

# ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА С КОЛИЧЕСТВОМ БЛАСТНЫХ КЛЕТОК ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ

Смирнова О.В., Савченко А.А., Манчук В.Т.

Учреждение РАМН НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск

**Резюме.** Целью исследования явилось изучение особенностей иммунного статуса у больных ОНЛЛ и ОЛЛ и выявления взаимосвязей между особенностями иммунного статуса по стадиям и количества бластных клеток с использованием нейросетевого моделирования. Установлено, у больных острыми лейкозами снижение реактивности иммунной системы. На всех стадиях ОЛЛ у больных развивается Т-клеточный иммунодефицит. Снижение Т-лимфоцитов и уменьшение величины соотношения  $CD4^+$  к  $CD8^+$  способствует появлению атаки ОЛЛ. Особенностью рецидива ОЛЛ является увеличение содержания НК-клеток. На стадии атаки и ремиссии ОНЛЛ развивается Т-клеточный иммунодефицит, на стадии рецидива – комбинированный иммунодефицит с поражением Т- и В- систем иммунитета. Особенностью ОНЛЛ является истощение содержания НК-клеток, которое, вероятно, и способствует прогрессированию заболевания и развитию рецидива. С помощью нейросетевого предиктора выявлена информативность параметров иммунного статуса при определении количества бластных клеток в костном мозге. Установлено, что в каждой группе больных людей обнаруживается характерная для них гистограмма информативности. Проведен вычислительный эксперимент, характеризующий специфичность взаимосвязей показателей иммунного статуса в нейропредикторной модели при ОЛЛ и ОНЛЛ.

*Ключевые слова:* нейросетевая предикция, бласты, острый лейкоз

*Smirnova O.V., Savchenko A.A., Manchouk V.T.*

## FEATURES OF INTERRELATIONS BETWEEN IMMUNE STATUS INDICATORS AND AMOUNTS OF BLAST CELLS IN ACUTE LEUKEMIA

**Abstract.** The purpose of study was to evaluate some characteristics of immune state in the patients with acute non-differentiated leukemia (ANLL) and acute lymphoblastic leukemia (ALL), and to detect interrelations between the features of immune state and their dependencies on disease stage and quantities of blast cells, using a neuronet modeling approach. A decrease in immune system reactivity was revealed in acute leukemia patients. At any ALL stage, a T-cell immunodeficiency is registered. A decrease of T lymphocyte amounts and reduction of  $CD4^+$ : $CD8^+$  ratio are associated with occurrence of ALL relapse. Increased contents of NK cells are a feature of ALL recurrence. T cell deficiency emerges during ANLL relapse and remission. Meanwhile, a combined immunodeficiency develops upon relapse of the disease, affecting both T and B systems of immune response. Exhaustion of NK cell contents is a characteristic feature of ANLL, thus potentially promoting progression and relapse of the disease. By means of a neuronet predictor, a significance of information for certain immune state parameters was assessed, by determining amounts of blast cells in bone marrow. It was found that a specific histogram of informativity is revealed for each group of the patients. A computer-based experiment was

### **Адрес для переписки:**

Смирнова Ольга Валентиновна,  
НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН  
660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3Г.  
Тел./факс: (391) 228-06-83, 202-45-01.  
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

performed which proves the specificity of interrelations between the immune state indices in a neuroprediction model for ALL and ANLL. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 1, pp 49-54)

*Keywords:* neuronet prediction, blast cells, acute leukemia

## Введение

В последние годы отмечается значительный рост распространенности острых лейкозов (ОЛ) среди других онкологических заболеваний крови [2, 4]. Наибольшую актуальность вызывают изучение больных острым нелимфобластным (ОНЛЛ) и острым лимфобластным лейкозами (ОЛЛ), т.к. в последнее время количество случаев этих заболеваний возросло [1, 3]. Многочисленные проведенные исследования посвящены изучению клинических и лечебных аспектов ведения этих больных [2, 3, 5]. Однако остаются малоизученными многие клинические и патогенетические аспекты данной патологии. В частности, недостаточно исследованы иммунологические механизмы, способствующие возникновению и прогрессированию гемобластозов. Все это определяет чрезвычайную актуальность дальнейшего изучения патогенеза ОНЛЛ и ОЛЛ с позиций механизмов иммунореактивности. **Целью настоящего исследования** явилось изучение особенностей иммунного статуса у больных ОНЛЛ и ОЛЛ и выявление взаимосвязей между особенностями иммунного статуса по стадиям и количества бластных клеток с использованием нейросетевого моделирования.

