</i>	6	4,9	2,0
<i>LNH microlimfoblastic/macrolimfoblastic</i>	6	4,9	2,0
<i>LNH limfoblastic B celular</i>	4	3,3	1,6
<i>LNH limfocitar</i>	4	3,3	1,6
<i>Alte forme</i>	4	3,3	1,6
TOTAL	122	100,0	

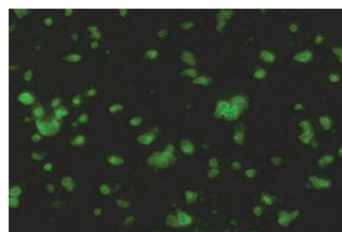
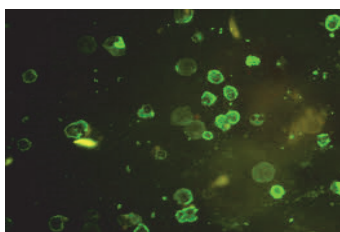
Caracteristica generală a metodelor de cercetare ce au stat la baza desfășurării și realizării studiului dat au fost elucidate în felul următor: metode clinice și metode de laborator de cercetare a pacienților. Din cele de laborator fac parte: - imunofenotiparea limfocitelor cu anticorpi monoclonali prin metoda de imunofluorescență indirectă; - determinarea imunologică a concentrației totale a claselor de imunoglobuline A, M și G în serul sanguin la pacienții incluși în studiu.

Imunofenotiparea limfocitelor cu anticorpi monoclonali s-a analizat prin metoda de imunofluorescență indirectă cu ajutorul microscopiei luminescente în câmpul întunecat, realizată prin stricta evidență și parcurgere vigilentă a tuturor etapelor de analiză. (Fotografia 2.1, 2.2)



Fotografia 2.1, 2.2 **Microscopul OPTICA B – 353 FL de numărare a limfocitelor marcate cu AcMo**

În rezultatul vizualizării frotiului obținut a limfocitelor marcate cu AcMo în câmpul întunecat vom vedea următoarele imagini. (Fotografia 2.3, 2.4)



Fotografia 2.3, 2.4 **Limfocite marcate cu AcMo în câmpul întunecat (40x/0.65)**

Determinarea imunologică a concentrației totale a claselor de imunoglobuline (A, M, G) din serul sanguin, propusă în cercetare cu determinarea periodică a acestor indicii primar și la reinternări repetate, după 3 și 6 cicluri de polichimioterapie (PCHT), a fost executată prin metoda bazată pe principiul “sandwich”.

Analiza se efectuează în două părți. *În prima parte: standartele de calibrare* cu concentrația IgA și probele testate se incubează în godeurile microplășetei, care sunt

imobilizate cu anticorpi monoclonali specifici IgA. *A doua parte: prin incubarea cu conjugatul* - se face legătura între lanțurile imunoglobulinei umane cu peroxidaza.

Evaluarea rolului și a caracteristicilor AcMo sunt deosebit de importante pentru obținerea rezultatelor terapeutice de succes, reprezentând piatra de temelie în elaborarea strategiei de management ale limfoamelor non - Hodgkin.

Anticorpii sau imunoglobulinele sunt produsul final al reacției imune. Imunoglobulinele (Ig) sunt glicoproteine prezente în plasmă, lichidul interstițial și secreții. Ele au activitate de anticorpi, adică au capacitatea să recunoască și să se combine specific cu Ag și vor constitui baza specificității imunologice.

Recunoașterea antigenului este punctul primordial al unui răspuns imun, bazându-se pe complementaritatea sterică dintre antigen și moleculele implicate în recunoașterea sa, ca receptorii pentru antigene ai limfocitelor și anticorpii. Fiecare anticorp recunoaște specific un anumit determinant antigenic sau epitop de care se leagă cu o porțiune care are structură complementară cu a epitopului.

Concentrația totală a claselor de imunoglobuline A, M și G analizate în lucrare denotă proprietăți diverse, astfel regiunea fragmentului constant (Fc) a IgG comparativ cu AcMo interacționează mai eficient sistemul imunitar și induce apariția unei citotoxicități dependent de complement și a unor citotoxicități celulare dependente de anticorpi. Se încearcă obținerea unor noi grupe de AcMo care se vor strădui să îmbunătățească calitatea legăturilor realizate de fragmentul Fc cu antigenii specifici de pe suprafața celulei ținte și aceste modificări vor fi punctul de pornire în speranța de apariție a noilor generații de AcMo cu o eficiență clinică majoră și toxicitate redusă. Astfel legătura realizată dintre regiunea Fc cu complementul va induce liza celulei tumorale.

Aprecierea gradului de intensitate a legăturilor statistice și a influenței factorilor asupra variației fenomenelor studiate utilizează procedeul corelației, riscul relativ, coeficientul student, Fisher și Spearman. Estimarea parametrilor și verificarea ipotezelor statistice are loc prin procedee interferențiale și extrapolare statistică. Prezentarea datelor statistice prin procedee tabelare și grafice.

Cercetarea statistică a fost efectuată cu aplicarea metodelor matematice moderne și a softului special pentru cercetări medico-biologice SPSS, Chicago, IL, SUA și GPP 5,0 pentru Windows 5,0.

Capitolul 3 “ Particularitățile și dinamica indicilor imunologici și imunofenotipici la bolnavii cu LNH în procesul de tratamentului” va prezenta și va analiza în dinamică indicii imunologici și imunofenotipici în procesul tratamentului, cu argumentarea tratamentului țintă, reieșind din studiul liniilor celulare B și T a limfomului non-Hodgkin.

În scopul evaluării indicilor imunologici și imunofenotipici la bolnavii cu LNH și a identificării activității de imunocompetență a organismului acestora, am analizat după un model matematic selectiv, elaborat de noi.

La etapa întâi de cercetare am creat un model de proiect pentru indicatorii imunologici și imunofenotipici, am stabilit sarcinile pentru acești indicatori, comparându-le la etape repetate de aplicare a tratamentului PCHT – primar după stabilirea diagnosticului de LNH confirmat prin examinarea morfologică și/ sau imunohistochimică, după 3 și după 6 cure de PCHT și respectiv perioadei de remisie clinic aparentă cu o dinamică a comparării rezultatelor acestor parametri la pacienții cu LNH, pentru linia fenotipică B și T.

S-au determinat valorile concentrației totale a claselor de imunoglobuline A, M și G în sângele periferic al acestor bolnavi. Ulterior am format matricea de date inițiale pentru grupul de pacienți cu LNH și, evident, perioadele de investigații. S-a realizat un algoritm de calcul al valorii medii a indicatorilor pentru pacienții respectivi în perioadele de monitorizare, primar tratamentului și posttratament. În succesibilitate s-au calculat și erorile standard. A fost calculat t - Student și p - nivelul de semnificație.

