
TEZĂ DE DOCTORAT

Actualități în diagnosticul, tratamentul și prognosticul leucemiei limfatice cronice

Doctorand: **Ioana Codruța Frinc**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Ljubomir Petrov**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	1
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Leucemia limfatică cronică	7
1.1. Introducere	7
1.1.1. Epidemiologie	7
1.1.2. Etiologie	7
1.2. Fiziopatologie	7
1.2.1. Factori intrinseci: aberațiile genetice	8
1.2.2. Factori intrinseci: dezechilibrul apoptotic	8
1.2.3. Factori extrinseci: contribuția micromediului	9
1.2.4. Proteinele din familia Bcl-2 și micromediul	10
1.3. Diagnosticul complex	11
1.3.1. Stadializarea leucemiei limfatice cronice	12
1.4. Evoluție	13
1.4.1. Sindromul Richter	13
1.4.2. Leucemia prolimfocitară	14
1.5. Tratamentul actual	14
1.6. Factori de prognostic	14
1.6.1. Aberație și mutațiile genetice	15
1.6.2. Statusul mutațional IgHV	15
1.6.3. Markeri serologici	15
1.6.4. Alți markeri	15
1.7. Rolul microARN	16
1.7.1. MicroARN-15a/16-1	17
1.7.2. MicroARN-34b/c și microARN-34a	17
1.7.3. MicroARN-181b și microARN-29	17
1.7.4. MicroARN-17/92	18
1.7.5. MicroARN-155	18
2. Principiile de acțiune ale chimioterapiei antineoplazice clasice	19
2.1. Introducere	19
2.2. Clasificarea chimioterapicelor în leucemia limfatică cronică	19
2.3. Mecanismele de acțiune ale chimioterapicelor anti-tumorale clasice	21
2.4. Tipuri de moarte celulară	22
2.4.1. Apoptoza	22
2.4.2. Autofagia	22
2.4.3. Catastrofa mitotică	23
2.4.4. Senescența	23
2.4.5. Necroza	23

3. Impactul nanotehnologiei asupra dezvoltării de noi sisteme de administrare a medicamentului	24
3.1. Introducere	24
3.2. Biodistribuția nanoparticulelor	24
3.3. Contribuția nanomedicinii în diagnosticul, imagistica și terapia malignităților	25
3.3.1. Nanoparticule de aur	25
3.4. Noi direcții de cercetare în nanomedicină	27
 CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	31
2. Studiul 1 – Aspecte clinice și terapeutice ale pacienților cu leucemie limfatică cronică	33
2.1. Introducere	33
2.2. Ipoteza de lucru/obiective	35
2.3. Material și metodă	35
2.4. Rezultate	39
2.5. Discuții	74
2.6. Concluzii	76
3. Studiul 2 – Aplicațiile nanofarmacologiei în leucemia limfatică cronică	79
3.1. Introducere	79
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	80
3.3. Material și metodă	80
3.4. Rezultate	84
3.5. Discuții	95
3.6. Concluzii	96
4. Studiul 3 – Studiul microARN-ului în sindromul Richter	97
4.1. Introducere	97
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	98
4.3. Material și metodă	98
4.4. Rezultate	101
4.5. Discuții	118
4.6. Concluzii	120
5. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	120
 REFERINȚE	121

CUVINTE CHEIE

Leucemia limfatică cronică, stadializare, factori de prognostic, CD20, Rituximab, imunoterapia, chimioterapie, nanoparticule de aur, nanofarmacologie, sindrom Richter, microARN, biomarkeri, mutația 17p, qRT-PCR, adenopatii, LDH, leucocite, citopenii, semne generale, culturi celulare, apoptoza, secvențiere, aplazie medulară.

INTRODUCERE

Leucemia limfatică cronică (LLC) este definită ca fiind o boală monoclonală caracterizată prin producerea și acumularea continuă de limfocite maligne de aspect matur cu funcția alterată, frecvent diagnosticată incidental, cu evoluție heterogenă. Până în prezent se cunosc numeroși factori de prognostic care să indice comportamentul mai agresiv, lipsa de răspuns la tratamentele convenționale sau durata scurtă a răspunsului la tratament, o parte neputând fi încă investigați în centrul nostru. Atitudinea terapeutică de inițiere și adaptare a tratamentului, ca atare, se bazează pe comportamentul clinic și hematologic în funcție de stadiu, toleranță și reacții adverse postmedicație, chimioterapia asociată secundar cu aplazia medulară reprezentând un important factor de risc, având în vedere caracterul bolii, vârsta pacienților și patologiiile asociate.

Obiectivul cercetărilor în domeniu privind abordarea clinica a LLC constă în evidențierea unor factori de prognostic cu o sensibilitate înaltă, o importanță deosebită revenind microARN-urilor care să servească ca și biomarkeri în diagnosticul precoce al bolii, a transformărilor în forme agresive, în prognosticul bolii și, ca urmare, în adaptarea deciziei terapeutice prin metode țintite de tratament.