## Материалы и методы

Обследовано 122 больных ОЛ. Из них у 68 диагностировался ОНЛЛ (I группа изучения) и у 54 больных – ОЛЛ (II группа изучения). Для верификации диагноза всем больным при поступлении проводилась стерильная пункция с количественным и процентным определением пулов клеток и цитохимическим определением ферментов. Из 68 больных ОНЛЛ у 24 диагностировалась первая атака, 34 больных были в стадии ремиссии после проведенного лечения и у 10 больных наблюдался повторный рецидив. Из 54 больных ОЛЛ у 24 диагностировалась первая атака, у 26 больных наблюдалась ремиссия после проведенного лечения, и у 6 больных регистрировался повторный рецидив. В качестве контроля обследовано 106 здоровых лиц (III группа изучения) аналогичного возраста.

Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, HLA-DR (ОО «Сорбент», Москва). Дополнительно вычислялись соотношения CD4<sup>+</sup> к CD8<sup>+</sup>, лейко-Т-клеточный (Лейкоциты/CD3<sup>+</sup>), лейко-В-клеточный ин-

декс (Лейкоциты/CD19<sup>+</sup>) и индекс активации Т-лимфоцитов (HLA-DR<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>). Концентрация иммуноглобулинов класса А, М и G в сыворотке определяли иммуноферментным методом. Оценка клеточного и гуморального иммунитета проводилась при поступлении больных до начала патогенетического лечения. Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C<sub>25</sub> и C<sub>75</sub>). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., 2001). Для решения задач системного анализа использовали нейросетевой классификатор, который представляет собой компьютерную программу (Panalyzer 2004), способную к самообучению и принятию на его основе решений. Нейросеть представляет собой число нейронов (максимальное число которых соответствует числу введенных показателей + 2) и матрицей синапсов (связи между нейронами). Входные данные подаются на входные нейроны. Выходные сигналы снимаются с выходных нейронов. Обучение нейронной сети проводится методом обратного распространения ошибки. Входными данными при обучении программы является обучающая выборка, состоящая из отдельных примеров, каждый из которых представляет собой определенный набор исследуемых параметров одного человека. Все примеры обучающей выборки нейросетевого классификатора разбиты на 2, в отношении которых и решается задача классификации. Класс – это выбор одного из нескольких возможных вариантов ответа.

Каждому примеру в обучающей выборке для нейросетевого предиктора соответствует заранее известное действительное число (например, один из исследуемых параметров), в отношении которого и проводится обучение. Следовательно, предиктор работает как система, самостоятельно находящая функцию зависимости ответа от нескольких обучающих параметров  $Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n)$ . Степень обученности нейросети характеризуется значением функции оценки, которое в процессе обучения стремится к минимуму. В процессе обучения программа исключает из обучающей выборки примеры, которые не вписываются в заданную классификационную или предикторную модель, что позволяет создавать новый, уточненный вариант модели. По окончании обучения программа вы-

числяет информативность обучающих параметров. Для этого включаются несколько циклов обучения нейронной сети с внесением в матрицу синапсов случайного вклада после прохождения каждого цикла.

Кроме того, нейросетевой классификатор способен осуществлять функцию минимизации введенных параметров, заключающуюся в исключении показателя из обучающей выборки после полного обучения, который при подсчете значимости получил минимальную оценку информативности. После этого программа продолжает обучение при уменьшенном наборе показателей. Так повторяется до тех пор, пока сеть не перестает обучаться. В результате формируется оптимальный набор параметров, достаточный для проведения задачи классификации по заданным примерам. Дополнительным свойством нейросетевого классификатора является подсчет степени уверенности, с которой нейросеть обучилась распознавать примеры по соответствующему классу. Степень уверенности подсчитывается для каждого примера отдельно и для всей выборки в целом.