Potrivit metodologiei de cercetare, bolnavii cu LNH incluși în studiu au fost repartizați în în 2 grupe omogene după tipurile morfologice determinate din cercetarea dată, cărora li s-au administrat următoarele scheme de tratament PCHT în concordanță cu protocoalele naționale prestabilite anterior. (Tabelul 3.1)

Tabelul 3.1 Repartizarea bolnavilor conform schemelor de tratament PCHT

Subtipul de LNH	Bolnavii cu LNH incluși în studiu	Scheme de tratament PCHT	Denumirea preparatelor administrate
LNH agresive (limfoblastice)	56	CHOP	Cyclofosfan Doxorubicină Oncocin(vincristin) Prednisolon
	12 (determinată linia celulară prin biopsie cu imunohistochimie)	R – CHOP	Rituximab(anti CD20) Cyclofosfan Doxorubicină Oncocin (vincristin) Prednisolon
LNH non-agresive (indolente, prolimfocitare)	54	CVLP	Cyclofosfan Vinblastin Leukeran Prednisolon

În tabelul 3.2, vom indica dinamica indicilor IgA, IgM și IgG în procesul de tratament PCHT, la 56 bolnavi cărora li s-a administrat conform protocolului, schema de tratament CHOP și cu controlul repetat al valorilor acestora după 3 și după 6 cure de PCHT. Rezultatele au

manifestat o descreștere semnificativă la toți indicii de imunoglobuline atât primar, cât și în dinamica de după a 3-a și a 6-a cură de PCHT. Dacă IgA primar indică o valoare de $1,4 \pm 0,1$, atunci după a 3-a cură s-a atestat $1,1 \pm 0,02$, după a 6-a cură – $1,0 \pm 0,01$ ($p < 0,05$). IgM cu indicele primar de $1,6 \pm 0,05$, după a 3-a cură de PCHT – $1,4 \pm 0,08$, iar după a 6-a cură de PCHT relevă o scădere până la $1,2 \pm 0,06$ ($p < 0,05$). IgG cu indicele primar de $17,5 \pm 0,2$, după a 3-a cură de tratament $16,8 \pm 0,1$, iar după a 6-a cură de PCHT este de $15,2 \pm 0,1$ ($p < 0,05$). Aceasta semnalizează o inhibiție semnificativă a răspunsului imun și diminuarea indicilor imunoglobulinici cu $16,5\%$ în $45,1 \pm 0,8$.

Tabelul 3.2 Indicii concentrației totale a IgA, IgM, IgG a grupului de cercetare cu tratamentul PCHT CHOP

LNH agresive (limfoblastice)				
	№ investigațiilor	Primar M ±	M ± d/ă 3 cicluri PCHT	M ± d/ă 6 cicluri de PCHT
IgA	56	$1,4 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,02$	$1,0 \pm 0,01$
IgM		$1,6 \pm 0,05$	$1,4 \pm 0,08$	$1,2 \pm 0,06$
IgG		$17,5 \pm 0,2$	$16,8 \pm 0,1$	$15,2 \pm 0,1$
p		$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,01$
t		2,84	0,98	1,82

În grupul următor cu 54 de bolnavii cu LNH cu variantele morfologice indolente li s-a administrat schema de tratament PCHT CVLP și, în rezultat, vor relata, la fel, o descreștere relativă semnificativ statistică a indicilor claselor de Ig A, M și G propuse cercetării. (Tabelul 3.3)

Tabelul 3.3 Rezultatele indicilor imunoglobulinelor claselor A, M, G conform schemei de tratament PCHT CVLP în perioade ciclice repetate pentru LNH non-agresive (indolente, prolimfocitare)

LNH indolente (prolimfocitare)				
	№ investigațiilor	Primar M ±	M ± d/ă 3 cicluri PCHT	M ± d/ă 6 cicluri de PCHT
IgA	54	$1,4 \pm 0,08$	$1,2 \pm 0,04$	$1,1 \pm 0,02$
IgM		$1,6 \pm 0,05$	$1,4 \pm 0,08$	$1,2 \pm 0,01$
IgG		$19,1 \pm 0,2$	$18,8 \pm 0,2$	$15,6 \pm 0,03$
p		$< 0,05$	$< 0,05$	$< 0,05$
t		2,34	1,22	1,96

Deci, și în acest grup de cercetare se denotă o pornire semnificativă de diminuare a răspunsului imun cu $5,9\%$.

Și cel din urmă, grup de cercetare cu diagnosticul de LNH B-celular confirmat și prin examinarea imunohistochimică au cuprins 12 bolnavi cărora li s-a administrat schema de

tratament PCHT (R – CHOP) a urmărit o reducere neînsemnată a răspunsului imun. (Tabelul 3.4)

Tabelul 3.4 Rezultatele indicilor imunoglobulinelor (A, M, G) conform schemei de tratament PCHT R – CHOP în perioade ciclice repetate pentru LNH B - celular

LNH B - celular				
	N _e investigațiilor	Primar M±	M± d/ă 3 cicluri PCHT	M± d/ă 6 cicluri de PCHT
IgA	12	2,5±0,02	1,7±0,02	1,9±0,01
IgM		1,6±0,01	1,4±0,04	1,4±0,03
IgG		12,3±0,03	18,8±0,2	16,7±1,3
p		<0,05	<0,01	<0,05
t		2,36	1,08	1,98

Deci, bolnavii cu LNH atât a variantelor agresive (limfoblastice), cât și a variantelor indolente (prolimfocitare, non-agresive), primar, la etapa de diagnostic au un statut imun deficient și indicii concentrației totale a claselor de imunoglobuline A, M și G semnalează descreșteri evidente. Iar în procesul de tratament PCHT, după 3 cicluri, după 6 cicluri în toate grupele de cercetare repartizate conform schemelor de tratament s-a remarcat o scădere semnificativă a indicilor imunoglobulinelor A, M și G în mediu cu 7,3±0,2 (p<0,05). Pe când, indicii imunologici la bolnavii cu LNH B-celular după administrarea schemei R – CHOP de tratament PCHT s-a determinat o micșorare semnificativ statistic mică.

Răspândirea și evoluția LNH T–celulare comparative cu variantele de LNH B-celulare sunt mai agresive, rare și răspunsul imun al organismului este în permanentă descreștere, preponderent pentru IgG cu 7,5 (p<0,05).