CONTRIBUȚII PERSONALE

1. Ipoteza de lucru/obiective

Decizia terapeutică de inițiere/modificare a deciziei terapeutice se bazează pe evoluția clinică și hematologică, toleranța și reacțiile adverse postchimioterapie sau în urma complicațiilor legate de aplazia medulară.

Ținând cont de aceste aspecte, mi-am propus o analiză retrospectivă a cazurilor de LLC în vederea evidențierii unor particularități legate de aspectele clinico-evolutive și terapeutice, în special aspecte legate de tratamentul pacienților cu Ibrutinib, tratamentele țintite cu molecule mici fiind intens studiate la nivel mondial la acest moment. Pentru moment nu există standardizat un protocol terapeutic care să asigure o rată a remisiunii complete și susținute la pacienții aflați în stadiile avansate de boală care necesită tratament curativ. În a doua parte a tezei am încercat să demonstrez eficacitatea asocierii Rituximabului cu nanoparticulele de aur, care servesc ca și cărași pentru livarea țintită a medicamentului în celula malignă comparativ cu administrarea singulară a medicamentului, cu scopul creșterii eficacității tratamentului, în sensul obținerii unui răspuns cât mai complet la tratament, cu evitarea reacțiilor adverse posttratament. În partea a treia a tezei, am studiat prezența și importanța unor specii de microARN (miR-19B) în transformarea agresivă a leucemiei limfatice cronice în sindrom Richter, cu scopul obținerii unor biomarkeri care să servească ca și factori de prognostic pentru formele agresive de boală.

2. Metodologie

Lucrarea este structurată în 3 studii. Primul studiu a urmărit analiza retrospectivă a 92 de cazuri de LLC diagnosticate și tratate în Clinica Hematologie Cluj-Napoca, pe perioada 2000-2016, urmărind evidențierea unor corelații clinico-evolutive și legate de terapie, evidențierea unor particularități clinice sau a factorilor de prognostic cu valoare predictivă, analiza statistică utilizând testul T de analiză univariată a variabilelor cu distribuție normală, testul Mann-Whitney de analiză univariată a variabilelor cu distribuție

non-normală, testul H_i^2 privind diferențele de frecvență a variabilelor nominale, testul Kolmogorov-Smirnov pentru variabile continue, exprimate prin medie și deviație standard, sau mediana și percentile, coeficientul de corelație Spearman's rho pentru corelațiile între două variabile, pragul semnificativ statistic $<0,5$ și regresia logistică binară cu rol predictor independent al mai multor variabile, programul statistic Medcalc Statistical Software. Pentru efectuarea mutației 17p- s-a efectuat testul FISH. În studiul 2 cercetările clinice s-au realizat în perioada 2014 – 2016 în cadrul Centrului de Cercetare de Genomică Funcțională, Biomedicină și Medicină translațională a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca, în colaborare cu Centrul de Cercetare de Biofizică, Fizică Atomică, Moleculară și Optică a Universității Babes-Bolyai din Cluj-Napoca pe culturi celulare. Etapele au urmat sinteza nanostructurilor conjugate cu Rituximab și caracterizarea lor optică, dezghețarea liniilor celulare de LLC HS 505.T și CLL-AAT care au fost achiziționate de la ATCC (USA), respectiv DMSZ (Germania), ulterior efectuând teste de proliferare celulară, cu evidentierea rezultatelor prin testul MTT, microscopia în câmp întunecat și microscopia de transmisie, western blotting și microscopie confocală, analiza statistică a fost efectuată utilizând softwareul R (R Development core team, USA) și GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software INC, CA, USA). Datele obținute au fost examinate pentru distribuție normală cu testul Shapiro-Wilk, aceasta fiind gaussiană. Astfel datele au fost analizate utilizând un test parametric (Two-Way ANOVA cu Tukey post-test). Evaluarea apoptozei s-a făcut prin citometria de flux, 5×10^5 celule leucemice au fost tratate fie cu GNP-Rituximab, Rituximab, GNP sau netratate. În studiul 3, determinarea expresiei profilului mRNA și microARN, s-a efectuat pe blocurile de biopsie ganglionară stocate în arhiva Institutului Oncologic „Ion Chiricuță”, Departamentul de Anatomie Patologică, a doi pacienți, cărora li s-a efectuat biopsie ganglionară pentru confirmarea LLC și a sindromului Richter, din perioada 2002-2015, pentru determinarea expresiei profilului mRNA am folosit chip Oligo 24k 3D-gene human, toate datele expresiei mRNA analizate folosind cipurile ADN au fost normalizate folosind o metodă globală de normalizare aplicabile unui grup. Datele au mai fost analizate ulterior folosind o matrice de instrumente- BRB (Biometric Research Branch). Expresia miR a fost confirmată prin qRT-PCR folosind testele TaqMan (Life Technologies).

