МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

Нови маркери за диагностика и таргетна терапия на кожен Т клетъчен лимфом

За присъждане на образователна и научна степен "Доктор" на

Десислава Димитрова Игнатова

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ

Акад. Проф. Ваньо Митев дм, дбн

КОНСУЛТАНТ:

Доц. Емануела Генова дм, дбн

София

2017

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

Нови маркери за диагностика и таргетна терапия на кожен Т клетъчен лимфом

За присъждане на образователна и научна степен "Доктор" на

Десислава Димитрова Игнатова

Научен ръководител

Акад. Проф. д-р Ваньо Митев дм, дбн

Научно жури

Акад. Проф. д-р Ваньо Митев дм, дбн

Акад Камен Куманов, дбн

Чл. кор. Проф. Румен Пенков, дбн

Проф. д-р Маргарита Апостолова, дб

Доц. д-р Валентин Лозанов

Дисертационният труд съдържа 107 страници, 26 фигури и 3 таблици. Използвани са 124 литературни източника.

Дисертационният труд е изработен от редовен докторант Десислава Димитрова Игнатова, зачислена със заповед № РК-36-199/07.02.2012г. на Ректора на МУ София. Експерименталната работа по дисертационния труд е проведена в Лаборатория по сигнална трансдукция на Катедра по Медицинска химия и биохимия, Медицински Университет София, и Катедра по Дерматология, Университетска болница Цюрих.

Дисертационният труд е обсъден и насочен към защита от Катедра Медицинска химия и биохимия, Медицински Университет София.

Експерименталната част по дисертационния труд е финансирана от българо-швейцарска програма за обмен на млади учени Sciex.ch.

Резултати, свързани с темата на работата, са публикувани в пет научни статии с импакт фактор на английски език и са цитирани в 30 научни публикации, статии и дисертации.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на

Всички материали и документи, отнасящи се до дисертационния труд, са на разположение на заинтересованите в Катедра Медицинска химия и биохимия

СЪДЪРЖАНИЕ

I. Увод 6 стр.

II. Цел и задачи 7 стр.

III. Материали и методи 8 стр.

1. Скриниг за диференциално експресирани гени в клонални и неклонални кожни Т-лимфоцити от пациент с кожен Т-клетъчен лимфом 8 стр.

1.1. Култувиране на кожни експланти от пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом и последващо изолиране на Т-лимфоцити 8 стр.

1.2.Флоуцитометрично сортиране на CD3+CD45+ Т-лимфоцити 8-9 стр.

1.3. Предварителна обработка на C1 Single-Cell Auto Prep IFC (Fluidigm, 5-10 μm, #100-5762) чипа за сепариране на единични клетки и обратна транскрипция на изолираните иРНКи. 9 стр.

1.4. Подготовка на клетъчна суспензия от сортираните CD4+CD45+ Т-лимфоцити за натоварване на чипа 9 стр.

1.5. Натоварване на IFC чипа с клетки 9 стр.

1.6. Заснемане на натоварените върху чипа CD4+CD45+ Т-лимфоцити 9 стр.

1.7. Лизис, обратна транскрипция и амплификация 9 -10 стр.

1.8. Събиране на амплифицираните кДНКи 10 стр.

1.9. Секвениранне на кДНКите от единични клетки (Функционален Геномен Център Цюрих) 10 стр.

1.9.1. Подготовка на библиотеки за секвениране (Nextera XT DNA Library Preparation Kit, Illumia, FC-131-11096) 10 стр.

1.9.2. Секвениране на информационните РНКи от всяка изолирана клетка (Illumina, HiSeq 4000 система за секвениране, SY-401 4001). 10 стр.

2. Анализ на антитяло-зависимата цитотоксичност (основен молекулен механизъм на действие на таргетните терапии) при пациенти с КТКЛ и при здрави индивиди (aCella™ - TOX: Bioluminescence Non Radioactive Cytotoxicity Assay GAPDH, Cell Technology). 11 стр.

2.1. aCella™ - TOX: биолуминесцента нерадиоактивна методика за оценяване на цитотоксичност на базата на глицеалдехид фосфат дехидрогеназа. 11 стр.

2.2. Блокада на HLA-ABC антигените, експресирани върху повърхността на туморните клетки 11-12 стр.

3. Флоуцитометричен анализ на мононуклеарни клетки от периферна кръв на пациенти с левкемичен Т клетъчен лимфом. Оценяване на експресията на новооткритите потенциални туморни маркери на постранслационно ниво 12 стр.

3.1. Изолиране на мононуклерни клетки от периферна кръв 12 стр.

3.2. Оцветяване на периферни мононуклерни клетки с флуоресцентно белязани моноклонални антитела и флоуцитометричен анализ на количеството на съответните антигени по повърхността на Т- лимфоцитите 12-13 стр.

4. Използван софтуеър при анализа на данните 13 стр.

IV. Резултати и обсъждане 13 стр.

1. Скрининг за гени, диференциално експресирани между клоналните и неклонални популации кожни Т-лимфоцити от пациент с кожен Т-клетъчен лимфом 13-18 стр.

2. Флоуцитометричен анализ на експресията на CD164 и TIGIT върху Т-лимфоцити от периферна кръв на пациенти с левкемичен Т клетъчен лимфом 18-27 стр.

3. Анализ на ефективността на евентуална таргетна терапия при пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом. Оценяване на нивата на антитяло-зависимата цитотоксичност (основен молекулен механизъм на таргетните терапии като цяло) при пациенти и здрави индивиди 27-30 стр.

4. Обсъждане 30-38 стр.

V. Приноси 39 стр.

VI. Публикации 40 стр.

VII. Участие в международни конференции 41-42 стр.

VIII. Награди 43 стр.

I. УВОД

Кожните Т-клетъчни лимфоми (КТКЛ) са втората най-често срещана група на екстранодални Неходжкинови лимфоми и представляват приблизително 75% от всички първични кожни лимфоми. Средно 53% от случаите на кожни Т-клетъчни лимфоми се диагностицират като Микозис фунгоидес или Сезари синдром. Сезари синдром представлява малигнена трансформация на Т-лимфоцити част от централната имунна памет, докато раковите клетки, участващи в патогенезата на Микозис фунгоидес, се категоризират към ефекторната имунна памет. Различните фенотипове на Т-лимфоцитите, които участват в патогенезата на Микозис фунгоидес и на Сезари синдром, предполагат различен клиничен ход на болестта. По правило протичането на КТКЛ е агресивно, когато се наблюдава пролиферация на малигнени Т клетъчни клонове в кръвта. За Сезари синдром популация Т-клетки, експресираща един предоминантен Т-клетъчен рецептор, се открива още в начален стадий, докато при Микозис фунгоидес това е характерно само за агресивните варианти и говори за напреднал сradий заболяване. Прогнозата за левкемичен тип пациенти е лоша: средна продължителност на живота след откриване на болестта е около пет години. Ето защо точното и бързо откриване на раковите клетки в кръвта на пациенти с кожен Т клетъчен лимфом е от водещо значение за правилната диагностика и прогностика. В наши дни, изчезването на клетъчни маркери като CD26, CD27 и CD7 от повърхността на малигнените Т-лимфоцити се счита за една от основните характеристики на левкемичен КТКЛ и се използва в рутинната диагностика. От диагностично значение е също така намаляване на разнообразието на Т клетъчните рецептори (ТКР) върху туморните Т клетки и превалирането на един доминантен ТКР. За съжаление единствен и специфичен маркер за откриване на ракови клетки в кръвта все още не доказан. Детекцията на свръхекспресирани и локализирани предимно върху малигнените Т лимфоцити молекули би дало възможност за подобряване на диагностиката на КТКЛ и би позволило разработване на спицифични, индивидуализирани таргетни терапии за лечение на пациенти с диагноза кожен Т клетъчен лимфом.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Дисертационният труд има за цел откриване на нови туморни маркери при пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом, приложими в рутинната диагностика и даващи възможност за разработване на специфични таргетни терапии за лечение на заболяването. Бяха поставени следните задачи:

1. Валидиране на техниката секвениране на информационни РНКи на ниво единична клетка като метод за откриване на нови потенциални маркери за диагностика.

2. След провеждане на скрининг за диференциално експресирани гени между клоналната и неклоналната популация от Т-лимфоцити, доказване на същите различия и на протеиново ниво.

3. Анализ на приложимостта на новооткритите маркери в диагностиката и таргетното лечение на КТКЛ.

4. Оценяване на нивата на антитяло-зависимата клетъчна цитотоксичност (основен молекулен механизъм на действие на таргетните терапии) при пациенти с КТКЛ и здрави хора.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Скриниг за диференциално експресирани гени в клонални и неклонални кожни Т-лимфоцити от пациент с кожен Т-клетъчен лимфом

1.1. Култувиране на кожни експланти от пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом и последващо изолиране на Т-лимфоцити

Получената ексцизионна кожна биопсия се съхранява най-дълго за 3 часа във физиологичен разтвор (0,9% NaCl) на 4ºC в хладилник. Тъканта се надробява до консистенция "бебешко пюре" с помощта на операционна ножица, след което се поставя върху предварително обработени с 250 µl колаген тип I (опашка от плъх, 3mg/ml, Gibco, Life technologies, # 10483) на 1 ml PBS триизмерни матрици (#CY-903, Cytomatrix Pty Ltd). Работи се при стерилни условия, в ламинарен бокс. Преди употреба триизмерните матрици за култивиране на клетки се автоклавират (121ºC, 15 минути) и охлаждат до стайна температура. Триизмерните матрици, натоварени с хомогенизирана кожна тъкан, се поставят в 24 ямкови плаки (Falcon, # 353047). Култивират се в селективна за Т-лимфоцити среда: 400ml Iscove's medium (Life technologies, #12440-053), 100 ml инактивиран фетален телешки серум (Gibco, #10500064), 5 ml L-глутамин (Biochrom, # K0282), 5 ml Anti-Anti (Gibco, # 115240-096), 100 IU/ml рекомбинантен човешки интерлевкин-2 (PreproTech, # 200-02), 10 ng/ml рекомбинантен човешки интерлевкин-15 (PreproTech, # 200-15). Плаките се инкубират на 37ºC, 5% CO_2. Изолираните по тази методика кожни Т-клетки периодично се замразяват в течен азот за по-нататъшни анализи.

1.2. Флоуцитометрично сортиране на CD3+CD45+ Т-лимфоцити

За целта е използван BD FACS Aria III сортер, оборудван с пет лазера, 375 nm, 407 nm, 488 nm, 561 nm и 633 nm. Сортирането е извършено с дюза 85 µm. Култивираните с помощта на триизмерни матрици кожни Т лимфоцити са инкубирани с анти- човешко CD3 PerCP антитяло (Miltenyi Biotec, #130-098-154) и анти- човешко CD45 APC-Vio770 антитяло (Miltenyi Biotec, #130-098-151) за половин час на лед. Непосредствено след

оцветяването са сортирани CD3+CD45+ кожни Т-клетки, които впоследствие са анализирани с помощта на техника за секвениране на информационни РНКи от единични клетки.

*В методиките, свързани с C1 Single-Cell AutoPrep системата на Fluidigm за изолиране на единични клетки и обратна транскрипция, са използвани реактиви, които са част от Smart-Seq v4 Ultra Low Input RNA kit for the Fluidigm C1 System (Clontech Laboratories, # 635025) и ArrayControl RNA spikes (Ambion, #AM1780).