Examenele complementare de imunofenotipare indirectă ce ne-au permis detectarea liniei celulare B a LNH prin marcarea limfocitelor cu AcMo CD20, CD19 au evidențiat un număr semnificativ elocvent crescut de celule maligne la 84,4% de bolnavi (tabelul 3.5), ceea ce dovedește că celulele limfoide din linia celulară B au tendința de proliferare progresivă, motivând includerea în tratamentul variantelor de LNH B - celular a AcMo ca terapie țintă, iar cercetarea imunofenotipică cu CD3 și CD5 la bolnavii cu LNH a determinat linia fenotipului predominant T - celular cu ponderea de 2,4% întâlnită la doar 3 pacienți din studiul efectuat, față de 10% din date ale literaturii de specialitate.

Tabelul 3.5 Determinarea absolută și procentuală a celulelor maligne a liniei celulare B

Nr. bolnavilor	%	CD 20						Îi	CD 19						îi
		c.a.			%				c.a.			%			
		min	med	max	min	med	max		min	med	max	min	med	max	
119	100	13	42	98	11,2	36,2	84,4	25,4 ±0,7	9	32	75	7,7 5	27,5 8	64,6 7	19,8 ±2,3

Capitolul 4 “Remisiile imunologice și imunofenotipice la bolnavii cu LNH în procesul de tratament” conține analiza evoluției și rezultatelor înregistrate în urma cercetării particularităților imunologice și imunofenotipice, marcarea expresiei antigenului CD19, CD20, predominarea liniei fenotipice B - celulare, expresia antigenului CD3, CD5 pentru fenotipul celulara T cu o evoluție clinică agresivă și incidență redusă. Monitorizarea ciclică a valorilor concentrației totale a claselor de imunoglobuline M, G și A, dezvoltarea răspunsului imun, apariția remisiilor imunologice și imunofenotipice complete și parțiale.

Eficiența tratamentului bolnavilor cu LNH este apreciată de corelația diversilor parametri clinico-biologici și urmărirea efectelor acestor parametri asupra supraviețuirii pacienților diagnosticați cu o astfel de hemopatie.

În rezultatul analizei indicilor imunologici și imunofenotipici indiferent de subtipul morfologic determinat și de stadiul histopatologic stabilit, în perioade ciclice de după 3 cure și după 6cure de tratament PCHT, aplicate bolnavilor cu LNH conform protocoalelor prestabilite anterior, dinamica datelor imunologice obținute au arătat că și după încetarea tratamentului PCHT nealiator schemelor aplicate bolnavilor cu LNH, continuă scăderea statutului imun a organismului, ceea ce ne va induce concluzionarea din punct de vedere imunologic comparativ cu datele clinico-biologice, nu apare o remisie.

Astfel, terapia aplicată nu vizează sistemul imun al organismului, ci doar mai mult tumora în sine, precum și recunoașterea acestuia în atacarea selectivă a celulelor tumorale, la fel nu îi va oferi organismului un răspuns imun cu o memorie de lungă durată, ceea ce va da posibilitatea adaptării continue și furnizarea unui răspuns durabil pe termen lung, cu instalarea unei remisii complete sau parțiale mai rapide. (Tabelul.4.1)

Tabelul 4.1 Dinamica indicilor imunologici la bolnavii cu LNH

Grupul de cercetare		Metodă de tratament	Indicii imunologici	După 3 cure	După 6 cure	Norma	”t”	”p”
122 bolnavi	56	1	Ig A	1,0	0,98	2,15±0,85	4,46	< 0,05
			Ig M	1,2	1,0	1,63±0,46	0,87	< 0,05
			Ig G	16,1	14,1	12,3±2,97	2,60	< 0,01
	12	2	Ig A	1,0	0,89	2,15±0,85	3,80	< 0,05
			Ig M	1,1	1,1	1,63±0,46	0,96	< 0,05
			Ig G	17,9	16,1	12,3±2,97	3,42	< 0,01
	54	3	Ig A	1,1	1,0	2,15±0,85	5,0	< 0,05
			Ig M	1,2	1,1	1,63±0,46	0,99	< 0,05
			Ig G	18,1	15,1	12,3±2,97	3,60	< 0,05

Prezentarea imunofenotipică din tabelul 4.2 a ponderii limfocitelor maligne prin marcarea cu AcMo CD19, CD20 după 3 cure și după 6 cure de după tratament PCTH aplicat bolnavilor cu

LNH, independent de schema de tratament, ne-a arătat că numărul celulelor maligne în cercetarea sângelui periferic pe linia celulară B scade. Astfel, în mod comun în evaluarea bolnavilor cu LNH în baza cercetării imunofenotipării indirecte a grupului analizat cu o limfocitoză susținută determină natura reactivă sau malignă a bolii minime reziduale. Caracteristica imunofenotipică celulară indiferent de variatele subtipuri morfologice existente de LNH vor servi drept însușiri pronostice suplimentare în alegerea și influențarea dezvoltării unei ținte terapeutice personalizate.

Tabelul 4.2 **Dinamica CD19 și CD20 la bolnavii cu LNH (îi $74 \pm 0,5\%$, $p < 0,05$)**

Grupul de cercetare/№		Metoda de tratament	AcMo	Ponderea celulelor maligne		îi	Norma
				După 3 cure	După 6 cure		
122	56	1	CD19	45±0,8	25±0,4	72,3±11,4	9±6
			CD20	40±1,2	20±1,1	68,9±12,3	9±6
	12	2	CD19	30±0,9	18±0,8	79,4±18,1	9±6
			CD20	20±1,1	11±1,2	8,8±11,3	9±6
	54	3	CD19	48±0,7	43±1,1	86,3±16,1	9±6
			CD20	56±0,8	49±0,3	79,8±17,4	9±6

Remisiile imunologice și imunofenotipice la bolnavii cu LNH în perioada posttratament au fost variate. Astfel, remisiile imunologice complete după 6 cure a survenit la 55,18% (îi $84,7 \pm 8,3$) și remisie imunofenotipică completă după 6 cure s-a determinat la 85,54% (îi $76,8 \pm 9,2$), pe când, remisiile clinice la grupele cercetate au fost deosebite. (Tabelul 4.3)

Tabelul 4.3 **Remisiile clinice în grupele de cercetare**

Grupul de cercetare				Schemele de tratament	Remisia clinică				îi
					După 3 cure PCHT		După 6 cure PCHT		
c.a.	%	c.a.	%		c. a.	%	c. a.	%	
122	100	56	45,9	1	0	0	38	67,85	28,4±9,3
		12	9,8	2	5	41,7	11	91,7	87,4±11,2
		54	44,2	3	32	59,2	48	88,9	90,2±7,3

Remisia imunologică, la fel, și remisia imunofenotipică în lotul de studiu prezintă valori diferențiate. (Tabelul 4.4, 4.5)