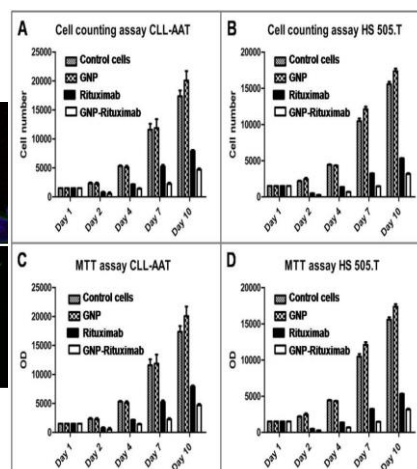
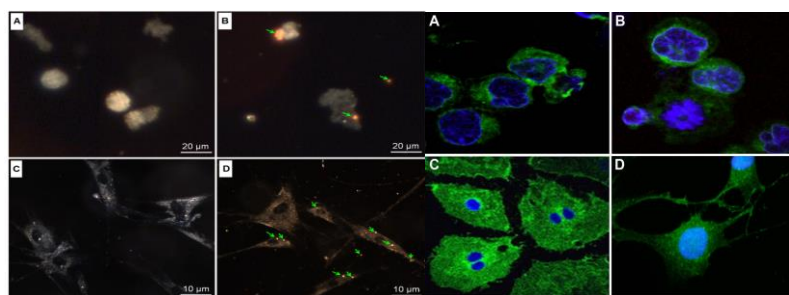
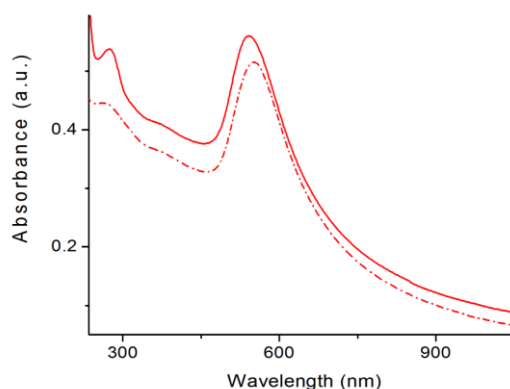
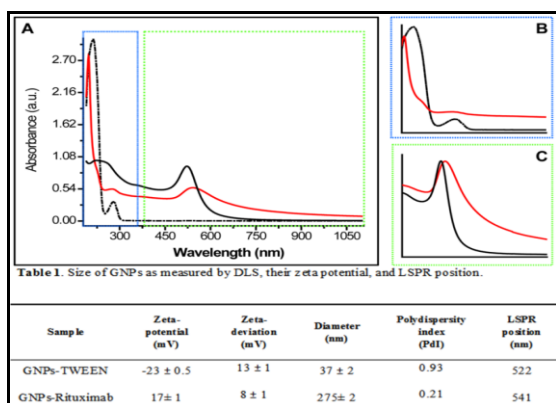
3. Rezultate și concluzii

Studiu 1- Aspecte clinice și terapeutice ale pacienților cu leucemie limfatică cronică

1. Lotul de pacienți este reprezentativ, cu predominanța sexului masculin, cu vârsta medie de 63 ani.
2. Majoritatea pacienților s-au prezentat în stadii avansate de boală.
3. Integrarea imunofenotipării limfocitelor prin citometrie de flux a adus un beneficiu și progres în diagnosticul LLC.
4. Integrarea statusului mutațional 17p și 11q a îmbunătățit strategia terapeutică la pacienții cu LLC.
5. În lotul de pacienți studiați, factorii de prognostic negativ CD38 și ZAP 70 s-au corelat cu forme agresive de boală.
6. Biopsia osteomedulară nu se impune, dar aspectul infiltrativ difuz este corelat cu stadii avansate de boală și prezența semnelor generale.
7. Prezența citopeniilor la diagnostic s-a corelat cu stadii avansate de boală și semne generale.
8. Majoritatea pacienților au necesitat mai multe linii terapeutice (>2).
9. Rata de răspuns la imunochimioterapie RFC a fost satisfăcătoare 30%.
10. Rata de răspuns la ibrutinib a fost satisfăcătoare având în vedere numărul anterior de linii terapeutice și stadiile avansate de boală.

11. Se impune determinarea la diagnostic a statusului mutațional IgHV și a altor factori de prognostic negativ.

Studiu 2- Aplicațiile nanofarmacologiei în leucemia limfatică cronică



În capitolul de față, raportăm design-ul unui nou „nano-căruș”, transportul transmembranar eficient al acestuia și evaluarea in vitro a potențialului său terapeutic împotriva a celor două linii celulare de LLC: CLL-AAT și HS-505. Formarea cu succes nano-conjugatului a fost confirmată prin spectroscopie UV-Vis, împrăștierea dinamică a luminii și potențialul zeta, internalizarea nano-cărușului a fost demonstrată prin microscopie de transmisie și microscopie în câmp întunecat. Efectul terapeutic al noului compus a fost investigat și demonstrat prin numărarea celulară și testul de proliferare MTT. Analize „state-of-the-art” pentru internalizare, biologie celulară, genomică și proteomică au arătat că Rituximabul conjugat cu nanoparticule de aur are efecte superioare comparativ cu Rituximabul administrat ca și „single agent”. Rezultatele obținute sunt valoroase și promițătoare, deschizând drumul pentru o viitoare validare a acestor structuri ca și modalitate de livrare a substanței active în tratamentul leucemiei limfocitare cronică în vederea tratamentului țintit cu scopul de a evita complicațiile legate de tratamentul clasic, având în vedere heterogenitatea bolii și faptul că evoluția bolii este relativ lentă, dar cu șanse uneori scăzute de vindecare, grevată de complicații infecțioase amenințătoare de viață secundar aplaziei medulare asociată unui tratament agresiv, cu precădere în stadiile avansate de boală.