1.3. Предварителна обработка на C1 Single-Cell Auto Prep IFC (Fluidigm, 5-10 μm, #100-5762) чипа за сепариране на единични клетки и обратна транскрипция на изолираните иРНКи. Работено е според инструкциите на фирмите производител на използваните за целта китове.

1.4. Подготовка на клетъчна суспензия от сортираните CD4+CD45+ Т-лимфоцити за натоварване на чипа. Работено е според инструкциите на фирмите производител на използваните за целта китове.

1.5. Натоварване на IFC чипа с клетки. Работено е според инструкциите на фирмите производител на използваните за целта китове.

1.6. Заснемане на натоварените върху чипа CD4+CD45+ Т-лимфоцити

Всяка ямка за улавяне на единична клетка (96 общо върху един чип) се заснема и се оценява дали е изолирана една или повече клетки и дали клетката в нея е интактна. За всеки чип се съставя протокол с позициите на единичните, живи клетки, защото само те са обект на по-нататъшни анализи. За целта е използван микроскоп Leica DMI6000 B, а използваният за снимките обектив е с увличение 20x.

1.7. Лизис, обратна транскрипция и амплификация

Тази стъпка е последната, за която се използва C1 Single-Cell AutoPrep системата на Fluidigm, и е подготвителна за секвениарне. В последователен ред се извършва лизис на клетките, обратна транскрипция на информационните РНКи и амплификация на получените кДНКи. Стриктно са спазени инструкциите на фирмите производител на използваните за целта китове.

1.8. Събиране на амплифицираните кДНКи

За събиране на намножените кДНКи и за последващо генериране на кДНК библиотеки за иРНК секвениране се използва протокол, наречен "Using C1 to Generate Single-Cell cDNA Libraries for mRNA Sequencing" (https://www.fluidigm.com/prod;uctsupport/c1-support-hub;Documents>Protocols>C1 System for mRNA Seq).

1.9. Секвенианне на кДНКите от единични клетки (Функционален Геномен Център Цюрих).

1.9.1. Подготовка на библиотеки за секвениране (Nextera XT DNA Library Preparation Kit, Illumia, FC-131-11096)

Тази методика включва няколко стъпки: тагментиране на ДНКите, амплифициране на тагментираните ДНКи, почистване на амплифицираните ДНКи и нормализиране на библиотеките за секвениране. Предварително получените от всяка клетка кДНКи се оценяват количествено и качествено с помощта на NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Небходимото начално количество тотална ДНК за използвания кит е 1 ng.

1.9.2. Секвениране на информационните РНКи от всяка изолирана клетка (Illumina, HiSeq 4000 система за секвениране, SY-401-4001).

Системата за секвениарне е напълно автоматична. Използвани са HiSeq 3000/4000 SBS Kit (FC-410-1003) и HiSeq 3000/4000 PE Cluster Kit (PE-410-1001). Параметрите на секвенирането са: 2 x 150 bp (base pairs reads, рийдове), средно 3 милиона рийдове (разчитания) на клетка.

2. Анализ на антитяло-зависимата цитотоксичност (основен молекулен механизъм на действие на таргетните терапии) при пациенти с КТКЛ и при здрави индивиди (aCella™ - TOX: Bioluminescence Non Radioactive Cytotoxicity Assay GAPDH, Cell Technology).

2.1. aCella™ - TOX: биолуминесцента нерадиоактивна методика за оценяване на цитотоксичност на базата на глицеалдехид фосфат дехидрогеназа.

В ин витро условия е оценена антитяло-зависимата цитотоксичност като за ефекторни клетки са използвани NK клетки от здрави индивиди и пациенти с КТКЛ, а за таргетни клетки бяха подбрани CD20+ Тилмфоцити, изолирани от кожни лезии на пациенти с диагноза КТКЛ. Използваното в експерименталния модел антитяло е Rituximab (MabThera®) - химерно мишка/човек моноклонално антитяло срещу CD20, който при човек е експресиран главно върху В-лимфоцити и се използва за таргетна терапия на В-клетъчна левкемия и В-клетъчен лимфом. За правилното отчитане на получените резултати са разработени следните контроли:

а. Контрола 1: спонтанно освобождаване на глицералдехид фосфат дехдрогеназа от таргетните клетки

б. Контрола 2: спонтанно освобождаване на глицералдехид фосфат дехдрогеназа от ефекторните клетки

в. Контрола 3: максимален лизис на таргетните клетки.

г. Контрола 4: само среда.

д. Контрола 5: без антитяло.

2.2. Блокада на HLA-ABC антигените, експресирани върху повърхността на туморните клетки

Свръхекспресираните върху повърхността на туморните клетки HLA-ABC антигени са блокирани с анти-човешко антитяло HLA-ABC (50 μg/mL, клон B9.12.1; Beckman Coulter). За да се докаже специфичността на HLA-ABC е използвана изотипна контрола - мише IgG2a антитяло.

3. Флоуцитометричен анализ на мононуклеарни клетки от периферна кръв на пациенти с левкемичен Т клетъчен лимфом. Оценяване на експресията на новооткритите потенциални туморни маркери на постранслационно ниво

3.1. Изолиране на мононуклерни клетки от периферна кръв

От всеки пациент или здрав донор се взима венозна кръв в 5 броя епруветки с консервант ЕДТА и с обем 7.5 мл. Във Falcon епруветка от 50 мл се поставят 15 мл Фикол (1.077 г/мл) и кръвта бавно се наслоява върху него. Така подготвените епруветки се центрофугират на 2200 оборота/мин, 25ºC, ускорение=1, спирачка=0 за 25 мин. Формираният след центрофугирането пръстен от периферни мононуклеарни клетки се прехвърля в нова епруветка с помощта на пипета.

3.2. Оцветяване на периферни мононуклерни клетки с флуоресцентно белязани моноклонални антитела и флоуцитометричен анализ на количеството на съответните антигени по повърхността на Т лимфоцитите

Оптималният брой клетки за всяко оцветяване е половин милион. Използвани са следните флуоресцентно белязани моноклонални анти-човешки антитела: CD3 PerCP (Miltenyi Biotec, #130-094-965), CD4 APC-Vio770 (Miltenyi Biotec, #130-096-652), CD8 PE-Vio770 (Miltenyi Biotec, #130-096-556), CD47 FITC (BD Pharmingen, #556045), CD26 PE-Cyanine7 (BioLegend, #302713), CD164 FITC (BioLegend, #324806), TIGIT APC (eBioscience, #17-9500-41). Vβ клоналните Т-клетъчни популации са визуализирани с IOtest Beta Mark TCR Vβ Repertoire kit (Beckman Coulter). Периферните мононуклеарни клетки са инкубирани със съответните антитела за половин час на лед, след което са фиксирани с 1% параформалдехид. Всички антитела са предварително титрувани и е определено оптималното количество антитяло за съответния брой клетки. Анализът е извършен на флоуцитометър BD FACSCanto II (BD Biosciences).

4. Използван софтуеър при анализа на данните

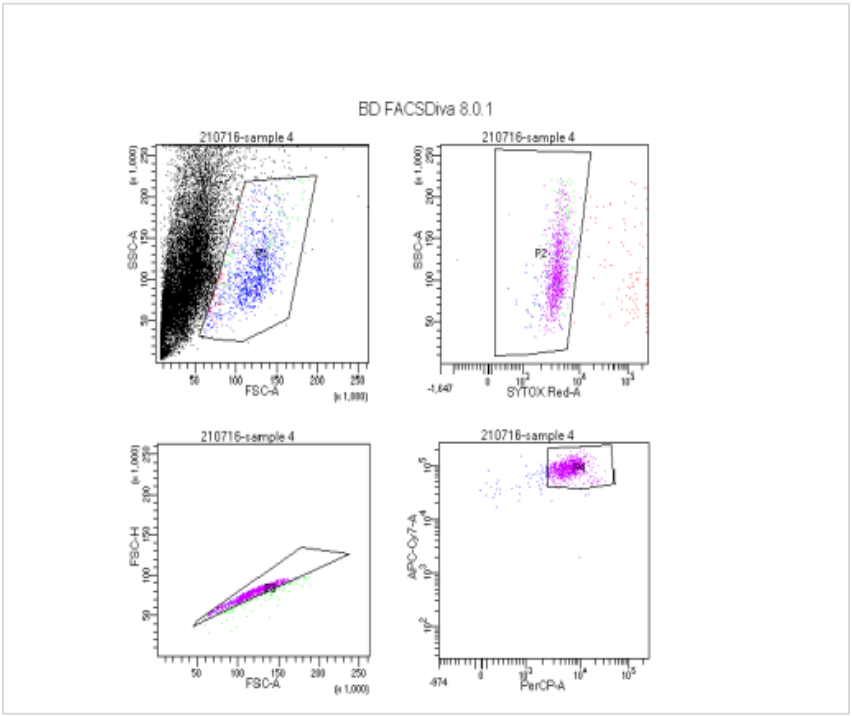
Скринингът за диференциално експресирани гени между популациите от клонални и неклонални кожни Т-лимфоцити се базира на SINGuLAR и R скрипти, с помощта на които е генерирана Heatmap графиката. За всеки ген, включен в проучването, е изчислена log2 експресията за съответната популация от Т-лимфоцити. Статистическата обработка на резултатите е напаравена с ANOVA. Флоуцитометричните данни са обработени и визуализирани посредством OriginPro и FCS Express 4 Flow Research Edition. Статистическата значимост на получените данни е оценена с помощта на ANOVA.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Скрининг за гени, диференциално експресирани между клоналните и неклонални популации кожни Т-лимфоцити от пациент с кожен Т-клетъчен лимфом

Благодарение на техниката за изолиране на кожни Т-лимфоцити с помощта на триизмерни матрици за култивиране на клетки, бяха успешно събрани и съхранени Т клетки от лезионна кожа на пациент с кожен Т клетъчен лимфом напреднал стадий. Непосредствено преди началото на процедурата за секвениране на информационни РНКи от единични клетки, кожните Т-лимфоцити от късен стадий заболяване бяха оцвететни с флуоресцентно белязани моноклонални анти-човешки CD3 PerCP и CD45 APC-Vio770 антитела. Селектираните по този начин Т-лимфоцити бяха сортирани (фигура 1) и честотата на Т-клетъчната популация след това бе 97.21% (фигура 2).