Tabelul 4.4 **Remisia imunologică în grupul de cercetare**

Grupe de cercetare				Schemele de tratament	Remisia imunologică									
					După 3 cure				îi	După 6 cure				îi
incompletă		completă			incompletă		completă							
c.a.	%	c.a.	%	c.a.	%	c.a.	%	c.a.	%	c.a.	%	c.a.	%	
122	1	56	45,9	1	0	0	0	0	8	14,3	12	21,4	46,6±3,4	
	0	12	9,8	2	0	0	1	8,3	32,6±2,0	4	33,3	6	50	52,8±6,8
	0	54	44,2	3	4	7,4	16	29,6	49,9±4,7	12	22,2	28	51,8	79,6±9,2

Tabelul 4.5 Remisia imunofenotipică în grupul de cercetare

Grupe de cercetare				Sche mele de trata ment	Remisia imunologică									
					După 3 cure				îi	După 6 cure				îi
incompletă		completă			incompletă		completă							
c.a.	%	c.a.	%	c.a.	%	c.a.	%	c.a.	%	c.a.	%	c.a.	%	
122	1	56	45,9	1	0	0	0	0	0	16	28,6	20	21,4	58,9±7,4
	0	12	9,8	3	3	25	5	41,7	39,8±4,7	1	8,3	10	50	62,6±6,8
	0	54	44,2	12	12	22,2	20	37	59,8±6,5	18	33,3	30	51,8	78,6±7,2

Așadar, lotul cercetat a arătat că remisiile clinice la bolnavii cu LNH nu corelează direct proporțional cu remisiile imunologice și imunofenotipice. După 3 cure de PCHT remisia clinică a survenit în mediu la 52,66% (îi 68,4±7,4%), după 6 cure de PCHT la 89,18% (îi 76,8±6,8), iar remisia imunologică incompletă de după tratament la 42,89% (îi 57,8±7,3) și remisia imunofenotipică incompletă după 6 cure la 68,77% (îi 72,6±6,7). Remisiile imunologice complete după 6 cure s-a produs la 55,18% (îi 84,7±8,3) și remisia imunofenotipică completă după 6 cure s-a determinat la 85,54% (îi 76,8±9,2) bolnavi.

CONCLUZII GENERALE

1. Identificarea cu acuratețe a indicilor imunologici la etapa de diagnostic a LNH a arătat un statut imun diminuat pe fondalul determinării concentrației totale a IgA, IgM și IgG preponderent pe linia celulară B și cu o evoluție nefavorabilă a bolii, precum și în procesul tratamentului de după 3 și 6 cure de PCHT în grupele de cercetare cu 3 scheme de tratament polichimioterapic conform protocoalelor clinice stabilite s-a determinat o scădere semnificativă a concentrației imunoglobuline A, M și G în mediu cu $0,7 \pm 0,08 \text{g/l}$ ($p < 0,05$), iar la bolnavii cu LNH B-celular diagnosticați prin biopsie cu imunohistochimie, după administrarea schemei R - CHOP indicii imunologici au arătat o reducere moderată. Bolnavii cu LNH T celular se întâlnesc rar, fiind o formă mai agresivă comparativ cu linia celulară B, și răspunsul imun al organismului este în descreștere permanentă, preponderent pentru IgG cu $7,5$ ($p > 0,05$).
2. Determinarea diagnosticului de LNH în scopul evidențierii liniei celulare prin metoda de imunofenotipare indirectă cu marcarea limfocitelor cu anticorpii monoclonali CD20 și CD 19 s-a observat un număr crescut de celule maligne la $84,4\%$ ($78,4 \pm 4,8$) bolnavi, ce demonstrează că celulele limfoide pe linia celulară B au tendința de proliferare progresivă ce argumentează includerea în tratament a AcMo ca terapie țintă. Cercetarea imunofenotipică cu AcMo CD3 și CD5 la bolnavii cu LNH pe linia T celulară au ponderea de $2,4\%$, fiind prezente la doar 3 bolnavi în studiu efectuat, cu o incidență aproape similară conturate cu datele din literatură.
3. Indicii imunofenotipici CD19 și CD20 au exprimat o reducere în toate grupele de cercetare și au continuat să manifeste o micșorare și după a 3-ea cură și după a 6-a cură de tratament, astfel CD19 cu $11,6 \pm 0,7\%$ ($74 \pm 0,5\%$), CD20 cu $9,3 \pm 0,2\%$ ($74 \pm 0,5\%$), norma fiind de $9 \pm 6\%$, ce denotă o remisie imunofenotipică parțială, dar cu o probabilitate crescută de evoluție a unui pronostic favorabil.
4. Remisiile clinice la bolnavii cu LNH nu corelează direct proporțional cu remisiile imunologice și imunofenotipice. După 3 cure de PCHT remisia clinică a survenit în mediu la $52,66\%$ ($68,4 \pm 7,4\%$), după 6 cure de PCHT la $89,18\%$ ($76,8 \pm 6,8$), iar remisia imunologică parțială după 6 cure la $42,89\%$ ($57,8 \pm 7,3$) și remisia imunofenotipică parțială după 6 cure la $68,77\%$ ($72,6 \pm 6,7$). Remisie imunologică completă după 6 cicluri a survenit la $55,18\%$ ($84,7 \pm 8,3$) și remisia imunofenotipică completă după 6 cicluri de PCHT s-a determinat la $85,54\%$ ($76,8 \pm 9,2$) bolnavi.
5. Problema științifică soluționată în cercetare prin monitorizarea periodică a bolnavilor cu LNH a permis evidențierea particularităților imunologice și imunofenotipice a bolii, în depistarea recidivelor precoce și tardive, a efectelor secundare tardive, apariția celei de a 2-a

malignități, cu evaluarea remisiei imunologice și imunofenotipice complete și parțiale în declanșarea identificării țintelor moleculare specifice pentru elaborarea, îndunătățirea și consolidarea ulterioară a unei terapii individualizate.

RECOMANDĂRI PRACTICE

Pentru medici hematologi

- Efectuarea examenelor imunologice ne permit să stabilim remisie imunologică vs remisie clinică la bolnavii cu LNH, iar cercetarea imunofenotipică ne oferă informații ce au o valoare pronostică suplimentară care justifică identificarea alegerii unui tratament țintă. Aceste rezultate științifice au o importanță deosebită, identificându-se ca factor de pronostic ce va corela puternic cu evoluția favorabilă a bolii;
- Pentru evaluarea tratamentului bolnavilor cu LNH paralel cu criteriile remisiei clinice - lipsa dovezii de creștere a procesului tumoral timp de 4 săptămâni după efect complet, lipsa existenței tumorii la examenul USG, TC, RMN și altele, la bolnavii trebuie demonstrată apariția remisiei imunologice ce va releva un răspuns imun în creștere și survenirea remisiei complete ce va corela cu indicii de supraviețuire și recăderea bolii.