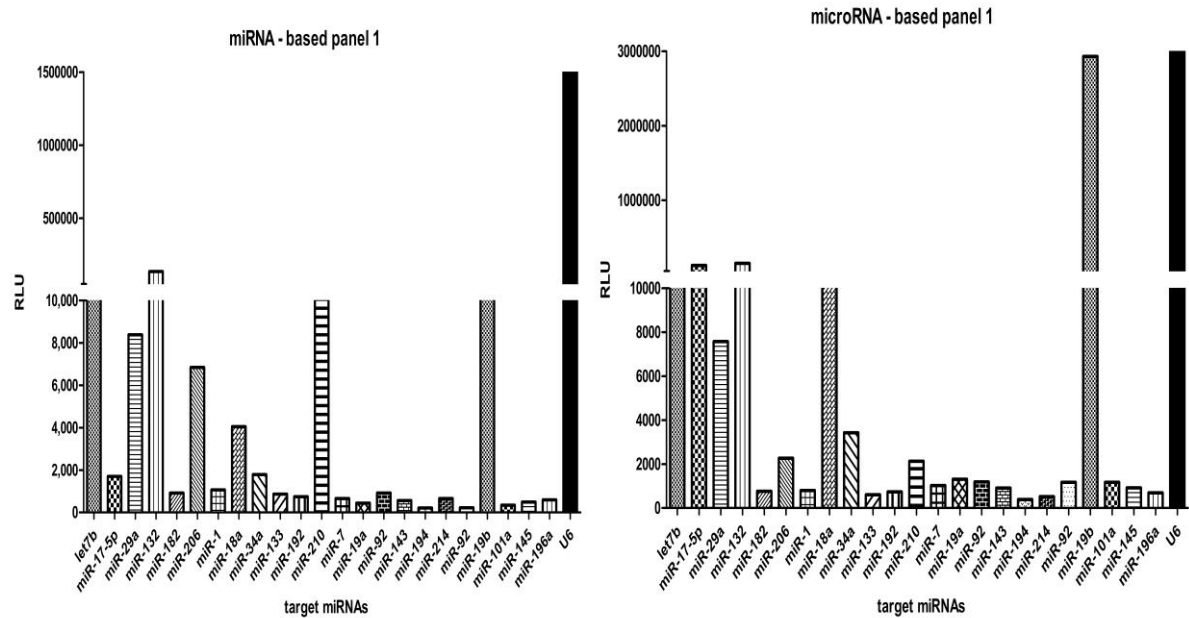
3.Studiul micro-ARNului în leucemia limfatică cronică

Tabel XXX. Analiza mutațională comparativă a probelelor de LLC/sindrom Richter

Locusul mutației	Ref	Tipul mutației	Variant free	Gena	Localizarea	1 LLC	2 R
Chr17:7578943	GG	MNV, SNV	1	TP53	Intronică	AG/GT	AC/GT
Chr17:7578949	G	SNV	1	TP53	Intronică	G/A	G/A

Utilizând plăcile de screening pentru microARN, am obținut 274 de potențiali biomarkeri, microARN-19b este probabil cel mai eficient, fiind cel mai puțin „down-regulat”, față de controlul U6.

U6 reprezintă controlul studiului nostru, în leucemia limfatică cronică, toate microARN-urile fiind "down-regulate". Acest rezultat a fost replicat și în studiul nostru, toate potențialele "ținte" fiind "down-regulate". Însă, dintre toate miRs-urile analizate, prin citirea rezultatelor la 0, ulterior 20 minute, miR-19b are nivelul de amplificare cel mai ridicat, cu tendința la amplificare cu preponderență la 20 minute, după cum se vede în imaginile de mai jos:



Pentru a valida complet din punct de vedere funcțional calea moleculară de semnalizare, datele de genetică moleculară au fost completate de informații privind sinteza proteinelor, conform dogmei centrale a biologiei moleculare. Astfel, a fost investigată prin Western blotting sinteza proteinei phospho S15 (proteina codificată de gena p53) și a proteinei Ki67, după cum este prezentat mai jos:

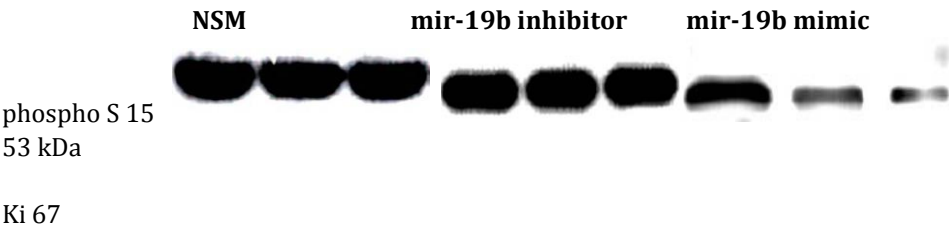




Fig.63. Validarea funcțională prin Western blotting a liniilor celulare de LLC: HS 505.T, CLL-AAT, MEC1

Putem afirma cu certitudine că speciile de ARN non-codant au rol important în biologia tumorală a limfoproliferărilor cu celule B mature. Deoarece microARN-ul joacă un rol important în progresia tumorală, unele specii de ARN non-codant pot fi utilizate ca și biomarkeri pentru prezicerea evoluției clonale a bolii. În prezentul studiu, s-a demonstrat că microARN-ul este important în evoluția leucemiei limfatice cronice în sindromul Richter. Grupul nostru propune utilizarea miR-19b ca și biomarker pentru evoluția cazurilor de leucemie limfatică cronică agresivă în sindrom Richter. Calea moleculară a fost analizată utilizând secvențierea de noua generație (NGS), care a demonstrat „up-regularea„ genelor p53 și a Ki67 în evoluția clonală a LLC către limfom, concluzie confirmată de datele deja publicate utilizând imunohistochimia.

PhD THESIS SUMMARY

UPDATES IN DIAGNOSIS, TREATMENT AND PROGNOSIS OF CHRONIC LYMPHATIC LEUKEMIA

PhD Candidate: **Ioana Codruța Frinc**

PhD Supervisor: **Prof. Dr. Ljubomir Petrov**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	1
CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE	
1. Chronic lymphocytic leukemia	7
1.1. Introduction	7
1.1.1. Epidemiology	7
1.1.2. Etiology	7
1.2. Pathophysiology	7
1.2.1. Intrinsic factors: genetic aberrations	8
1.2.2. Intrinsic factors: apoptotic imbalance	8
1.2.3. Extrinsic factors: microenvironment contribution	9
1.2.4. Bcl-2 family proteins and microenvironment	10
1.3. Complex diagnosis	11
1.3.1. Chronic lymphocytic leukemia staging	12
1.4. Evolution	13
1.4.1. Richter syndrome	13
1.4.2. Prolymphocytic leukemia	14
1.5. Current treatment	14
1.6. Prognosis factors	14
1.6.1. Aberrations and genes mutations	15
1.6.2. IgHV mutational status	15
1.6.3. Serological markers	15
1.6.4. Other markers	15
1.7. The role of microARN	16
1.7.1. MicroRNA-15a/16-1	17
1.7.2. MicroRNA-34b/c and microRNA-34a	17
1.7.3. MicroRNA-181b and microRNA-29	17
1.7.4. MicroRNA-17/92	18
1.7.5. MicroRNA-155	18
2. Principles of action of classic anticancer chemotherapy	19
2.1. Introduction	19
2.2. Classification of chemotherapeutic agents in chronic lymphocytic leukemia	19
2.3. The action mechanism of classic anti-tumor chemotherapy	21
2.4. Types of cell death	22
2.4.1. Apoptosis	22
2.4.2. Autophagy	22
2.4.3. Mitotic catastrophe	23
2.4.4. Senescence	23
2.4.5. Necrosis	23

3. The impact of nanotechnology on the development of new drug delivery systems	24
3.1. Introduction	24
3.2. Biodistribution of nanoparticles	24
3.3. Nanomedicine contribution in diagnosis, imaging and therapy of malignancies	25
3.3.1. Gold nanoparticles	25
3.4. New directions for research in nanomedicine	27
 PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Research hypothesis/objectives	31
2. Study 1 – Clinical aspects and treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia	33
2.1. Introduction	33
2.2. Research hypothesis/objectives	35
2.3. Means and method	35
2.4. Results	39
2.5. Discussions	74
2.6. Conclusions	76
3. Studiul 2 – The applications of nanopharmacology in chronic lymphocytic leukemia	79
3.1. Introduction	79
3.2. Research hypothesis/objectives	80
3.3. Means and method	80
3.4. Results	84
3.5. Discussions	95
3.6. Conclusions	96
4. Studiul 3 – The study of the microRNA Richter's syndrome	97
4.1. Introduction	97
4.2. Research hypothesis/objectives	98
4.3. Means and method	98
4.4. Results	101
4.5. Discussions	118
4.6. Conclusions	120
5. Originality and innovative contributions of the thesis	120
 REFERENCES	121

KEY WORDS

Chronic lymphocytic leukemia, stadialisation, prognosis factors, CD20, Rituximab, imunotherapy, chemotherapy, gold nanoparticles, nanopharmacology, Richter syndrome, microRNA, biomarkers, 17p mutation, qRT-PCR, lymphadenopathy, LDH, leucocytes, citopenia, general signs, cell cultures, apoptosis, sequencing, aplastic anemia.

INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is defined as a disease characterized by monoclonal production and continued accumulation of malignant lymphocytes of mature appearance with altered function commonly diagnosed incidentally evolving heterogeneous. Until now many known prognostic factors indicating more aggressive behavior, lack of response to conventional therapy or short duration of treatment response, some still can not be investigated in our center. Therapeutic approach for the initiation and adjustment of therapy, as such, are based on clinical behavior and hematologic by stage, tolerance and postmedication side effects, combination chemotherapy secondary aplastic anemia represents an important risk factor, given the disease, age patients and pathologies associated.

The objective of research in the field on the clinical management of CLL is to highlight some prognostic factors with high sensitivity, a special importance being given microRNA sites that serve as biomarkers in early diagnosis of disease, changes in aggressive forms of the disease prognosis and as a result, the adaptation of the decision targeted therapeutic methods of treatment.

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Research hypothesis/objectives

The decision to initiate therapeutic / modification therapeutic decision is based on the clinical and haematological tolerance and side effects after chemotherapy or from complications related to bone marrow aplasia.

Considering these aspects, I proposed a retrospective analysis of cases of CLL to highlight specific features related aspects of clinical course and treatment, particularly issues related to the treatment of patients with Ibrutinib, treatment targeted small molecule being intensively studied worldwide at the moment. There are currently no standardized treatment protocol to ensure a complete and sustained remission rate in patients in advanced stages of disease. In the second part of the thesis I tried to demonstrate the effectiveness of adding rituximab with gold nanoparticles, which serve as carriers for targeted delivery drug into a cancer cell compared to the single administration of the drug, in order to increase the efficacy of treatment in order to obtain an answer as more fully to the treatment, post-treatment side effects avoidance. In the third part of the thesis, we studied the presence and importance of species of microRNA (miR-19b) in turning aggressive chronic lymphocytic leukemia in Richter syndrome, in order to obtain biomarkers that serve as prognostic factors for aggressive forms of the disease .

2. Means and method

The paper is structured in 3 studies. The first study looked at retrospective analysis of 92 cases of CLL diagnosed and treated in the Hematology Hospital of Cluj-Napoca, during 2000-2016, aiming at highlighting correlations clinical course and related therapy, highlighting specific features of clinical or prognostic factors with predictive, statistical analysis using T-test analysis univariate variables with normal distribution, the

Mann-Whitney analysis univariate variables with distribution non-normal, test H_i^2 differences frequency nominal variables, Kolmogorov-Smirnov test for continuous variables expressed as mean and standard deviation or median and percentile, Spearman's rho correlation coefficient for correlations between two variables, statistically significant level <0.5 and binary logistic regression with independent predictor role of several variables and statistical program MedcalcStatistical Software. For carrying out 17 p mutation, FISH assay was performed. In study two clinical research were conducted during 2014-2016 in the Research Center for Functional Genomics, Biomedical and Health Translational Medicine of "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy in Cluj-Napoca, in collaboration with the Research Center of Biophysics, Physics, Molecular and Optical of the Babes-Bolyai University in Cluj-Napoca, in cell cultures. The steps following the synthesis of nanostructures conjugated Rituximab and optical characterization defrosting of CLL cell line HS-AAT 505.T and CLL which were purchased from ATCC (USA) or DMSZ (Germany), after performing cell proliferation assays, highlighting outcomes by MTT assay, dark-field microscopy and transmission microscopy, western blotting and confocal microscopy, statistical analysis was performed using software R (R Development core team, USA) and GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, USA). Data were examined for normal distribution with the Shapiro-Wilk test, which is Gaussian.

Thus, the data were analyzed using a parametric test (Two-Way ANOVA with Tukey's post-test). Assessment of apoptosis was done by flow cytometry, 5×10^5 cells were treated with either leukemia GNP-rituximab, rituximab, or untreated GNP. In study 3, the determination of the expression profile of mRNA and microRNA was performed on blocks biopsy node stored in archive of the Cancer Institute "Ion Chiricuță", Department of Pathology, two patients, who have undergone lymph node biopsy for confirmation LLC and Richter syndrome from the period 2002-2015. To determine mRNA expression profile we used Oligo chip 24k 3D human genes, all data analyzed mRNA expression using DNA chips were normalized using a global normalization method applicable to a group. The data were then analyzed using an array of tools the BRB (Biometric Research Branch). Expression was confirmed by qRT miR-PCR using TaqMan assays (Life Technologies)