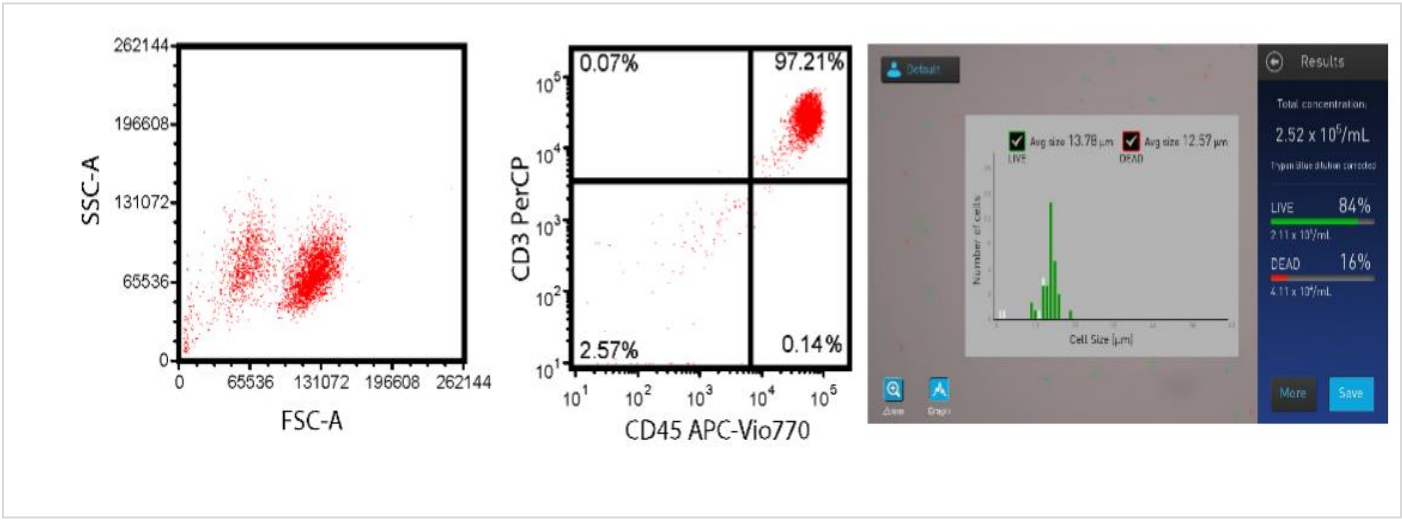
Фигура 1. Гейтинг за сортиране на CD3+CD45+ Т-лимфоцити



Означения: оцветяване за мъртви клетки - Sytox red, оцветяване за CD3 – PerCP, оцветяване за CD45 - APC Cy7; гейтове P1 – лимфоцити, P2 – живи клетки, P3 – единични клетки, P4 - CD3+ CD45+ Т лимфоцити (популацията подлежаща на сортиране).

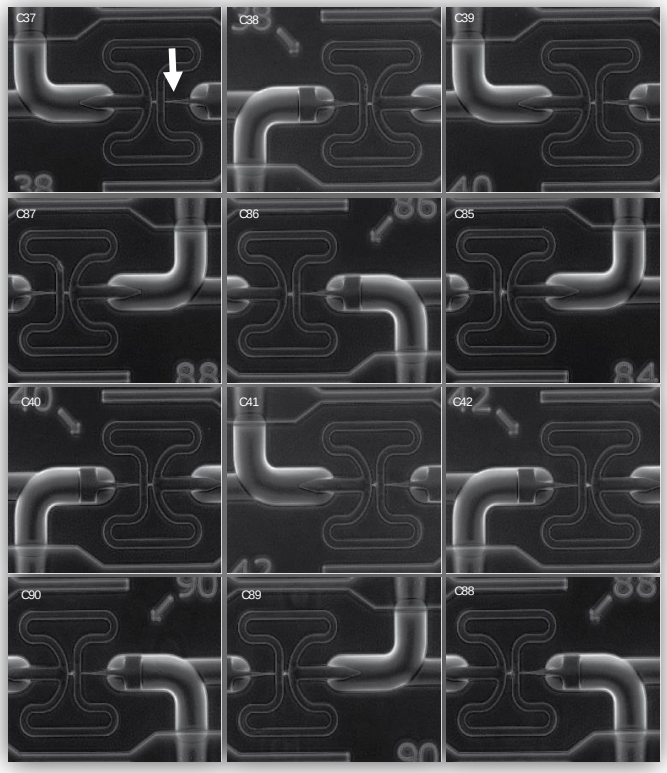
Тъй като виталността на клетките бе от първостепенно значение за анализите, свързани с изолиране на интактни информационни РНКи, бе определен процентът на живи клетки. 84% (фигура 2).

Фигура 2. Чистота и виталитет на сортираната популация Т-лимфоцити



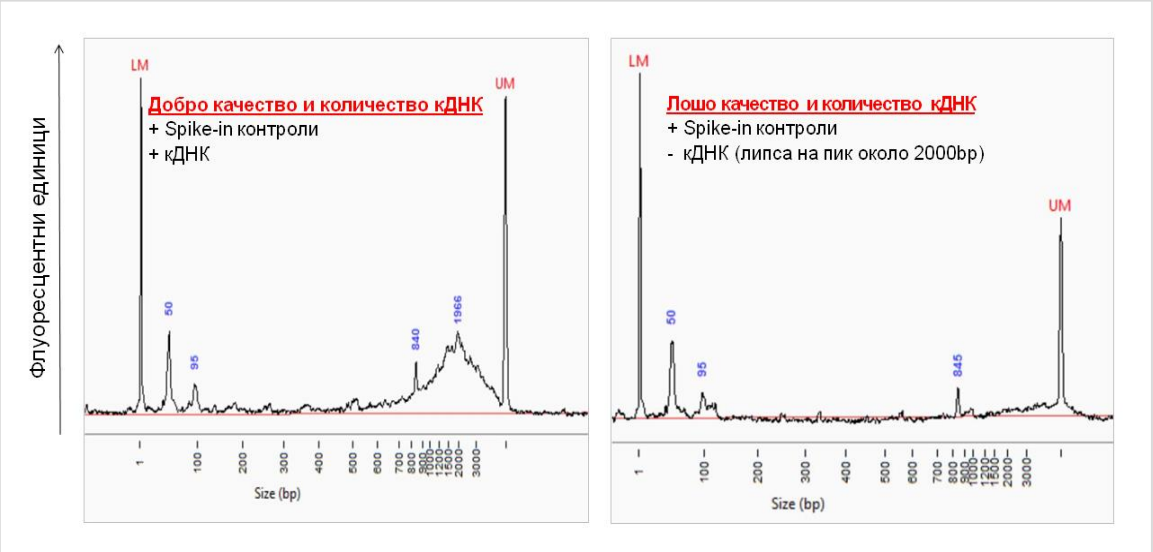
Кожните Т-лимфоцити бяха натоварени на чип за 96 клетки и с помощта на микроскоп бе заснета всяка ямка (фигура 3). Бе съставен протокол с описание на съдържанието на ямките: единична клетка, повече от една клетка, дебри или незапълнена позиция (фигура 3).

Фигура 3. Снимки на част от натоварените върху чипа клетки



От информационните РНКи, изолирани от единична клетка, бяха синтезирани кДНКи. На този етап бе направен качествен контрол на резултата от обратната транскрипция за всяка клетка. Количеството и размерът на кДНКите бе оценен с помощта на Agilend 2100 Bioanalyzer (фигура 4). Технология, при която се извършва традиционна електрофореза в микротръбички на чип. За секвениране бяха подбрани само клетки, от които бе изолирано задоволително количество кДНК (приблизително 10ng) с размер около 2000bp.

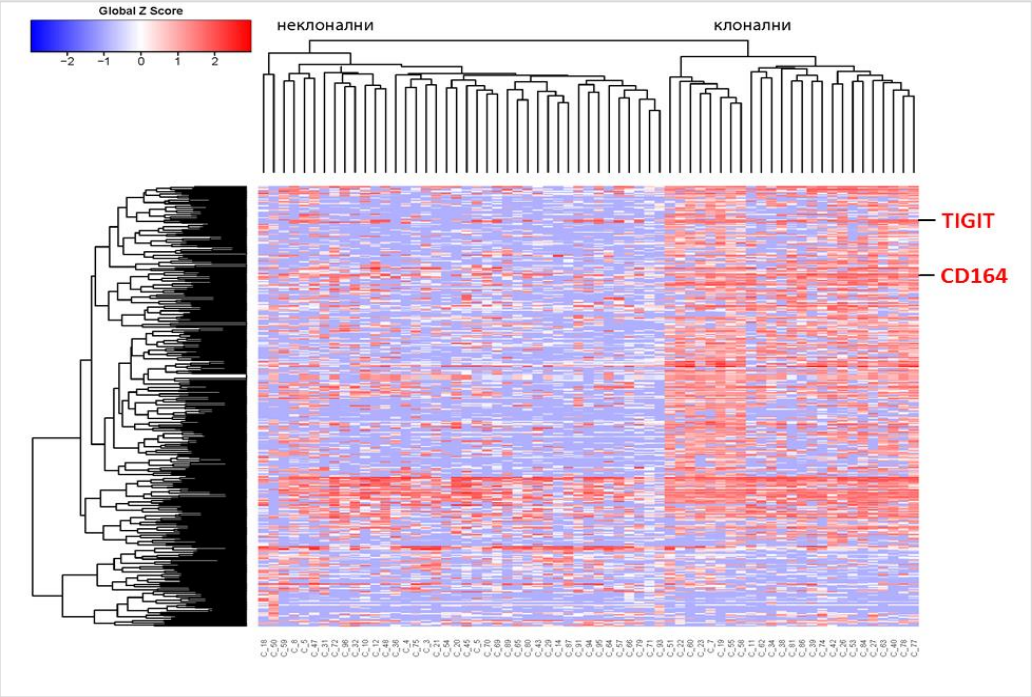
Фигура 4. Аналитичен алгоритъм за подбор на клетки за секвениране.



Общо 65 кожни Т-лимфоцити от напреднал стадий КТКЛ бяха секвенирани. Така получените сурови данни за генната експресия в отделните клетки бяха количествено оценени и нормализирани с помощта на TPM (transcripts per million) метод. За целта бе използван Kallisto софтуеър, посредством който бе определен броя на транскриптите в първоначалните данни от РНК секвенирането. Параметрите на програмата не бяха променяни. Рийдовете за всяка клетка бяха картирани на Homo Sapiens геном (Ensembl archive GRCh37), за да се оцени генната експресия като транскрипти на милион. С помощта на флуоресцентно белязване с анти-човешко Vβ антитяло, Т-лимфоцитите, натоварени върху чипа, бяха разделени на клонална и неклонална популация. 25 клетки бяха определени като клонални, а останалите 40 като неклонални.

С помощта на SINGuLAR, специално разработен софтуерен пакет за анализ на данни от РНК секвениране на единични клетки, бе направен скрининг за диференциално експресирани гени между клоналната и неклоналната популация Т-лимфоцити. След анализ на получените резултати и справка с публикуваните данни до момента CD164 и TIGIT бяха селектирани за по-нататъшни анализи като потенциални туморни и диагностични маркери (фигура 5).

Фигура 5. Диференциално експресирани гени между клоналнта и неклоналната популация кожни Т-лимфоцити от пациент с КТКЛ.