Pentru medici de laborator

- Un obiectiv major va constitui determinarea și evidențierea cu acuratețe a indicilor imunologici și imunofenotipici ale LNH, ce vor servi drept factori de pronostic, de diagnostic și de identificare a unei terapii personalizate.

BIBLIOGRAFIA

1. Andrieș L., Cernetchi O., Barba D., Stratan V.: Compediu. Imunologia clinică. Chișinău, 2014.
2. Arcaini L., Vallisa D., RAttotti S. et al. Antiviral treatment in patients with indolent B - cell lymphomas associated with HCV infection: a study of the Fondazione Italiana Linfomi. *Ann. Oncol.* 2015; 25(7): 1404-1410.
3. Bachy E., Houot R., Morschhauser F., et al. Long term follow up of the FL 2000 study comparIng CHVP -Interferon to CHVP- Interferon plus rituximab follicular lymphoma. In *Haematologica.* 2013; 98 (7): 1107-14.
4. Barrington S.F., Mikhaeel N.G., Kostakoglu L. et al. Role of imaging in the staging and response assesment of lymphoma: consensus of the Internatinal Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol* 2014; 32: 3048-3058.
5. Brokow A. Immunology: Use Howard Hughes Medical Institute Resources to Teach. Ohio, 2013. 37p. Disponibil:<http://www.hhmi.org/biointeractive/teacher-guide-immunology>.
6. Buske C. Rituximab and Non-Hodgkin's Lymphoma. 2007: 96.
7. Butryum A., Prochorec -Sobieszek M., Dzietczemia J., et al. Unclassifiable small B-cell lymphoma with marked plasmacytic differenation and Mott cell formation. *Leukemia and lymphoma.* 2013; 55: 1681-1683.
8. Cernat V., Țîbîrnă Gh., Stratan V., Doruc A., **Nicorici A.**, Starodubțeva E. "Importanța răspunsului imun al organismului la criodistrucție" Republica Moldova, Buletinul AȘM 4(40) ISSN1857- 0011, pag.19-25.
9. Corcimar I. Limfoamele nehodgkiniene. *Hematologie.* 2007, 252-279.
10. Cordone Iole, Severena Masi, Mariantonia Corosi, Antonello Vidiri, Francesco Marchesi, Mirella Marino, Stefano Telera, Alessia Pasquale, Andrea Mengarelli, Laura Conti, Edoardo Pescarmona, Andrea Pace, and Carmine M. Brain stereotactic biopsy flow cytometry for central nervous system lymphoma characterization: avantages and pitfalls. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016; 35(1): 128
11. Craing f., Foon K. "Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms". In *Blood* 2008; 111(8): 3941-67).
12. Cucuiuanu A. Protocoale de diagnostic și tratament în hematologie. Institutul Oncologic-Ion Chiricuță", Cluj Napoca, secția Hematologie. 2014.
13. Greer J, Williams M. "Non-Hodgkin Lymphoma in Adults". In *WIntrobe's Clinical Hematology*, Greer J, Foerster J, Lukens J, Rodgers G, Pareskevas F, Glader B, 11th ed, LippIncott Williams & WilkIns, 2004, 2164-2170.

14. Хансон К. П., Имянитов Е. Н. Эпидемиология и биология Неходжкинских Лимфом, Практическая Онкология • Т.5, № 3,2004, УДК 616-006.441-036.22, Ст. 163 -167.
15. Хансон К. П., Имянитов Е. Н. Функциональная онкогеномика – новое направление в молекулярной онкологии // Молекул. Медицина. 2004 - № 1.-С.3-9.
16. Laurie H. Sehn and Randy D. Gascoyne. Blood 2015 125: 22-32: Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity.
17. Link B.K., Maurer M.J., Nowakowski G.S., et al. Rates and outcomes of follicular lymphoma transformation in the immunochemotherapy Era: a report from the University of Iowa/Mayo Clinic specialized Program of research excellence molecular epidemiology resource. J.Clin.Oncol. 2013; 31(26): 3272-8.
18. Lupu A. Hematologie clinică. Curs de imunologie, ed. Carol Davila, București, 2017.
19. Мазуров В. И., Кривалопов Ю. А. Классификация Лимфомы Морфология, Иммунофенотип, Молекулярная генетика Неходжкинских Лимфом, Практическая Онкология • Т. 5, № 3, 2004, УДК 616-006.441.01.3. ст. 169 – 175.
20. Martin-Mateos MA. Primary immunodeficiencies and B-cell lymphomas, facultad de Medicina, Hospital Universitari SantJoandeDeu, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain, 2016 February.
21. Michael E., Williams, MD, ScM reviewing Kurtz DM et al. J Clin Oncol 2018 Oct. 1: Predicting Outcomes in Diffuse Large B-Cell Lymphoma.
22. Musteață L., Corcimaru I., Robu M., Icovleva I., Lazarev I., Musteata V. Rezultatele polichimioterapiei CHOP la pacienții cu limfoamele neHodgkiniene de diferite grade de malignitate. Zilele Universității. In: Anale științifice ale USMF "Nicolae Testemițanu", Chișinău, 2003, vol.2, p. 216- 219
23. Scott DW Wright GW Williams PM et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Blood 2014; 123: 1214-1217.
24. Spinei L., Lozan O., Badan V. Biostatistica. Chișinău, 2006; 69-72.
25. Tilly M., Gomes de Silva U., Vitolo A., Jack M., Meignan A., Lopez-Guillermo J., Walewski M., Andre P. W., Johnson M. et al. Diffuse large B-cell lymphoma(DLBCL) ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of Oncology, Vol. 26, Issue suppl 5, September 2015, pag. 116-125.

Lista lucrărilor științifice, științifico-metodice și didactice

1. Articole în reviste științifice

1.1. în reviste cu factor de impact:

1. NICORICI A. Evolution of immunobiological changes and their significance in the treatment of patients with non-Hodgkin's lymphoma, Archives of the Balkan Medical Union Copyright ©, Volume 54, no. 2, pp.221-225, June 2019.

1.2. în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei

CATEGORIA B

1. NICORICI A. Evoluția schimbărilor imunologice în limfoamele non-Hodgkin și influența acestor schimbări în tratamentul imunoterapic a acestor bolnavi: Buletin Academie de Științe a Moldovei, Științe medicale, Chișinău, Moldova 3(48) 2015, ISSN 1857-0011, pag. 228-231.
2. Stratan V., NICORICI A., Corcimaru I. Diferențierea fenotipică a liniei celulare a limfoamelor non-Hodgkin: Buletin Academie de Științe a Moldovei, Științe medicale, Chișinău, Moldova 4(40) 2013, ISSN 1857-0011, pag. 25-28.
3. Cernat V., Țîbîrnă Gh., Stratan V., Doruc A., NICORICI A., Starodubțeva E. Importanța răspunsului imun al organismului la criodistrucție: Buletin Academie de Științe a Moldovei, Științe medicale, Chișinău, Moldova 4(40) 2013, ISSN1857- 0011, pag. 19-25.
4. Sofroni L., Tcaciuc D., ș.a., Stratan V., NICORICI A. Analiza comparativă a homeostazei hormonale în sângele sanguin și limfa pacientelor cu Cancer Mamar: Buletin Academie de Științe a Moldovei, Științe medicale, Chișinău, Moldova, № 1(2) 2012, ISSM 1857-4572, pag.71-74.