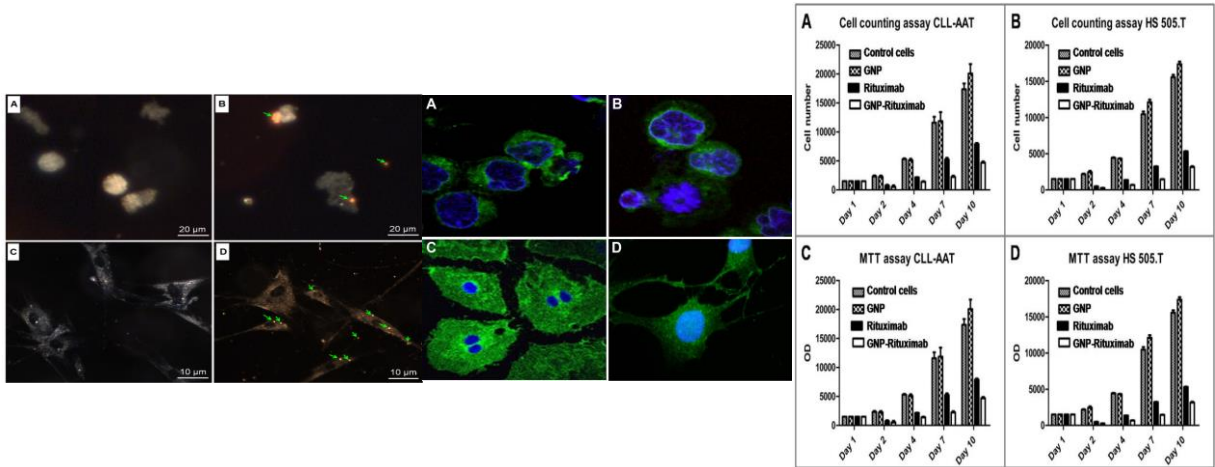
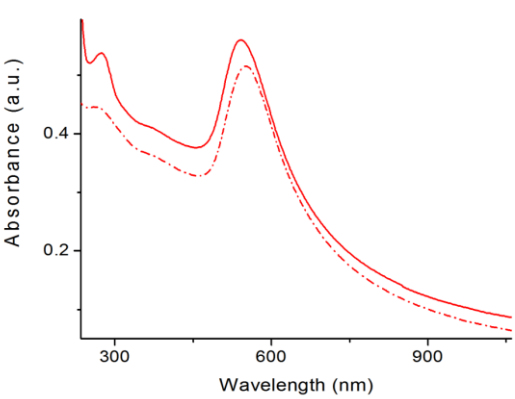
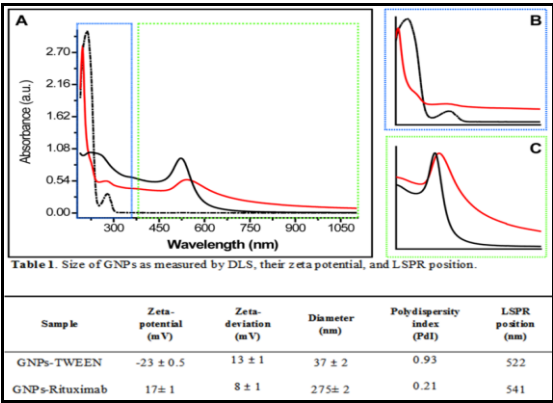
3.Results and conclusions

Study 1- Clinical aspects and treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia

- 1 The group of patients is representative with predominance of males, mean age 63 years.
- 2 Most of the patients were presented in advanced stages of disease
- 3 Integration immunophenotyping of lymphocytes by flow cytometry and yielded a breakthrough in the diagnosis LLC.
- 4 Integration 17p and 11q mutation status has improved therapeutic strategy in CLL patients.
- 5 In the group of studied patients, the adverse prognostic factors CD38 and ZAP 70 were correlated with aggressive forms of the disease.
- 6 The biopsy of bone marrow is not necessary, but diffuse infiltrative appearance correlates with advanced disease and the presence of general signs.
- 7 The presence of cytopenias at diagnosis is correlated with an advanced disease and general signs.
- 8 Most of the patients required several therapeutic lines (> 2).
- 9 The response rate was satisfactory with RFC immunochemotherapy 30%.

- 10 The response rate to ibrutinib was satisfactory in the previous number of therapeutic lines and advanced stages of the disease.
- 11 It is necessary to determine the mutation status at diagnosis IgHV and other adverse prognostic factors

Studiy 2- The applications of nanopharmacology in chronic lymphocytic leukemia



In this chapter, we report the design of a new "nano-carrier" effectively its transmembrane transport and in vitro evaluation of its potential therapeutic against the two cell lines LLC: CLL-AAT and HS-505. Successfully training nano-conjugate fot confirmed by UV-Vis spectroscopy, dynamic light scattering and zeta potential internalisation nano-carrier was demonstrated by transmission microscopy and dark field microscopy. The therapeutic effect of the new compound has been investigated and shown by cell counting and MTT proliferation assay. Analyses "state-of-the-art" for internalizing cell biology, genomics and proteomics have shown that gold nanoparticles conjugated Rituximab has superior effects compared with rituximab given as "single agent". The results obtained are valuable and promising, paving the way for future validation of these structures as a means of delivery of the active substance in the treatment of chronic lymphocytic leukemia in order to target treatment in order to prevent complications related to the classic treatment, having regard to the heterogeneity of the disease, and that disease progression is relatively slow, but sometimes low chance of cure, burdened by life-threatening infectious complications secondary bone marrow aplasia associated with aggressive treatment, especially in advanced stages of disease.