2. Флоуцитометричен анализ на експресията на CD164 и TIGIT върху Т-лимфоцити от периферна кръв на пациенти с левкемичен Т клетъчен лимфом

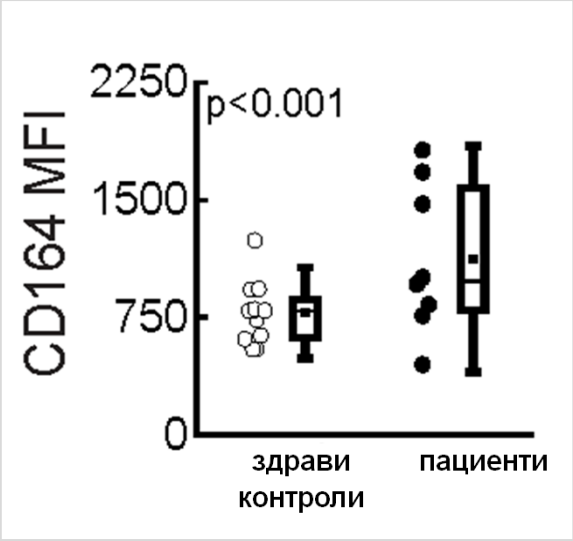
Вторият етап от скрининга за нови потенциални туморни маркери и прицелни молекули за таргетна терапия, които биха улеснили диагностиката и лечението на кожен Т-клетъчен лимфом, бе фокусиран върху протеиновата експресия на CD164 и TIGIT. За целта от периферна кръв на пациенти с левкемичен КТКЛ и с ясно разграничима циркулираща клонална Т-клетъчна популация бяха изолирани мононуклерни клетки. Посредством флоуцитометрия бе измерен интензитета на флуоресценция, отговарящ на експресията на съответния антиген, върху клоналната и неклоналната популация от Т-лимфоцити за всеки пациент и бе сравнен с този при здрави индивиди. Предварително бе определен предоминантния ТКР в кръвта на включените в анализа болни и бе подбрано специфично за Vβ веригата антитяло с цел

да бъде възможно разграничаването на клоналните, малигнени Т-лимфоцити от неклоналните Т-клетки.

За анализ на експресията на CD164 бяха подбрани 8 пациента с левкемичен кожен Т-клетъчен лимфом. Диагнозата Сезари синдром бе поставена в съответствие с критериите на Световната Здравна Организация - Европейска Организация за Изследване и Лечение на Рак за левкемичен КТКЛ/Сезари синдром. За контроли бяха използвани здрави индивиди.

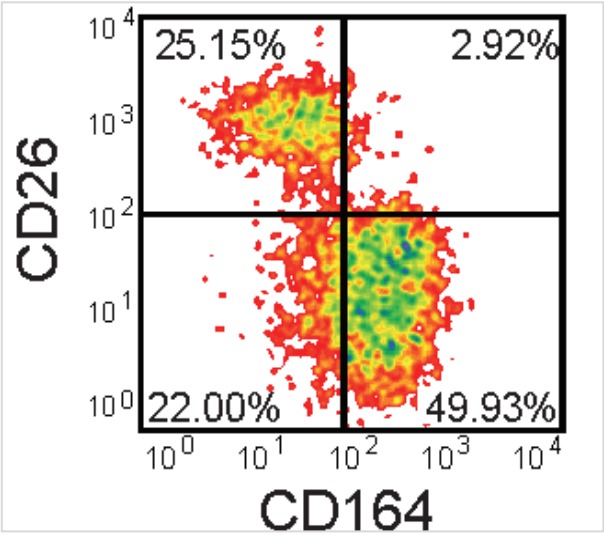
Експресията на CD164 върху клетъчната повърхност на $CD4^+$Т хелпер лимфоцитите от пациенти с левкемичен КТКЛ бе значително увеличена в сравнение със здравите контроли и с пациентите с възпалително заболяване на кожата (фигура 6). Осреднениият интезитет на флуоресценция на CD164 за популацията от Т-лимфоцити, изолирани от пациенти, бе около 1200, докато MFI на CD164 върху Т-клетките от здрави донори бе приблизите 800.

Фигура 6. Експресия на CD164 върху популацията от CD4+ Т-лимфоцити при здрави индивиди и пациенти с левкемичен КТКЛ.



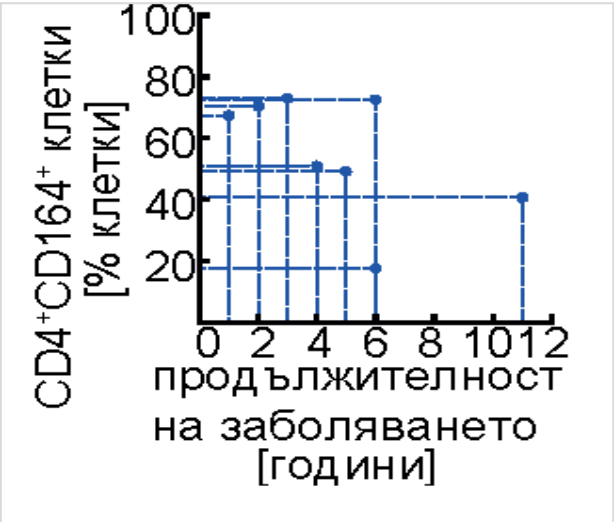
Важно е да се отбележи,че в групата на пациентите експресията на CD164 върху популацията от CD4+ Т-лимфоцити не бе хомогенна. В повечето случаи $CD4^+CD26^+$ доброкачествените Т хелпер лимфоцити бяха $CD164^-$, а повишената експресия на CD164 бе характерна за $CD4^+$ лимфоцити със загуба на CD26 (фигура 7).

Фигура 7. Предоминантна експресия на CD164 върху CD4+ Т- лимфоцити със загуба на CD26.



За контролите не бе установена зависимост между експресията на CD164 и загубата на CD26. В групата на пациентите с левкемичен КТКЛ осреднената експресия на CD164 бе около 30.8% и варираще от 4.3% до 96.0% от общия брой на $CD4^+$ Т-клетките. CD164 експресията при здрави контроли бе приблизително 8.0%, като интервалът бе от 2.3% до 18.2% от цялата популация $CD4^+$Т-лимфоцити . Важно е да се отбележи, че експресията на CD164 върху $CD4^+$ Т- клетките периферна кръв от пациенти с левкемичен КТКЛ бе почти изцяло ограничена в субпопулацията от $CD4^+CD26^-$лимфоцити. Не бе открита зависимост между процента на CD164 положителните Т клетки и агресивността на заболяването (фигура 8). Продължителността на боледувене за пациенти #2 ,#3, #4 и #7 бе изчислена като интервал от поставянето на диагноза до смъртта, а за за живите пациенти #1, #5, #6 и #7- от поставянето на диагноза до момента на провеждане на изследването.

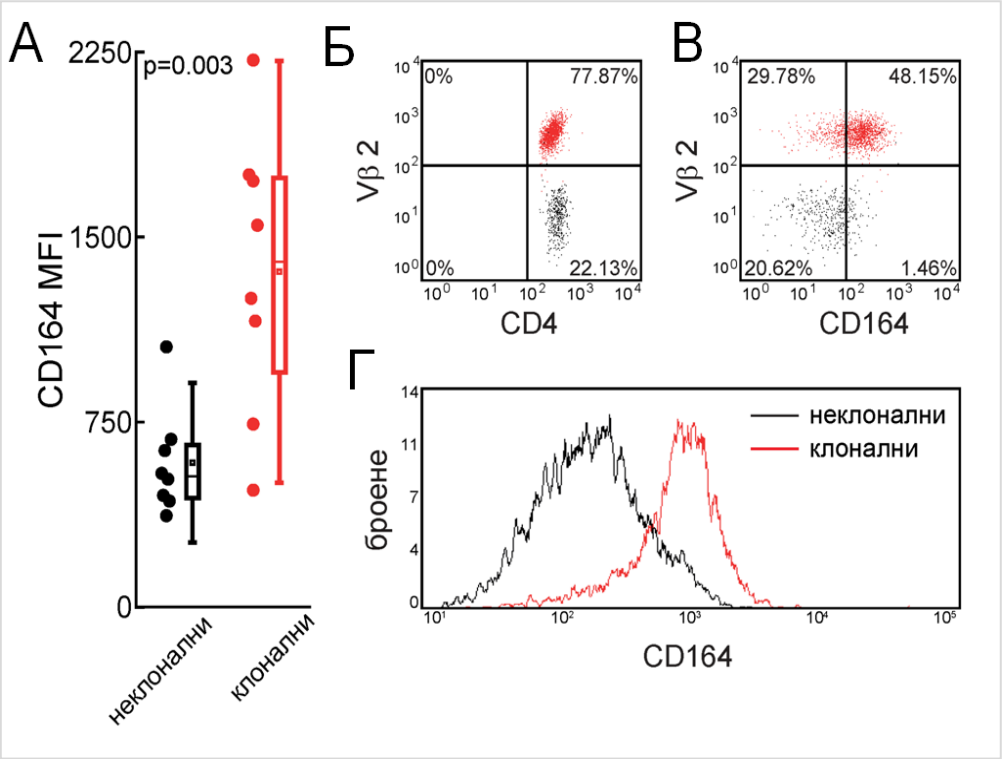
Фигура 8. Зависимост между процента на CD164+CD4+CD26- Т-лимфоцити и агресивността на заболяването.



Като следваща стъпка бе анализирано дали има разлика в нивата на експресия на CD164 върху малигнените, клонални Т-клетки и доброкачествените, неклонални клетки в кръвта на отделните пациенти. Разликите бяха отчетени индивидуално за всеки болен. MFI на CD164 върху неклоналните Т клетки от левкемичен КТКЛ бе сходен с този, измерен върху лимфоцити от здрави донори (MFI 600 или 800 съответно). Експресията на CD164 бе силно повишена (MFI 1360) единствено за малигнената популация от Т-лимфоцити, детектирана посредством експресията на съответния специфичен за болния Vβ клон (фигура 9).

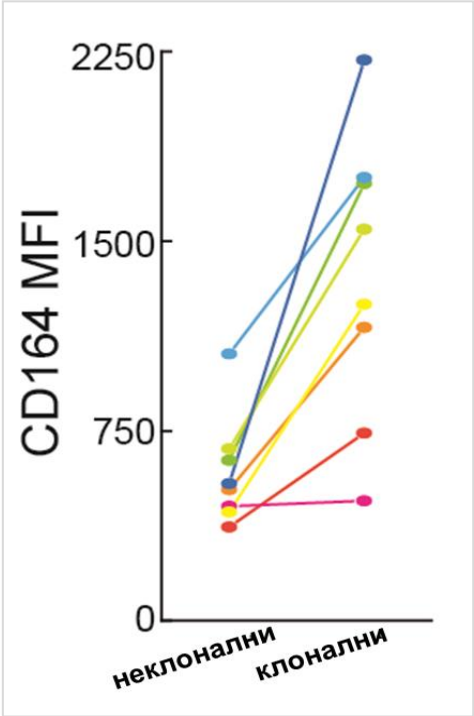
При повечето пациенти (шест от общо осем), високата експресия на CD164 бе лимитирана върху малигнената, клонална Т-клетъчна популация и бе ниска за немалигнените клетки.

Фигура 9. А и Г: предоминантна експресия на CD164 върху клоналните CD4+ Т-лимфоцити; Б и В: ограничаване на експресията на CD164 главно върху клоналната популация.



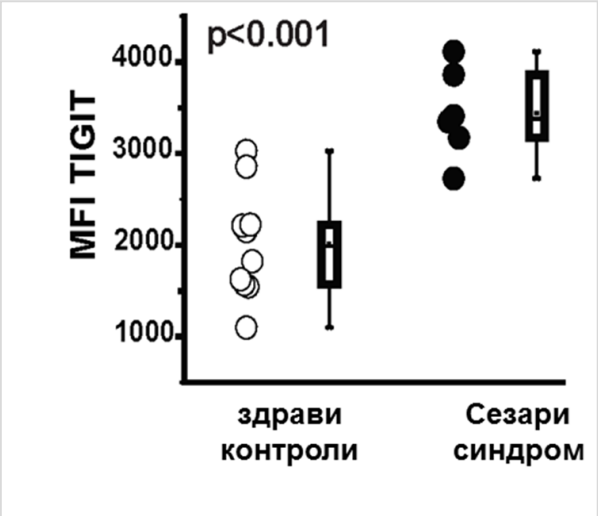
Посредством детайлно сравнение по двойки на експресията на CD164 върху неклонални и клонални $CD4^+$ Т-лимфоцити за всеки пациент, бе установено, че за пациент #3 експресията на CD164 върху клоналните, малигнени (Benoit, Jariwala et al. 2016)Т-клетки (MFI=741.92) не бе завишена в сравнение със здравите контроли. Въпреки това бе два пъти по-висока от тази върху неклоналните клетки от същия пациент (MFI=370.37) (фигура 10; означение с тъмно оранжев цвят). Само при един болен с диагноза Сезари синдром (пациент #4), бе измерена сравнително ниска експресия на CD164 и не бе отчетена интраиндивидуална разлика в стойностите на MFI за неклонални (MFI=452.9) и клонални (MFI=473.92) Т лимфоцити (фигура 10).