2. Articole în culegeri științifice

2.1. în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare):

1. Sofroni L., Cudina E., Tcaciuc D., Cotruță A., Botnariuc N., Stratan V., NICORICI A.. Гормональный гомеостаз в крови и лимфе у больных раком мол. железы. Онкология XXI века, материалы VIII Всероссийского съезда онкологов, 11- 13 сентября 2013, Том 59, стр. 330-331.

3. Teze în culegeri științifice

3.1. în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare):

1. Mereuță I., Stratan V., NICORICI A., Șvet V. Pfenotypic Differentiation of non-Hodhkin Lymphomas Based on Monoclonal Antibodies. The Official Journal of the International Society of Oncology and Biomarkers “ONCOLOGY IN THE BIOMARKER ERA: BIOLOGY–DIAGNOSTICS–THERAPY”, ISOBM 2015, Tumor Biol. (2015) 36 (Suppl 1): S1-S88, pag. S71.

2. NICORICI A. Evolution of immunophenotypic and immunologic pathogens in older patients diagnosed with Non-Hodgkin's lymphoma. BALKAN MEDICAL WEEK. New Series, Volume 53, Suppl. 1, September 2018, ISSN 1584-9244, pag. S102.
3. Стратан В., Цыбырнэ Г., Чернат В., НИКОРИЧ А., Тарнаруцкая Р., ПМСУ Институт Онкологии, Кишинёв, Молдова. Иммунный ответ и его значимость при криодиструкции: Евразийский Онкологический Журнал, № 3(03) 2014, ISSN 2309 – 7485, ст. 936.

2.2. în lucrările conferințelor științifice naționale cu participare națională:

1. NICORICI A. Evoluția schimbărilor imunologice în limfoamele non-Hodgkin și influența acestor schimbări în tratamentul imunoterapic la acești bolnavi. PROGRAMUL ȘI REZUMATELE LUCRĂRILOR CONGRESULUI IV NAȚIONAL DE ONCOLOGIE, 8-9 OCTOMBRIE 2015, Nr.1(3), ISSN 1857-4572, pag.25.

2.3. în alte culegeri de lucrări științifice editate în Republica Moldova:

1. NICORICI A., Stratan V., Guzun N., Slobodeniuc I. Crioimunologia - tendințe noi sau doar mituri teoretice: Buletin Academie de Științe a Moldovei, Științe medicale, Chișinău, Moldova, №2 (2) 2013, ISSN 1857-4572.

4. Brevete de invenții și alte obiecte de proprietate intelectuală, materiale la saloanele de invenții

1. NICORICI A., STRATAN V., MEREUȚĂ I.: Metodă de determinare a predisunerii persoanei la dezvoltarea limfomului non-Hodgkin. **Brevet de invenție** MD Nr.1009. din 2015.03.02.
2. NICORICI A., STRATAN V., MEREUȚĂ I.: Metodă de pronostic imunologic în dezvoltarea limfoamelor non-Hodgkin. CERTIFICAT de INOVATOR, Nr. 5419 din 12. 01. 2015.
3. STRATAN V., NICORICI A., MEREUȚĂ I.: Metodă de determinare a evoluției limfoamelor non-Hodgkin bazată pe imunofenotiparea anticorpilor monoclonali. CERTIFICAT de INOVATOR, Nr. 5421 din 27.01. 2015.
4. NICORICI A.: Metodă de estimare economico-socială a tratamentului LNH, confirmat prin marcarea limfocitelor cu anticorpi monoclonali. CERTIFICAT de INOVATOR, Nr. 81 din 18. 05. 2018.
5. NICORICI A., STRATAN V., ȘVEȚ V., MEREUȚĂ I., BURUIANĂ S.: Algoritm de diagnostic, monitorizare și tratament țintă a LNH în baza imunofenotipării. CERTIFICAT de INOVATOR, Nr. 3 din 28. 06. 2018.

6. NICORICI A., STRATAN V., ȘVEȚ V., MEREUȚĂ I.: Metodologie de Clasificare și de apreciere a remisiei imunologice și imunofenotipice la bolnavii cu LNH. CERTIFICAT de INOVATOR, Nr. 2 din 28. 06. 2018.

5. Postere

1. NICORICI A. Immunological pattern of non – Hodgkin lymphomas. Presented at the 7th International Medical Congress of Students and Young Doctors MedEspera, May 3–5, 2018, Chisinau, Republic of Moldova, locul 1.
2. NICORICI A. The evolution of non-Hodgkin's Lymphomas based on monoclonal antibodies immunophenotyping. Presented at the 42nd Congress of the International Society of Oncology and Biomarkers “ONCOLOGY IN THE BIOMARKER ERA: BIOLOGY – DIAGNOSTICS – THERAPY”, ISOBM 2015, Zakopane, Poland, 3-7 October 2015.

ADNOTARE
Nicorici Aliona

Particularitățile imunologice și imunofenotipice ale limfoamelor non – Hodgkin
Teza de doctor în științe medicale

Teza este expusă pe 135 de pagini ce includ: introducere, 4 capitole, sinteza rezultatelor obținute, concluzii generale și recomandări practice, bibliografie din 108 de surse, 5 anexe, 12 figuri, 18 tabele, 10 fotografii. Rezultatele obținute sunt publicate în 11 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: Limfom non-Hodgkin, imunofenotipare, anticorpi monoclonali, imunoglobuline, polichimioterapie, răspuns imun umoral, tratament personalizat, prognostic, malignizare.

Domeniul de studiu: oncologie, medicină, diagnostic de laborator.

Scopul: studierea și analiza în dinamică a parametrilor imunobiologici și imunofenotipici în procesul de tratament al bolnavilor cu LNH, pentru a demonstra și a argumenta valoarea științifică a factorilor predictivi întru îmbunătățirea ratei de supraviețuire pe termen lung, și recunoașterea remisiilor imunologice și imunofenotipice în alegerea unor metode de tratament personalizat.