## Результаты и обсуждение

При исследовании состояния иммунного статуса у больных ОНЛЛ и ОЛЛ обнаружены как общие изменения величин исследуемых параметров иммунитета (у обеих групп больных), так и характерные только для каждого вида ОЛ. Так, при исследовании состояния популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови обнаружено, что и у больных ОЛЛ, и у больных ОНЛЛ снижается процентное содержание CD3<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> лимфоцитов (табл. 1). Однако, у больных ОНЛЛ снижение относительного количества CD4<sup>+</sup> клеток статистически более выражено, чем у больных ОЛЛ. Только у больных ОНЛЛ снижается абсолютный уровень лимфоцитов крови как относительно контрольного диапазона, так и показателей больных ОЛЛ. Аналогичным образом изменяются уровни абсолютного содержания CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> и HLA-DR<sup>+</sup> лимфоцитов. У больных ОНЛЛ только относительно контрольного диапазона снижаются уровни процентного содержания CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> и CD19<sup>+</sup> клеток.

При исследовании величин коэффициентов, характеризующих состояние клеточного звена иммунной системы, обнаружено, что независимо от вида ОЛ у больных людей повышается величина лейко-Т-клеточного. Кроме того, только

у больных ОЛЛ увеличиваются величины лейко-В-клеточного соотношения и коэффициента активации Т-лимфоцитов. Состояние гуморального звена иммунной системы слабее изменяется при острых лейкозах. Обнаружено, что у больных независимо от вида ОЛ снижается концентрация IgA в сыворотке крови.

С помощью нейросетевого предиктора исследована информативность показателей иммунного статуса при ОЛЛ и ОНЛЛ в модели определения содержания бластных клеток в костном мозге. У больных ОНЛЛ количество бластов в костном мозге варьировало при первичной атаке от 25 до 97% (средние показатели бластов составили  $95,0 \pm 2,1\%$ ). При ремиссии у больных ОНЛЛ в стерильном пунктате количество бластов определялось от 0,8 до 4,5% (средние показатели бластов составили  $2,7 \pm 1,8\%$ ). При повторном рецидиве у больных ОНЛЛ количество костномозговых бластных клеток регистрировалось от 26 до 86%. У больных ОЛЛ число бластных клеток в костном мозге при первичной атаке выявлялось в диапазоне от 25 до 96% (средние показатели бластов  $93,0 \pm 3,2\%$ ). При ремиссии ОЛЛ количество бластов регистрировалось в диапазоне от 0,5 до 4,1% (среднее количество —  $2,5 \pm 1,5\%$ ). При повторном рецидиве у больных в костном мозге наблюдалось от 26 до 89% бластов.

Иммунная система комплексно реагирует на нарушения гомеостаза в организме, изменяется реактивность клеточного и гуморального звеньев иммунитета. В связи с этим необходимо использовать системные методы статистического анализа, в качестве которого мы применяли нейросетевое моделирование. С помощью данного метода была исследована взаимосвязь между системой исследуемых показателей иммунного статуса и уровнем содержания бластных клеток в костном мозге в зависимости от стадии заболевания. Установлено, что у больных на стадии первичной атаки наиболее значимыми показателями нейропредикторной модели являются уровень процентного содержания HLA-DR<sup>+</sup> лимфоцитов, содержание IgG в крови, лейко-В-клеточный коэффициент, относительное количество лимфоцитов в крови. При ремиссии заболевания наиболее информативными показателями являются показатель процентного содержания CD19<sup>+</sup> лимфоцитов, содержание IgM в крови, уровень относительного количества CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. При рецидиве заболевания наиболее информативными показателями являются индекс активации Т-лимфоцитов, соотношение CD4<sup>+</sup> к CD8<sup>+</sup>, уровень относительного содержания HLA-DR<sup>+</sup>

ТАБЛИЦА 1. СОСТОЯНИЕ ПОПУЛЯЦИОННОГО И СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ И ОСТРЫМ НЕ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗАМИ (МЕ, С<sub>25</sub>-С<sub>75</sub>)