Фигура 10. Разликата в средния интензитет на флуоресценция за CD164 между клонални и неклонални клетки за всеки включен в проучването пациент.



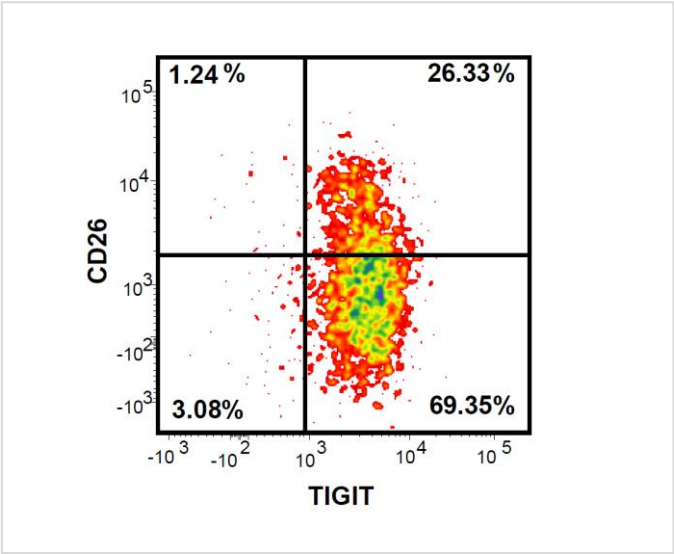
Аналогичен флоуцитометричен анализ на пост-транслационната експресия бе направени и за TIGIT. За целта бяха изолирани мононуклерани клетки от периферна кръв на 10 здрави донора и 6 пациента с левкемичен кожен Т-клетъчен лимфом. Диагнозата Сезари синдром бе поставена в съответствие с критериите на Световната Здравна Организация - Европейска Организация за Изследване и Лечение на Рак за левкемичен КТКЛ/Сезари синдром. За контроли бяха използвани здрави индивиди. Бе установена повишена експресия на TIGIT върху CD4+ Т-лимфоцити, изолирани от пациенти със Сезари синдром, в сравнение с CD4+ Т-клетки от здрави донори (фигура 11).

Фигура 11. Завишена експресия на TIGIT върху CD4+ Т-лимфоцити от Сезари синдром пациенти в сравнение със същата популация клетки, изолирана от здрави индивиди.



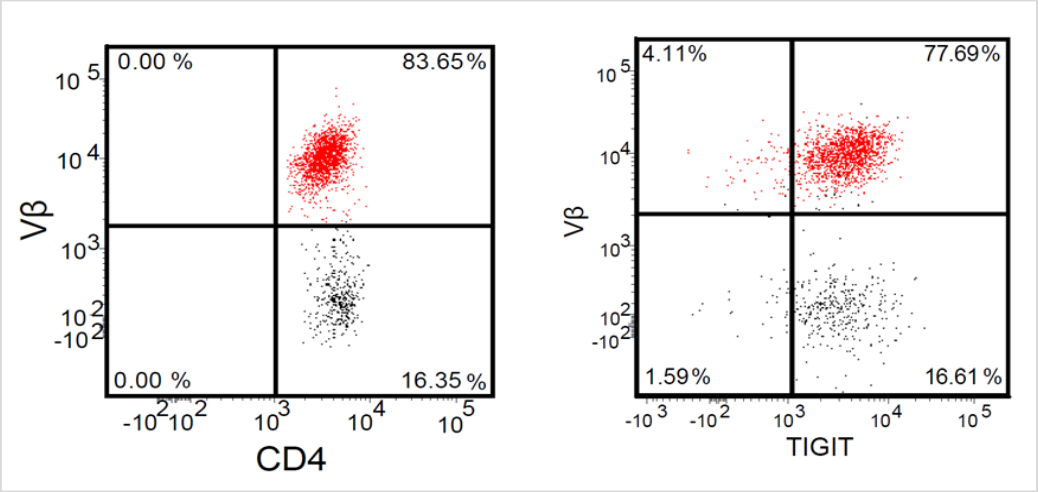
Повечето CD4+TIGIT+клетки бяха със загуба на CD26, характерна за раковите клетки (фигура 12).

Фигура 12. Връзка между експресията на TIGIT и загубата на CD26.



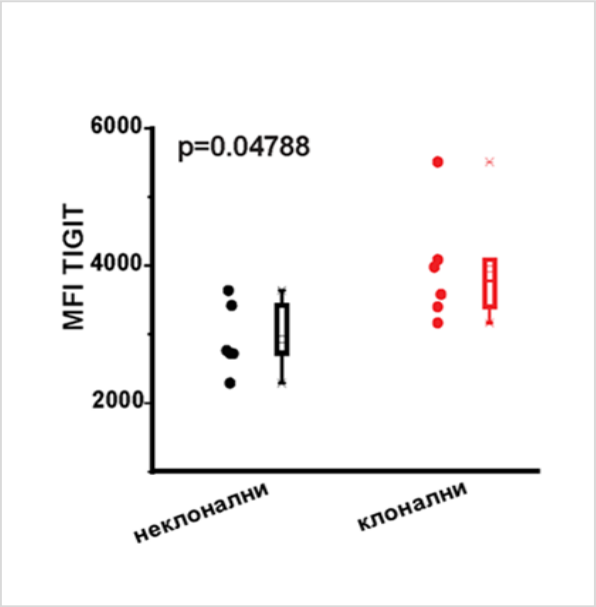
За разлика от CD164, TIGIT бе експресиран както върху клоналната поулация от Т-лимфоцити, идентифицирана с помощта на специфично за всеки пациент анти-Vβ антитяло, така и върху неклоналните Т-клетки (фигура 13).

Фигура 13. Детекция на TIGIT протеини върху клоналната и неклоналната популация от CD4+ Т-лимфоцити.



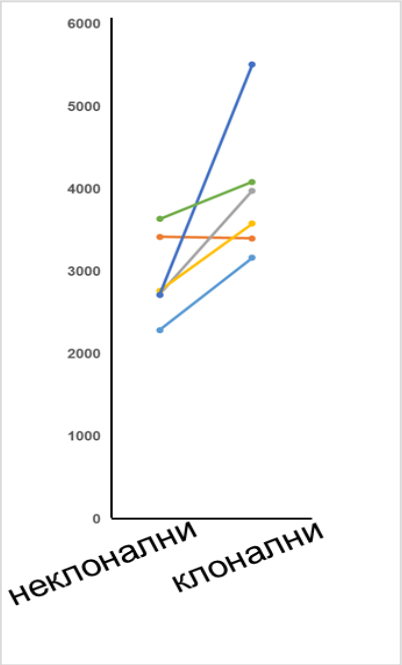
Независимо от това, че TIGIT бе експресиран и на клоналната, и на неклоналнта популация Т-лимфоцити, средният интезитет на флуоресценция бе завишен за клоналната популация като отчетената разлика бе със статистическа значимост (фигура 14).

Фигура 14. Завишен MFI на TIGIT за клоналната популация CD4+ Т-лимфоцити.



Бяха анализирани нивата на експресия на TIGIT върху популациите от клонални и неклонални Т-клетки за всеки пациент индивидуално и резултатите бяха съпоставени един на друг (фигура 15). При пет (от общо шест, включени в изследването пациента) бяха установени завишени нива на експресия на TIGIT върху клоналната популация (MFI около 3967) в сравнение с неклоналната популация (MFI приблизително 2400). Само при един пациент (означен на графиката с оранжев цвят) не бе наблюдавана разлика в експресията на TIGIT между двете популации CD4+ Т-клетки.

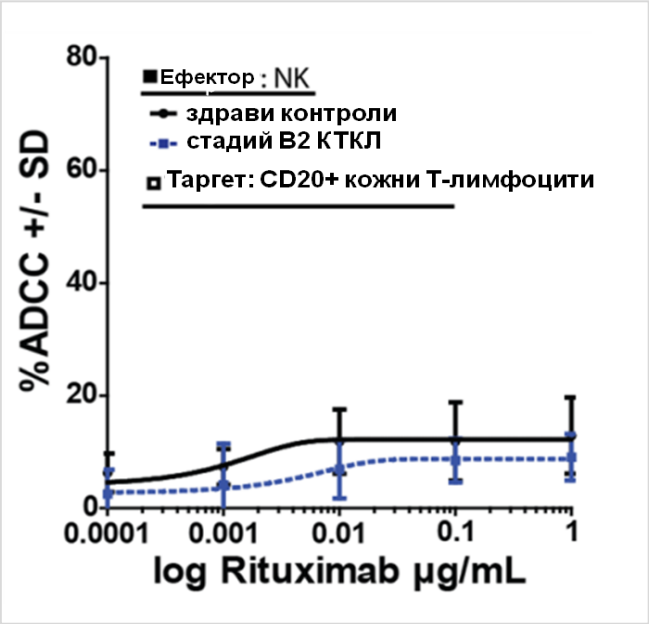
Фигура 15. Експресия на TIGIT върху клонални и неклонални Т-лимфоцити, изолирани от един и същи пациент (n=6).



3. Анализ на ефективността на евентуална таргетна терапия при пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом. Оценяване на нивата на антитяло-зависимата цитотоксичност (основен молекулен механизъм на таргетните терапии като цяло) при пациенти и здрави индивиди.

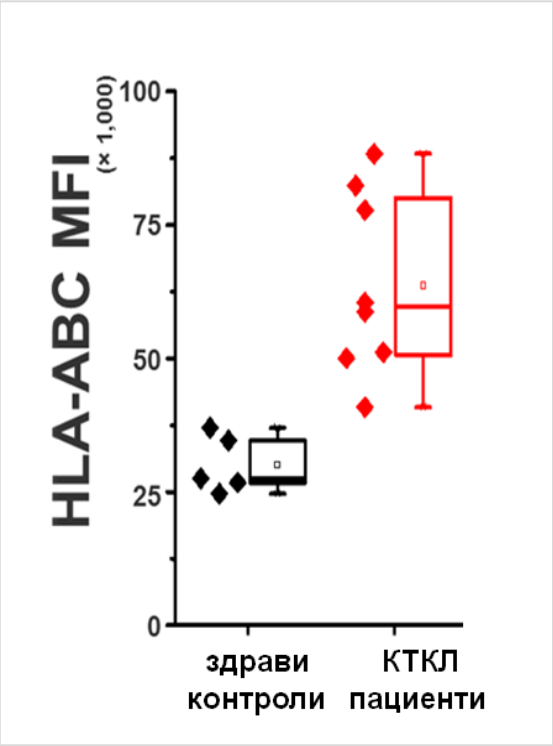
За целта бе създаден ин витро модел на таргетна теарпия с Ритуксимаб при КТКЛ пациенти с доказана експрсия на CD20 върху Т-лимфоцитите. По този начин бе оценена силата на антитяло-зависимата цитототоксичност при 3 пациента с кожен Т-клетъчен лимфом и 3 здрави донора. За ефекторни клетки бяха използвани NK клетки от пациенти и от здрави донори. В експерименталната постановка като таргетни клетки бяха използвани: кожни Т-лимфоцити от пациенти с CD20+ Т-клетъчен лимфом и Ramos клетки. Бяха доказани понижени нива на ADCC в случаите, когато ефекторните клетки бяха клетки естествени-убийци от пациенти (фигура 16).