Obiectivele lucrării:

1. Evaluarea și analiza indicilor: imunobiologici și imunofenotipici la etapele de diagnostic, tratament și remisie a bolnavilor cu LNH;
2. Analiza malignizării și diferențierii fenotipice a liniilor celulare B și T a LNH prin prisma Ac – monoclonali (AcMo);
3. Identificarea factorilor de pronostic și acțiune predictibilă a răspunsului imun la terapia aplicată și aprecierea remisiei imunologice;
4. Elaborarea, brevetarea, certificarea, implementarea unor metode noi de diagnostic și motitorizarea în tratamentul țintă a LNH în vederea menținerii remisiei clinice, imunofenotipice și imunologice.

Metodologia cercetării: Studiul - de tip retrospectiv cu o componentă prospectivă. Sunt cercetați pacienții ocohematologici cu diagnosticul morfologic primar de LNH, determinat prin biopsie cu imunohistochimie. Metodele observației directe și indirecte au fost utilizate în cercetarea sângelui periferic antiagregat cu *Ethylenediaminetetraacetic acid* la debutul bolii, ulterior aplicării terapiei specifice cu intervale de după 3 și 6 cicluri de PCHT, cu evaluarea indicilor homeostazei umorale, aprecierea fenotipului limfomului în valori procentuale a acestuia prin marcarea limfocitelor cu Ac – monoclonali prin metoda indirectă, comparându-le pentru o analiză deductivă.

Noutatea și originalitatea științifică: Analiza datelor imunologice și imunofenotipice, în funcție de tratamentul aplicat și numărul curelor PCHT utilizate, va oferi posibilitatea optimizării protocoalelor terapeutice aplicate cu utilizarea elementelor noi. Reapariția recidivelor ne solicită căutarea de noi scheme de tratament PCHT cu includerea de medicamente specifice, ce ar asigura dezvoltarea ulterioară a unui tratament țintă.

Problema științifică soluționată: Caracteristicile AcMo sunt deosebit de importante pentru succesul terapiei. Utilizarea AcMo himerici sau umani (*care au timpul de înjumătățire mai mare comparativ cu cei murini*) va diminua respingerea imună, facilitând eficiența acțiunii clinice aplicate.

Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a lucrării: În vederea depistării recidivelor precoce și tardive, a efectelor secundare existente sau noi apărute și apariția malignizării, e necesară determinarea valorilor procentuale a fenotipului limfomului și caracteristicilor concentrației totale a claselor de Ig, pentru a aprecia statutul imun a pacienților oncohematologici, în scopul majorării ratei de supraviețuire și valorificării mai bune a calității vieții.

АННОТАЦИЯ Никорич Алёна

Иммунологические и иммунофенотипические особенности неходжкинских лимфом Диссертация на соискание учёной степени доктора медицинских наук

Структура диссертации: Диссертация изложена на 135 страниц: введение, 4 глав, суммирования результатов исследования, выводов и практических рекомендаций, 108 источников библиографии, имеются 5 приложений, 12 графиков, 18 таблиц и 10 фотографий. Полученные результаты исследования опубликованы в 11 печатных работах.

Ключевые слова: Неходжкинская лимфома, иммунофенотипирование, моноклональные антитела, иммуноглобулины, полихимиотерапия, гуморальный иммунный ответ, персонализированное лечение, прогноз, злокачественность.

Область исследования: онкология, медицина, лабораторная диагностика.

Цель исследования: изучение и анализ в динамике иммунобиологических и иммунофенотипических параметров в процессе лечения больных с НХЛ, чтобы продемонстрировать и обосновать научную ценность прогностических факторов для улучшения долгосрочной выживаемости и для распознавания иммунологических и иммунофенотипических ремиссий при выборе персонализированного метода лечения.

Задачи исследования:

1. Оценка и анализ показателей: иммунобиологические и иммунофенотипические на этапах диагностики, лечения и ремиссии пациентов с НХЛ;
2. Фенотипический анализ злокачественности и дифференцировки клеточных линий Б и Т НХЛ при помощи моноклональных антител;
3. Определение прогностических факторов и предсказуемого действия иммунного ответа на прикладную терапию и оценка иммунологической ремиссии
4. Разработка, патентование и внедрение новых методов диагностически и мониторинга в целенаправленном лечении больных НХЛ в поддержания клинических, иммунофенотипических и иммунологических ремиссий.

Методика исследования: Исследование представляет собой ретроспективное исследование с элементами проспективного. Исследовались окогематологические пациенты с первичным морфологическим диагнозом НХЛ, диагностированы с помощью биопсией и иммуногистохимии. Модели прямого и косвенного наблюдения использовались при исследовании проб крови с добавлением этилендиаминтетрауксусной кислотой в начале болезни, после 3 и 6 циклов ПХТ с оценкой показателей гуморального гомеостаза, оценкой фенотипа лимфомы в процентах путем маркировки лимфоцитов моноклональными антителами косвенным методом, сравнивая их для дедуктивного анализа.

Научная новизна и оригинальность: Повторение рецидивов требует от нас поиска новых схем лечения ПХТ с включением специфических лекарств, которые обеспечили бы последующую разработку целевого лечения.

Решенная научная проблема: Польза химерного или людского моноклонального антитела (которые имеют более длинное полувыведение сравнительно с мышинными антителами) уменьшает иммунный сброс, облегчая эффективность прикладного клинического действия.

Теоретическая значимость и прикладное значение статьи: Для выявления ранних и поздних рецидивов, существующих или возникающих побочных эффектов и возникновения злокачественных новообразований необходимо определить процентные значения фенотипа лимфомы и периферических характеристик иммуноглобулинов для оценки иммунного статуса онкогематологических больных с целью повышения выживаемости и качества жизни.

SUMMARY

Nicorici Aliona

Immunological and immunophenotypic features of non - Hodgkin's lymphomas *PhD thesis in medical sciences*

Structure of the thesis: The thesis is exposed on 135 pages including: introduction, 4 chapters, synthesis of the results obtained, general conclusions and practical recommendations, bibliography from 108 sources, 5 annexes, 12 figures, 18 tables, 10 photographs. The results obtained are published in 11 scientific papers.

Key words: Non-Hodgkin's lymphoma, immunophenotyping, monoclonal antibodies, immunoglobulins, polymichery, humoral immune response, personalized treatment, prognosis, malignancy.

Field of study: oncology, medicine, laboratory.

Study aim: We aim to study and analyze dynamically the immunobiological and immunophenotypic parameters in the treatment of NHL patients in the scientific argumentation and the demonstrative capitalization of the predictive factors in the improvement of the long-term survival rate and the recognition of immunological and immunophenotypic remissions in choosing customized treatment methods.