Показатели	Контроль n = 106 1		Лимфобластный n = 54 2		Нелимфобластный n = 68 3	
	Me	C <sub>25</sub> -C <sub>75</sub>	Me	C <sub>25</sub> -C <sub>75</sub>	Me	C <sub>25</sub> -C <sub>75</sub>
Лейкоциты, (10 <sup>9</sup> /л)	5,73	4,80-5,75	6,00	4,25-7,50	4,70	2,50-7,00
			p <sub>1</sub> < 0,001		p <sub>2</sub> < 0,01	
Лимфоциты, (%)	38,0	31,0-45,0	31,0	21,0-50,0	35,0	24,0-53,0
Лимфоциты, (10 <sup>9</sup> /л)	2,16	1,61-2,81	2,18	1,35-3,41	1,63	0,88-2,52
					p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>2</sub> < 0,01	
CD3 <sup>+</sup> , (%)	67,0	60,0-72,0	58,0	44,0-64,0	56,0	40,0-63,0
			p <sub>1</sub> < 0,001		p <sub>1</sub> < 0,001	
CD3 <sup>+</sup> , (10 <sup>9</sup> /л)	1,39	0,99-1,84	1,09	0,64-1,49	0,83	0,40-1,30
					p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>2</sub> < 0,01	
CD4 <sup>+</sup> , (%)	44,0	34,0-49,0	38,0	30,0-42,0	32,0	23,0-40,0
			p <sub>1</sub> < 0,01		p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>2</sub> < 0,05	
CD4 <sup>+</sup> , (10 <sup>9</sup> /л)	0,84	0,54-1,27	0,79	0,36-1,18	0,48	0,25-0,78
					p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>2</sub> < 0,01	
CD8 <sup>+</sup> , (%)	27,0	20,0-34,0	26,0	16,0-33,0	24,0	18,0-32,0
					p <sub>1</sub> < 0,05	
CD8 <sup>+</sup> , (10 <sup>9</sup> /л)	0,57	0,37-0,89	0,39	0,27-0,85	0,38	0,16-0,63
					p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>2</sub> < 0,01	
CD16 <sup>+</sup> , (%)	20,0	17,0-22,0	20,0	8,0-28,0	17,0	8,0-25,0
					p <sub>1</sub> < 0,05	
CD16 <sup>+</sup> , (10 <sup>9</sup> /л)	0,45	0,30-0,60	0,36	0,15-0,86	0,20	0,09-0,48
					p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>2</sub> < 0,01	
CD19 <sup>+</sup> , (%)	13,5	9,0-16,0	13,0	3,0-17,0	12,0	7,0-18,0
CD19 <sup>+</sup> , (10 <sup>9</sup> /л)	0,27	0,18-0,39	0,24	0,09-0,35	0,18	0,06-0,39
					p <sub>1</sub> < 0,001	
HLA-DR <sup>+</sup> , (%)	15,0	12,0-20,0	16,5	8,0-28,0	14,0	8,0-25,0
HLA-DR <sup>+</sup> , (10 <sup>9</sup> /л)	0,35	0,24-0,45	0,30	0,16-0,81	0,22	0,09-0,54
					p <sub>1</sub> < 0,001 p <sub>2</sub> < 0,01	

**Примечание.** p<sub>1</sub> – статистически достоверные различия с контрольными величинами; p<sub>2</sub> – статистически достоверные различия с показателями больных острым лимфобластным лейкозом.

и CD16<sup>+</sup> лимфоцитов, содержание IgA в крови. Таким образом, мы выявили, что огромное влияние на содержание бластных клеток в костном мозге при первичной атаке и повторном рецидиве ОНЛЛ играет относительный уровень HLA-DR<sup>+</sup> лимфоцитов.

Аналогично было проанализировано содержание бластных клеток в костном мозге у больных на разных стадиях ОЛЛ. Установлено, что у больных на стадии первичной атаки наиболее значимыми показателями нейроредикторной модели являются уровень процентного содержания CD3<sup>+</sup> лимфоцитов, абсолютное количество HLA-DR<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> и CD16<sup>+</sup> клеток. При ремиссии заболевания наиболее информативными показателями модели являются соотношение CD4<sup>+</sup> к CD8<sup>+</sup>, абсолютное содержание CD19<sup>+</sup> лимфоцитов, величина лейко-Т-клеточного соотношения, процентное количество HLA-DR<sup>+</sup> клеток и уровень индекса активации Т-лимфоцитов. При рецидиве ОЛЛ наиболее значимым показателем модели нейросетевого предиктора является уровень сывороточной концентрации IgM. Уровень лейко-Т-клеточного индекса, содержание лейкоцитов в периферической крови, процентное содержание лимфоцитов и CD3<sup>+</sup> клеток также являются наиболее информативными показателями модели, но со значительно меньшей величиной значимости. На основе сформированных нейросетевых предикторов нами проведен вычислительный эксперимент, который позволил оценить различия в системе взаимосвязей исследуемых показателей иммунного статуса и их информативность в зависимости от стадии ОЛЛ. Для этого осуществлялось тестирование базы данных по иммунному статусу каждой группы обследуемых по всем сформированным нейроредикторным сетям. Обнаружено, что при тестировании показателей иммунного статуса больных на стадии атаки (ремиссии, рецидива) ОЛЛ по собственной нейросети количество бластных клеток практически соответствовала исходному уровню. В то же время при вычислении количества бластных клеток у лиц на данной стадии заболевания по нейросети больных на стадии ремиссии заболевания установлено значительное снижение бластов в костном мозге, тогда как при вычислении по нейросети, сформированной по иммунологическим данным рецидива заболевания, выявлено практическое соответствие фактическим значениям.