Фигура 16. Сравнителен анализ на антитяло-зависима цитотоксичност (ефекторни клетки: NK клетки от пациенти или здрави донори, таргетни клетки: CD20+ Т-лимфоцити, изолирани от лезионна кожа на пациенти с КТКЛ); n=3 за всяка експериментална постановка;



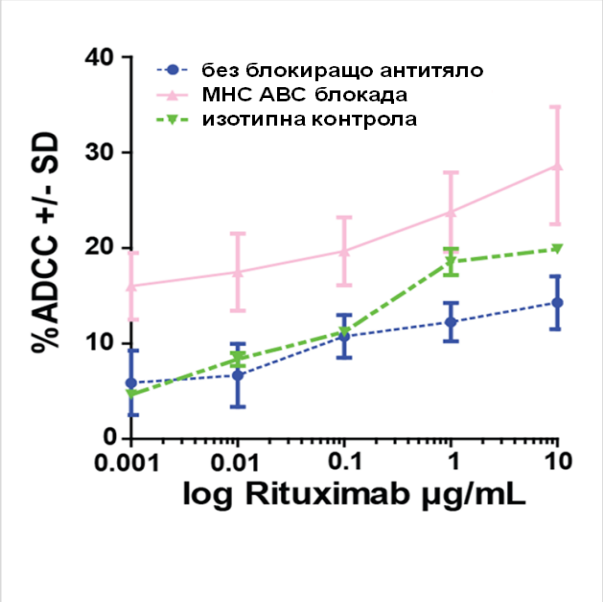
Един от основните механизми за подтискане на цитотоксичната функция на NK клетките е експресия на MHC клас I молекули по повърхността на таргетните клетки. Същите тези антигени се разпознават от KIR рецептори върху клетките естествени убийци и това супресира секрецията на перфорини и гранзими, необходими за лизис на прицелната клетка. Ето защо бе проучена експресията на MHC клас I антигените върху туморните клетки при пациенти с КТКЛ и бе сравнена с тази при здрави контроли. Бяха изолирани мононуклеарни клетки от периферна кръв на 8 пациента и 5 здрави донора. Бе установена повишена експресия на MHC клас I в групата на болните (фигура 17).

Фигура 17. Свръхекспресия на MHC клас I молекули върху CD4+ Т-лимфоцити от пациенти с кожен Т-клетъчен лимфом.



Бе проверено дали блокиране на MHC клас I молекулите върху повърхността на туморните клетки би подобрило антитяло-зависимата цитотоксична функция на NK клетките от болни. Анализът отново бе базиран на описания по-горе хемилуминесцентен метод за оценяване на степента на лизиране на таргетните клетки с помощта на глицералдехид фосфат дехидрогена. Цитотоксичната функция на клетките естествени убийци, изолирани от пациенти, бе възстановена след блокадата на MHC клас I антигените по повърхостта на туморните клетки (Фигура 18).

Фигура 18. Възстановяване на антитяло-зависимата цитотоксичност на NK клетките след блокада на MHC клас I молекулите по повърхността на туморните клетки.



В последните години все повече се засилва интересът към разработване на таргетни терапии за лечение на кожен Т-клетъчен лимфом. Няколко нови открития в областта на КТКЛ бяха посрещнати с интерес в медицинските среди, защото доведоха до разработване на нови и ефективни таргетни терапии. Мултицентрични фаза III клинични проучвания вече текат за анти-CD30 и анти--CCR4, като таргетната група са пациенти с рефракторен кожен Т-клетъчен лимфом. Подготвя се и ново мултицентрично фаза I клинично проучване на хуманизирано анти-CD158k моноклонално антитяло (Sokolowska-Wojdylo, Wenzel et al. 2005, Ortonne, Le Gouvello et al. 2012, Guenova, Hoetzenecker et al. 2014, Duvic, Tetzlaff et al. 2015, Mehra, Ikenberg et al. 2015, Moins-Teisserenc, Daubord et al. 2015). Въпреки това скринингът за други маркери с потенциал за таргетна терапия, насочена срещу тях, усилено продължава.

CD164 е описан като адхезивен сиаломуцин върху CD34+ клетките, който подтиска пролиферацията на хематопоетичните клетки (Zannettino, Buhring et al. 1998). При скрининг посредством секвениране на иРНКи от единични Т-лимфоцити CD164 бе детектиран като диференциално експресиран ген между клонални и неклонални кожни Т-лимфоцити от пациент с Микозис фунгоидес. Впоследствие бе доказана повишена експресия на CD164 върху малигнени Т-лимфоцити в кръв от пациенти с левкемичен кожен Т-клетъчен лимфом. В проби от различни пациенти установихме, че MFI на

CD164 за популацията от Т-лимфоцити, изолирани от болни с КТКЛ, е значително по-висок от този, измерен при здрави контроли. CD164 експресията в повечето случаи бе лимитирана върху CD4+CD26- малигнените Т-лимфоцити, които бяха идентифицирани по експресията на специфичния за всеки анализиранн пациент Vβ клон.

Данните от проведените изследвания съвпадат със скорошно проучване на Wysocka и колектив (Wysocka, Kossenkov et al. 2014) и подсказват, че увеличена експресия на CD164 би могло да се използва като диагностичен маркер за левкемичен Т-клетъчен лимфом/Сезари синдром. На базата на данните от контролните популации, бе установено, че флоуцитометрично детектиране на > 20% CD164 върху CD4+ клетките в периферна кръв от еритродерматични пациенти би трябвало най-малкото да събуди съмнение за Сезари синдром.

В някои проучвания се откриват данни за CD164 като сигнален рецептор, участващ в пролиферацията, клетъчната адхезия и миграцията на хематопетичните стволови клетки, както и на прогениторните клетки (Watt, Butler et al. 2000, Forde, Tye et al. 2007). Скорошни данни от функционални експерименти подсказват връзка между експресията на CD164 и прогресия при рак на яйчниците (Huang, Chen et al. 2013). Таргетиране на CD164 в D283-MED медулобластомна клетъчна линия и в HCT116 клетъчна линия от рак на дебелото черво води до намалена туморна пролиферация, миграция и инвазивност (Tang, Zhang et al. 2012, Shi, Lu et al. 2014). Всички тези данни категорично подсказват, че CD164 е подходящ маркер за таргетна терапия на КТКЛ.

Аналогични бяха и данните за TIGIT, за който по време на скрининга за нови туморни маркери, също бе установена различна експресия на пост-транскрипционно ниво в малигнените, клоналните CD4+ Т-лимфоцити, изолирани от лезионна кожа на пациент с КТКЛ, в сравнение с неклоналните Т-клетки. Когато експресията на TIGIT бе анализирана и на пост-транслационно ниво, бяха установени завишени нива на TIGIT върху популацията от Т-лимфоцити от болни (MFI приблизително 3180) в сравнение със същите клетки при здрави индивиди (MFI около 2090). Средният интезитет на флуоресценция за TIGIT бе по-висок за клоналните CD4+ Т-лимфоцити (MFI 3967) при сравнение с неклонални (MFI 2400). Експресията на TIGIT корелираше със загубата на CD26 от клетъчната повърхност на Т-клетките. Бе направен извод,че TIGIT също би могъл да бъде използван като диагностичен маркер за КТКЛ и е подходящ за разработване на таргетна терапия срещу него.

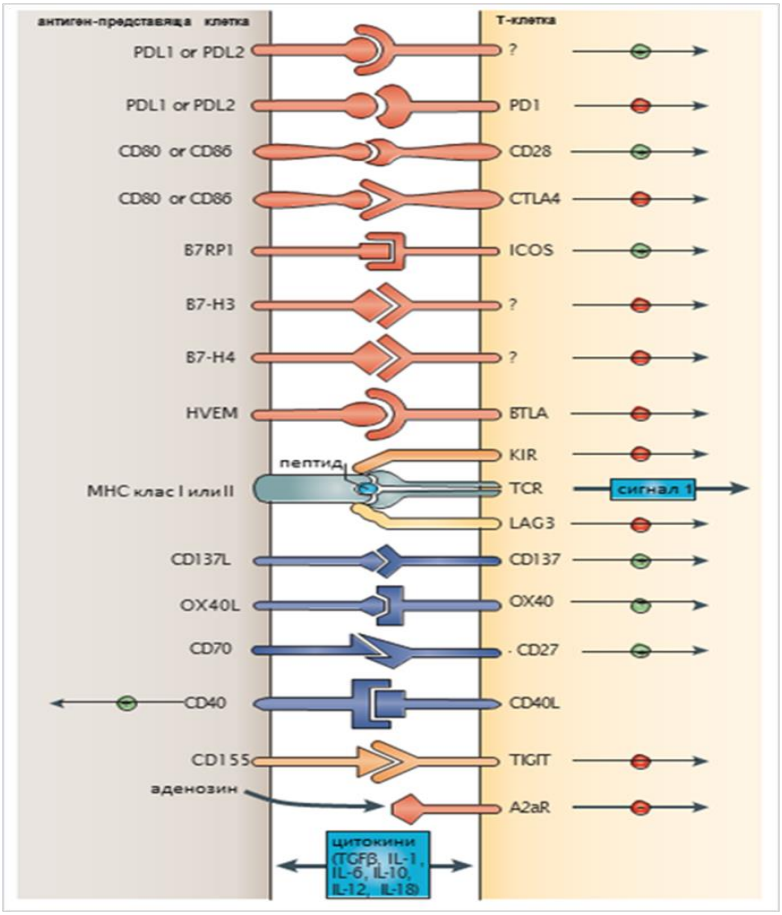
Свръхекспресията на TIGIT върху лимфоцити от пациенти с КТКЛ подсказва и възможен механизъм на имуносупресия при конкретното заболяване. Според публикация на Xin Yu и колектив (Yu, Harden et al. 2009) повърхностната експресия на протеина TIGIT потиска активирането на Т-клетките чрез генериране на зрели имунорегулаторни дендритни клетки. Човешките дендритни клетки експресират полиовирусен рецептор (CD155), който се свързва с TIGIT с висок афинитет, което води до засилена продукция на инетрлевкин-10 и намалена секреция на интерлевкин 12p40.