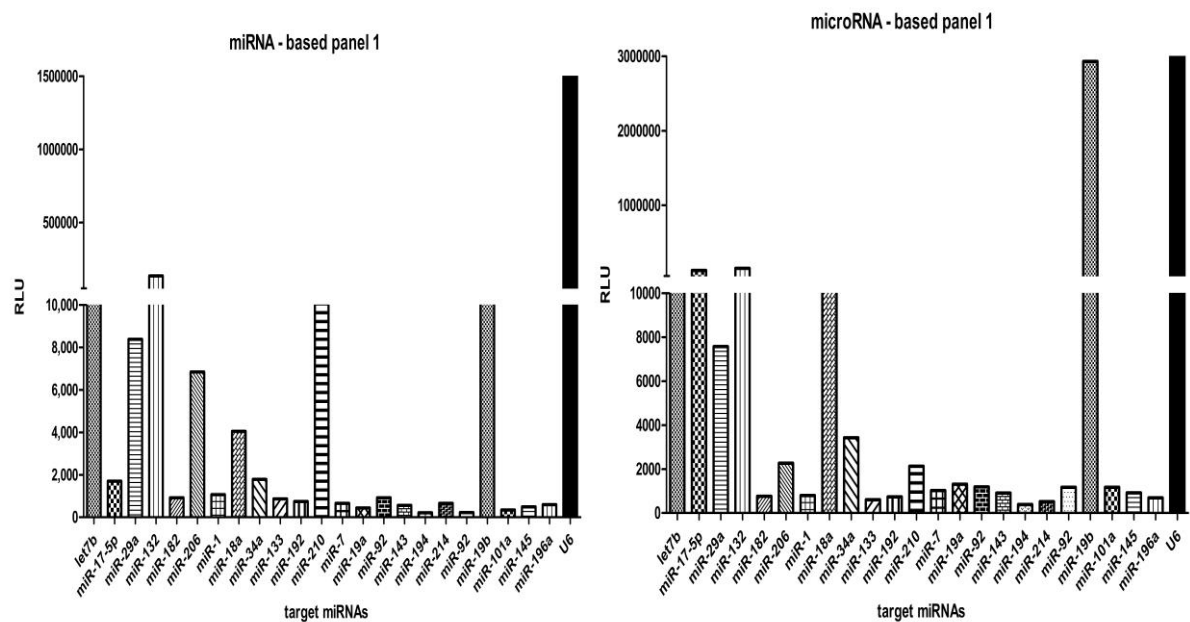
Studiul 3- The study of the microRNA Richter’s syndrome

Tabel XXX. Mutational analysis of comparative tissues LLC/ Richter syndrome

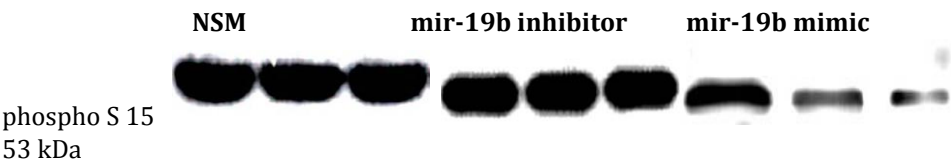
Mutation locus	Ref	Tyoe of mutation	Variant free	Gene	Localisation	1 LLC	2 R
Chr17:7578943	GG	MNV, SNV	1	TP53	Intronic	AG/GT	AC/GT
Chr17:7578949	G	SNV	1	TP53	Intronic	G/A	G/A

Using microRNA screening plates, we obtained 274 potential biomarkers, microRNAs 19b is probably the most efficient one less „down-regulated” to control U6.

U6 represent the control in our study, in chronic lymphocytic leukemia, all microRNA sites are "down-regulated". This finding was replicated in our study, all potential "targets" being "down-regulated". But, of all miRs sites analyzed by reading the results 0, after 20 minutes, miR-19b has highest amplified, with a tendency to gain mainly on 20 minutes, as shown in the images below:



To validate the functionally complete molecular signaling pathway, molecular genetic data were supplemented by information on protein synthesis, according to the central dogma of molecular biology. Thus, it was investigated by Western blotting of protein synthesis phospho S15 (the protein encoded by the gene p53) and Ki-67 protein, as shown below:



Ki 67

359 kDa

β -actin

12 Da



Fig.63. Western blotting functional validation of the LLC cell lines: HS 505.T, CLL-AAT, MEC1

We can say with certainty that non-coding RNA species play an important role in tumor biology of mature B-cell lymphoproliferative diseases. Since the microRNAs playing an important role in tumor progression, some species of non-coding RNA can be used as biomarkers for predicting the clonal evolution of the disease. In this study, it was shown that microRNAs is important in the development of chronic lymphocytic leukemia in Richter's syndrome. Our group proposes the use of miR-19b as a biomarker for the development of cases of chronic lymphocytic leukemia aggressive Richter syndrome. Molecular way was analyzed using next generation sequencing (NGS), which showed the "up regulation", of the p53 and Ki67 genes in clonal evolution to lymphoma LLC, a conclusion confirmed by immunohistochemistry using data already published