Objectives of the thesis:

1. Evaluation and analysis of the indices: immunobiological and immunophenotypic at the stages of diagnosis, treatment and remission of the patients with NHL;
2. Phenotypic malignancy analysis and fenotipice differentiation of B-cell and T-cell LNH by Ac-monoclonal prism (AcMo);
3. Identifying factor determining the predictive characteristics in accordance with prescribed and recom mended training and deficiencies;
4. Elaboration, patenting, certification, implementation of new diagnostic methods and motitorisation in the target treatment of LNH in order to maintain clinical, immunophenotypic and immunological remissions

Research methodology: The study - retrospective with a prospective component. Research, being ocohematological patients with primary morphological diagnosis of NHL, determined by immunohistochemistry biopsy. The direct and indirect observation models were used in the research of peripherally anti-aggregated blood with ethylenediaminetetraacetic acid at the onset of the disease, following the application of the specific therapy with intervals after 3 and 6 cycles of PCHT, with the assessment of humoral homeostasis indices, the estimation of the lymphoma phenotype in percentages of this by labeling Ac - monoclonal lymphocytes by the indirect method, comparing them for a deductive analysis.

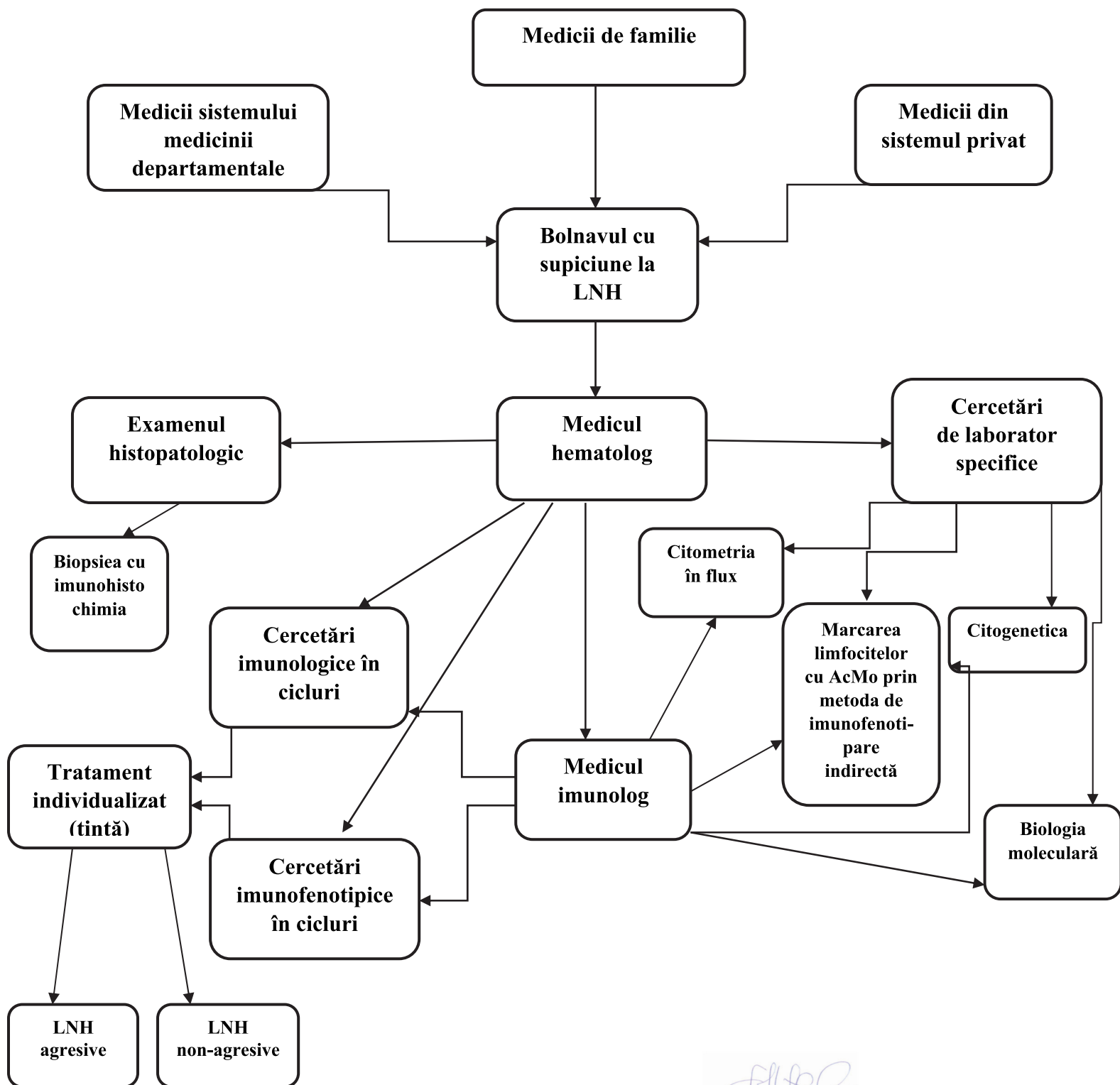
Novelty and scientific originality: Analysis of immunological and immunophenotypic data depending on the treatment applied and the number of PCHT treatments used, will provide the opportunity to optimize the therapeutic protocols applied with the use of new elements. Recurrence of recurrences requires us to seek new PCHT treatment regimens with the inclusion of specific drugs that would ensure the subsequent development of a target treatment.

The solved scientific problem: AcMo features are particularly important for the success of therapy. The use of chimeric or human AcMo (which has a higher half-life compared to murine) will diminish immune rejection, facilitating the effectiveness of applied clinical action.

Theoretical significance and applicative value of the work: In order to detect early and late recurrences, existing or emerging side effects and the occurrence of malignancy, it is necessary to determine the percentages of lymphoma phenotype and peripheral Ig characteristics to assess the immune status of oncohematological patients in order to increase the survival rate and better use of the quality of life.

ANEXĂ 1

**ALGORITMUL DE DIAGNOSTIC ȘI MONITORIZARE ÎN TRATAMENTUL
PACIENȚILOR CU LNH ÎN BAZA IMUNOFENOTIPĂRII INDIRECTE A
LIMFOCITELOR CU ANTICORPI MONOCLONALI ȘI A TESTELOR
IMUNOLOGICE**



Aliona Nicorici

Aliona Nicorici

NICORICI ALIONA

**PARTICULARITĂȚILE IMUNOLOGICE ȘI IMUNOFENOTIPICE
ALE LIMFOAMELOR NON – HODGKIN**

321.20 – ONCOLOGIE ȘI RADIOTERAPIE

Autoreferatul (rezumatul) /referatul științific al tezei de doctor în științe medicale

Aprobat spre tipar: 26. 04. 2019 Hârtie ofset. Tipar digital. Coli de tipar: 2.0	Fotmatul hârtiei: A5 Tiraj: 50 ex Comanda nr. 0001
----------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------

Sofart Studio SRL
Str. Calea Ieșilor 10
Tel.: 022 27 36 20; Mob.: 067 575- 575
sofartstudio@yandex.com