Много литературни данни сочат, че цитокиновата микросреда играе важна роля в потискането на имунния отговор срещу тумора, тъй като е част от сигнализацията през имунологичния синапс по време на инфекция (Friedl, den Boer et al. 2005). При пациенти с КТКЛ самите малигнени клетки са източник на супресивни Th2 цитокини (Guenova, Watanabe et al. 2013) и се наблюдава прогресиращо потискане на клетъчния имунитет с напредване на заболяването (Girardi, Heald et al. 2004). Неутрализирането на Th2 цитокините възстановява Th1, но не и Th17 имунните отговори независимо от това, че IL-4 директно понижава нивата на t-bet and rorc (транскрипционни фактори в CD4+Т клетките съответно за Th1 и Th17) (Park, Li et al. 2005). Този факт подсказва нарушени имунорегулаторни механизми, които са по-сложни от просто взаимодействие между малигнените и немалигнените Т-лимфоцити. Предполага се, че дендритните клетки също играят важна роля в молекулните механизми на имунна супресия при КТКЛ. Дендритните клетки са ключови участници в модулирането на имунния отговор срещу "непознато" и дирижират диференцирането на ефекторните CD4+ Т-клетки в Th1, Th2, Th17, Th22 и т.н.(Zhu, Yamane et al. 2010). За IL-4 е доказано, че може да инициира Th2 клетъчна диференциация посредством директно въздействие върху Т-лимфоцитите (Zhu and Paul 2008, Zhu and Paul 2010), но от друга страна може да даде началото на IL-12 зависимо възстановяване на Th1 имунния отговор с помощта на дендритните клетки (Guenova, Volz et al. 2008). Именно с този регулаторен механизъм се обяснява преходът от остра Th2- към хронична Th1-доминирана проява на атопичен дерматит (Hamid, Boguniewicz et al. 1994, Guenova, Volz et al. 2008). Съвпадението между повишена продукция на IL-4 и потисната секреция на IL-12 при напреднал стадий КТКЛ подсказва, че важната обратна връзка между дендритните клетки и Т-лимфоцитите най-вероятно в случая не функционира. Доказаната свръхекспресия на TIGIT върху Т-лимфоцити, изолирани от болни, е един възможен молекулен

механизъм, използван от туморните клетки за "изключване" на дендритните клетки и за потискане на "опасната" за тях обратна връзка, активираща Th1 имунния отговор. TIGIT по повърхността на малигнените Т-лимфоцити се свързва с CD155 върху дендритните клетки, което води до супресия на продукцията на интерлевкин-12 от дендритните клетки, които всъщност са основен източник на този цитокин при човек, и до засилена секреция на интерлевкин-10. По този начин се осигурява тумор-специфично цитокиново обкръжение, в което преобладава интерлевкин-4 и липсва интерлевкин-12.

TIGIT се оказва подходяща молекула за таргетиране и по още една причина: участва в имунния синапс между антиген - представящите клетки (дендритните клетки) и Т-лимфоцитите (фигура 19).

Фигура 19. Схема на ключови участници в имунологочния синапс (адаптирана от The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy, Drew M. Pardoll, Nature reviews, 2012)



Характерни особености на кожен Т-клетъчен лимфом са подтиснатост на антиген-специфичните отговори, нарушена клетъчно-медиирана цитотоксичност и намалено разнообразие на Т-клетъчните популации (редуциран репертоар на Т-клетъчния рецептор и поява на предоминантен клон). Всички по-горе описани процеси предполагат участието на антиген-представящите клетки (основно дендритните клетки) в оркестрирането на такъв тип профил на имунния отговор. В зависимост от сигналите, които получват дендритните клетки могат да изпълняват функции с противоположен ефект. От една страна стимулират наивните или на имунната памет Т - клетки, а от друга страна могат да индуцират толеранс посредством отстраняване на авто-реактивните Т-лимфоцити в тимуса, генериране на анергия в зрелите Т-клетки и индуциране на Т регулаторни клетки.

Механизмите, стоящи зад този важен имунологичен феномен в КТКЛ са все още не добре изяснени. Ето защо от първостепенно значение е да се обясни как малигнените Т-клетки повлияват имунологичния синапс, модулират функцията на антиген-представящите клетки и по този начин индиректно повлияват диференциацията на "здравите" Т-клетки в тяхното обкръжение. Повишената експресия на супресорния протеин TIGIT върху клоналните Т-лимфоцити от болни с КТКЛ се предполага, че повлиява дендритните клетки в туморната микросреда и подтиска имунния отговор от страна на неклоналните Т-клетки.

Голямото разнообразие от различно експресирани в сравнение със здрави контроли молекули, харектерни за малигнените Т-лимфоцити при кожен Т-клетъчен лимфом, представляват антигени, по които туморните клетки биха могли да бъдат различени от нормалните клетки от същия вид. Когато става въпрос за Т-лимфоцити, силата и качеството на имунния отговор, който започва с разпознаване на антигена от Т-клетъчния рецептор, се регулира от баланса от стимулаторни и инхибиторни сигнали (така наречения имунен чекпойнт) (Pardoll 2012). При нормални физиологични условия, имуният чекпойнт е от първостепенно значение за запазване на толеранс към собствените клетки, за подтискане на автоимунни прояви и за предпазванена тъканите, когато имунната система реагира на нашествие на патоген. Един от механизмите, по който туморните клетки се предпазват от имунен отговор срещу тях, е повишена експресия на някои от супресивните протеини, участващи в имунния синапс (в случая бе доказана повишена експресия на инхибиторния TIGIT).

Т-клетките са основен обект на множество нови терапевтични подходи, имащи за цел да манипулират ендогенните анти-туморни имунни отговори. Активирането на немалигнените, неклонални Т-лимфоцити срещу клоналните, ракови клетки при КТКЛ би било успешен лечебен метод поради уникалните функции на този тип клетки. Т-лимфоцитите селективно разпознават пептиди, произлизащи от всички клетъчни компартменти, могат директно да убият клетката, представяща съответния антиген (тази роля се изпълнява от CD8+ Т-клетки, познати още като цитотоксични Т-лимфоцити (ЦТЛ)) и имат способността да оркестрират различен тип имунни отговори (посредством CD4+ Т-хелперни клетки. Обобщено, Т-лимфоцитите са ключова популация от имунни клетки, интегриращи адаптивните и вродените ефекторни механизми. Неслучайно, голяма част от клиничните изпитвания, провеждани в момента, включват агонисти на ко-стимулаторните рецептори или агонисти на инхибиторните сигнали от имунологичния синапс (Falchi, Sawas et al. 2016, Fujimura, Kambayashi et al. 2016, Menon, Shin et al. 2016, Du, Herbst et al. 2017). Множество литературни данни потвърждават, че блокада на имунния чекпойнт води до повишаване на анти-туморния отговор и че това е ниша за разработване на ново поколение лекарствени препарати за лечение на рак. Медиираният от Т-лимфоцитите имунитет включва няколко последователни стъпки: клонална селекция на антиген-специфични Т-клетки, тяхното активиране и пролифериране във вторичните лимфоидни тъкани, транспортът им до тъканите със завишена експресия на съответния антиген, отключване на ефекторните им функции и комуникация с останалите клетки на имунната система чрез секреция на цитокини и мембранни лиганди. Всеки етап на този процес се регулира от баланса между стимулаторни и инхибиторни сигнали, които позволяват фино модулиране на имунния отговор. Въпреки че инхибиторните сигнали повлияват главно вътреклетъчни пътища, много от тях започват с мембранен рецептор, чийто лиганд е свързан с мембрана и разположен в екстрацелуларния матрикс или разтворим фактор (цитокин например). По правило ко-стимулаторните, ко-инхибиторните рецептори и съответните им лиганди, регулиращи Т-клетъчното активиране, не е задължително да бъдат свръхекспресирани в раковите клетки и нивата им са сходни с тези при нормални клетки от същия вид. Инхибиторните лиганди и техните рецептори, регулиращи ефекторните функции на Т-клетките са тези, които обикновено са свръхекспресирани върху туморните клетки или върху нетрансформираните клетки в туморното обкръжение. Разтворимите и мембранно-свързани рецептор-лиганд двойки (като TIGIT) от имунния чекпойнт са най-

подходящи за разработване на терапия, защото биха могли да бъдат използвани антитела- агонисти за ко-стимулаторните пътища и антитела антагонисти за ко-инхибиторните пътища. При кожен Т-клетъчен лимфом туморните клетки са Т-лимфоцити. Следвайки по-горе описаната логика малигнените Т-лимфоцити би трябвало да свръхекспресират някои супресорни молекули, с помощта на които да изключват ефекторната функция на антиген-представящите клетки, както и на останалите имунни клетки в обкръжението им. Имунната супресия при пациенти с напреднал кожен Т-клетъчен лимфом би могла да се дължи също на нарушен баланс между инхибиторните и стимулаторните сигнали, изпращани и получавани от Т-лимфоцитите.

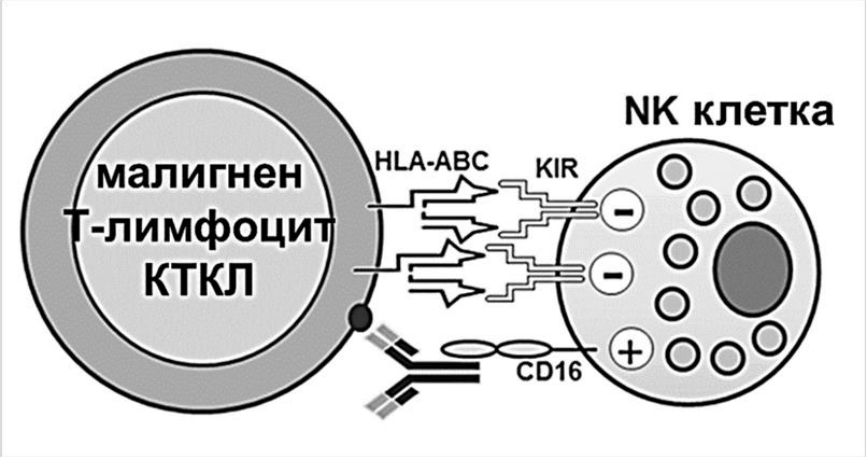
Впредвид на по-горе написаното евентуално таргетиране на TIGIT би довело до няколко взаимно допълващи се терапевтични ефекта, чийто краен резултат е лизис на туморните клетки: активиране на антитяло-зависимата цитотоксичност на клетките естествени убийци (принцип на таргетната терапия), възстановяване на протективния Th1 имунен отговор и блокада на инхибиторните сигнали по повърхността на клоналните Т-лимфоцити част от имунологичния синапс.

Принципът, който е залегнал в таргетните терапии, е активиране на NK клетките и принуждаването им да лизират туморните клетки, които са опсонизирани от антитела, насочени срещу антигени, специфични за раковите клетки. По повърхността на клетките естествени убийци са разположени Fc -рецептори (CD16α), които разпознават консервативните домени на антителата, свързани с туморните клетки, и това води до индуциране на ефекторната цитотоксична функция на NK клетките и секреция на прерфорини и гранзими, които лизират таргетната клетка (фигура 26).

Клетките естествени убийци са лимфоцити, които са класифицирани като ефекторни клетки на вродения имунитет и представляват първа линия на защита срещу инфекция или трансформирани туморни клетки. NK клетките осигуряват бърз и директен имунен отговор посредством техните ефекторни функции: цитотоксичност и секреция на цитокини (Cerwenka and Lanier 2001). Активността и цитотоксичността на NK клетките зависи от баланса между активиращи и потискащи сигнали, които получава от прицелната клетка (Pegram, Andrews et al. 2011, Long, Kim et al. 2013). Голямото разнообразие от рецептори, разположени по повърхността, дава възможност на NK клетките да "оценят" количеството на стимулаторните и инхибиторните молекули

върху таргетната клетка, което от своя страна отключва или не повлиява ефекторната им функция. За да се достигне до лизис на прицелната клетка от страна на клетките естествени убийци, трябва активиращите сигнали са надделеят. Силни инхибиторни сигнали от страна на раковата клетка в много случаи са причина за поддържане на неактивното състояние на NK клетките. Причина за наблюдавания процес е повишена експресия на NK супресорни молекули върху туморните клетки (Pahl and Cerwenka 2015).