Необходимо отметить следующее. Во-первых, исходный уровень бластных клеток при ремис-

сии заболевания и вычисленный по базе данных больных ОЛЛ на стадии атаки и нейросетевого предиктора, сформированного по базе больных на стадии ремиссии, статистически не различается. Во-вторых, между исходным уровнем бластных клеток при атаке ОЛЛ и вычисленными с помощью нейросетей, сформированных для каждой стадии заболевания, установлена только одна статистически достоверная взаимосвязь: между исходным и вычисленным уровнем бластов по нейросети больных на стадии атаки ( $r = 0,98$ ,  $p < 0,001$ ). В-третьих, фактическое количество бластных клеток при рецидиве ОЛЛ и вычисленное по базе данных больных на стадии атаки заболевания и нейроредикторной сети, сформированной по базе данных больных на стадии рецидива, также статистически достоверно не различается. Кроме того, при данном тестировании в 30,4% примеров выявляется совпадение уровней содержания бластных клеток в костном мозге. Следовательно, именно взаимосвязи показателей иммунного статуса и их значимость в модели нейросетевого предиктора влияют в значительной степени на характерный уровень содержания бластных клеток в костном мозге у больных ОЛЛ в зависимости от стадии заболевания.

Таким образом, у больных острыми лейкозами выявлено снижение реактивности иммунной системы. На всех стадиях ОЛЛ у больных развивается Т-клеточный иммунодефицит. Снижение Т-лимфоцитов и уменьшение величины соотношения CD4<sup>+</sup> к CD8<sup>+</sup> способствует появлению атаки ОЛЛ. Особенностью рецидива ОЛЛ является увеличение содержания НК-клеток. На стадии атаки и ремиссии ОНЛЛ развивается Т-клеточный иммунодефицит, на стадии рецидива – комбинированный иммунодефицит с поражением Т- и В- систем иммунитета. Особенностью ОНЛЛ является истощение содержания НК-клеток, которое, вероятно, и способствует прогрессированию заболевания и развитию рецидива. С помощью нейросетевого предиктора выявлена информативность параметров иммунного статуса при определении количества бластных клеток в костном мозге. Установлено, что в каждой группе больных людей обнаруживается характерная для них гистограмма информативности. Проведен вычислительный эксперимент, характеризующий специфичность взаимосвязей показателей иммунного статуса в нейроредикторной модели при ОЛЛ и ОНЛЛ лейкозах.

## Список литературы

1. Волкова М.А. Клиническая онкогематология. – М.: Медицина, 2001. – С. 156-214.
2. Воробьев А.И. Руководство по гематологии в 3-х томах. – М.: Ньюдиамед, 2002. – Т. 1. – С. 147-251.
3. Ковалева Л.Г. Острые лейкозы. – М.: Медицина, 1990. – 212 с.
4. Bisset L.R., Lung T.L., Kaelin M. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes

applicable to the healthy adult population in Switzerland // Eur. J. Haematol. – 2004. – Vol. 72. – P. 203-212.

5. Faray S.S., Fehniger T.A., Ruggeri L., Velardi A., Caligiuri M.A. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect // Blood. – 2002. – Vol. 100. – P. 1935-1947.

*поступила в редакцию 22.04.2010*

*отправлена на доработку 13.05.2010*

*принята к печати 28.06.2010*