Фигура 20. Молекулен механизъм на действие на таргетна терапия, адаптирана от интернет.



При пациентите с диагноза КТКЛ, изследвани от нас, бяха доказани понижени нива на антитяло-зависима клетъчна цитотоксичност. Тези данни подсказват, че евентуалното назначаване на таргетна терапия при такива болни, не би дало очаквания добър резултат, поради наблюдаваната анергия на клетките естествени убийци. Ето защо бе необходимо да бъдат проучени молекулните механизми, използвани от малигнените CD4+ Т-лимфоцити за супресиране на ефекторната функция на NK клетките.

Добре изследвани инхибиторни лиганди за NK клетките са човешки левкоцитни антигени (HLA): HLA-A (разпознава се от рецептор по повърхността на клетките естествени убийци, носещ името имуноглобулиноподобен рецептор на клетките убийци, killer-cell immunoglobulin-like receptors, KIR), HLA-B (съответстващ рецептор KIR), HLA-C (съответстващ рецептор KIR), HLA-E (съответстващ рецептор CD94-NKG2A) и лектин- подобен транскрипт 1, lectin-like transcript 1: LLT1 (съответен

рецептор NKRP1A) (Mathew, Horton et al. 2014, Mathew and Mathew 2015, Pahl and Cerwenka 2015).

Когато бе изследвана експресията на MHC клас I протеините по повърхността на Т-лимфоцити от болни с КТКЛ, бяха установени завишени нива на средния интезитет на флуоресценция за MHC ABC върху туморните клетки, което би могло да бъде възможно обяснение за анергията на NK клетките при пациенти с КТКЛ. След блокиране на MHC клас I протеините по повърхността на туморните клетки, цитотоксичната ефекторна функция на NK клетките бе възстановена. Засиленото лизиране на туморни клетки от страна на клетките естествени убийци след блокада на MHC ABC подсказва, че евентуално комбиниране на таргетна терапия и инхибиране на KIR рецепторите по повърхността на NK клетките, теоритично би дало по-добър лечебен ефект.

VI. Приноси

1. Бе използвано и валидирано секвениране на иРНКи от единични клетки, като нов подход за откриване на нови туморни маркери, приложими в рутинната диагностика и даващи възможност за разработване на таргетни терапии за лечение на пациенти с диагноза кожен Т-клетъчен лимфом.

2. Бяха открити два нови маркера CD164 и TIGIT, специфични за малигнената популация CD4+ Т-лимфоцити, което ги прави подходящи за откриване на циркулиращи туморни клетки в периферното кръвообръщение на пациенти с КТКЛ и подходящи за употреба в рутинната диагностика.

3. Бе доказано, че е възможно разработване на таргетна терапия, насочена срещу CD164 и TIGIT.

4. Бе установена понижена антитяло-зависима цитотоксичност на клетките естествени убийци при болни от КТКЛ.

5. Бе доказано, че назначаване единствено на подходяща таргетна терапия на съответния пациент с КТКЛ не би довело до добър лечебен ефект и успешно справяне със заболяването.

6. Бе предложен терапевтичен подход за активиране на клетките естествени убийци при пациенти с КТКЛ.

7. Бе постулирано, че при лечение на КТКЛ комбиниране на блокада на KIR рецепторите по повърхността на клетките естествени убийци със специфична за пациента таргетна терапия би подобрило ефекта от назначената таргетна терапия .

VII. Публикации

Amann VC, Dreier J, **Ignatova D**, Kamarashev J, Kerl K, Kempf W, Pascolo S, Dummer R,Cozzio A, Guenova E. **DisseminatedPrimary Cutaneous CD8+ Small/medium-sized Pleomorphic T-cell Lymphoma Responding to Hydroxychloroquine**.ActaDermVenereol. 2015 May;95(5):602-3. doi: 10.2340/00015555-2002.

DeSimone JA, Sodha P, **Ignatova D**, Dummer R, Cozzio A, Guenova E.**Recent advances in primary cutaneous T-cell lymphoma.** CurrOpinOncol. 2015 Mar;27(2):128-33. doi:10.1097/ CCO.0000000000000161.

Guenova E, Skabytska Y, Hoetzenecker W, Weindl G, Sauer K, Tham M, Kim KW, Park JH, Seo JH, **Ignatova D**, Cozzio A, Levesque MP, Volz T, Köberle M, Kaesler S, Thomas P, Mailhammer R,Ghoreschi K, Schäkel K, Amarov B, Eichner M, Schaller M, Clark RA, Röcken M, Biedermann T. **IL-4 abrogates T(H)17 cell-mediated inflammation by selective silencing of IL-23 in antigen-presenting cells**.Proc Natl AcadSci U S A. 2015 Feb 17;112(7):2163-8. doi: 10.1073/ pnas. 1416922112.

Desislava Ignatova*, Emmanuella Guenova*, Yun-Tsan Chang, Emmanuel Contassot, TarunMehra, Ieva Saulite, Alexander Navarini, VanyoMitev, Reinhard Dummer, Dmitry V. Kazakov, Lars Einar French, Wolfram Hoetzenecker, Antonio Cozzio. **Expression of CD164 on malignant T cells in Sézary Syndrome**. ActaDermVenereol., equally contributed. . 2016 May;96(4):464-7. doi: 10.2340/00015555-2264.PMID:26524186.

Sönnichsen A, Saulite I, Mangana J, Kerl K, Mehra T, **Desislava I**, Chang YT, Petrausch U, Schmid-Grendelmeier P, Hoetzenecker W, Cozzio A, Guenova E.**Interleukin-1 receptor antagonist (anakinra) for Schnitzler syndrome**. J Dermatolog Treat. 2016 Oct;27(5):436-8. doi: 10.3109/09546634.2015.1136048. Epub 2016 Feb 10.

Kollmann D., **D. Ignatova**, J. Jedamzik, YT Chang, G. Jomrich, M. Paireder, I. Kristo, D. Kazakov, M. Michal, W. Hoetzenecker, T. Schatton, R. Asari, M. Preusser, P. Birner, E. Guenova, S. F. Schoppmann. **Overexpression of PD1 not only on tumor infiltrating lymphocytes but also on tumor cells is associated with worse clinical outcome in esophageal adenocarcinoma**.Annals of Surgical Oncology 2017. In press.

VIII. Участие в международни конференции

1. **11th World Immune Regulation Meeting, Davos (Switzerland), March 2017.**

1.1. Постер, устно представяне и награда от организаторите на конференцията: **Malignant T cells inhibit anti-cancer and anti-infectious immunity in cutaneous T cell lymphoma. Desislava Ignatova**, Yun-Tsan Chang, Reinhard Dummer, Lars E. French, Antonio Cozzio, Wolfram Hoetzenecker, Emmanuella Guenova.

1.2. Постер, устно представяне и награда от спонсор на конференцията: **Ineffective antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with late stage cutaneous T cell lymphoma.** Y.T. Chang, M. Ziegler, **D. Ignatova**, P. Ivanov, R. Profanter, K. Kerl, R. Dummer, E. Contassot, L. French, P. Nestorov, S. Misailovic, M. Vechev, A. Cozzio, W. Hötzenecker, E. Guenova.

2. **HSM-2 Symposium Immunotolerance: Moving towards Clinical Application, Zurich (Switzerland), May 2016.**

2.1. Постер: **Expression of CD164 on malignant T cells in Sézary Syndrome**. **Desislava Ignatova**, Yun-Tsan Chang, Emmanuel Contassot, TarunMehra, Vanyo Mitev, Reinhard Dummer, Lars Einar French, Wolfram Hoetzenecker, Antonio Cozzio, Emmanuella Guenova.

2.2. Постер: **Ineffective antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with late stage cutaneous T cell lymphoma.** Y.T. Chang, M. T. Ziegler, **D. Ignatova**, K. Kerl, L.E. French, R. Dummer, W. Hötzenecker, A. Cozzio, E. Guenova.

3. **ADF (Arbeitschaft Dermatologische Forschung) Tagung, Ulm (Germany), March 2016.**

3.1. Постер: **Expression of CD164 on malignant T cells in Sézary Syndrome**. Desislava Ignatova, Yun-Tsan Chang, Emmanuel Contassot, TarunMehra, VanyoMitev, Reinhard Dummer, Lars Einar French, Wolfram Hoetzenecker, Antonio Cozzio, Emmanuella Guenova.

3.2. Постер: **Ineffective antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with late stage cutaneous T cell lymphoma.** Y.T. Chang, M. T. Ziegler, **D. Ignatova**, K. Kerl, L.E. French, R. Dummer, W. Hötzenecker, A. Cozzio, E. Guenova.

4. **15th Day of Clinical Research, Zurich(Switzerland), March 2016.**

4.1. Постер: **Expression of CD164 on malignant T cells in Sézary Syndrome. Desislava Ignatova**, Yun-Tsan Chang, Emmanuel Contassot, TarunMehra, VanyoMitev,

Reinhard Dummer, Lars Einar French, Wolfram Hoetzenecker, Antonio Cozzio, Emmanuella Guenova.

4.2. Постер: **Ineffective antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with late stage cutaneous T cell lymphoma.** Y.T. Chang, M. T. Ziegler, **D. Ignatova**, K. Kerl, L.E. French, R. Dummer, W. Hötzenecker, A. Cozzio, E. Guenova.

5. EORTC CLTF MEETING, Clinical trials and translational researches from an European multicentric perspective, Turin (Italy), September 2015.

5.1. Постер и устно представяне: **Expression of CD164 on malignant T cells in Sézary Syndrome. Desislava Ignatova**, Emmanuella Guenova, Yun-Tsan Chang, Emmanuel Contassot, TarunMehra, VanyoMitev, Reinhard Dummer, Lars Einar French, Wolfram Hoetzenecker, Antonio Cozzio.

5.2. Постер и устно представяне: **Resistance to antibody-dependent cellular cytotoxicity impairs antitumor activity of Rituximab in CD20+ Mycosis fungoides.** Y.T. Chang, M. T. Ziegler, **D. Ignatova**, LE. French, A. Cozzio, E. Guenova.

6. X**I International Congress of Medical Sciences, Sofia (Bulgaria), May 2012.** Постер: **E-sources of understanding JAK-STAT transduction mechanism. Ignatova D**, Dimitrova V, Isaeva A.

IX Награди

Стипендиант по програма Sciex-NMSCH в Катедра Дерматология, Университетска Болница Цюрих, 11 месеца, награденият проект е на тема " Биология на кожен Т клетъчен лимфом", изработен е с помощта на Доц. Емануела Генова, дм, дбн, и Акад. Проф. Ваньо Митев, дм, дбн.

WIRM Travel Grant Winner (11th World Immune Regulation Meeting, Davos, Switzerland), Март 2017. Постер, устно представяне и награда от организаторите на конференцията. Награденият абстракт е озаглавен: Malignant T cells inhibit anti-cancer and anti-infectious immunity in cutaneous T cell lymphoma.