



<https://doi.org/10.34883/PI.2022.8.3.010>
УДК 616.155.194.7-037-053.2-076:612.112.94



Емельянова И.В., Углова Т.А., Быданов О.И., Мовчан Л.В.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у детей с приобретенной апластической анемией и его прогностическое значение

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Емельянова И.В. – концепция и дизайн исследования, сбор материала, анализ и интерпретация данных, написание текста; Углова Т.А. – концепция и дизайн исследования, интерпретация данных, редактирование; Быданов О.И. – статистическая обработка материала; Мовчан Л.В. – сбор материала.

Подана: 14.07.2022

Принята: 12.09.2022

Контакты: druglova@mail.ru

Резюме

Установлено, что 64-й и 180-й дни иммуносупрессивной терапии (ИСТ) у детей с приобретенной апластической анемией (ПАА) являются информационными точками ее эффективности. Достижение гематологического ответа (ГО) к 180-му дню ИСТ ассоциировано с долгосрочными результатами лечения.

Выявлены изменения субпопуляционного состава лимфоцитов ПК у детей с ПАА: снижение инициального относительного содержания CD16+CD56+ лимфоцитов и CD19+ лимфоцитов ($p < 0,0001$; $p = 0,0003$ соответственно) и инициального содержания CD3+HLA-DR+ лимфоцитов и CD3+CD8+ лимфоцитов ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$ соответственно) по сравнению с аналогичными показателями у детей группы контроля. Установлено, что уровень CD19+ лимфоцитов на 64-й день ИСТ позволяет прогнозировать ГО к 180-му дню проведения ИСТ.

Выявлено увеличение бессобытийной выживаемости пациентов с тПАА, получивших ИСТ с дополнительным введением биомедицинского клеточного продукта мезенхимальных стволовых клеток (БМКП МСК).

Ключевые слова: приобретенная апластическая анемия, субпопуляционный состав лимфоцитов, дети

Yamelyanova I., Uglova T., Bydanau O., Movchan L.

Republican Scientific and Practical Center for Children's Oncology, Hematology
and Immunology, Minsk, Belarus

Subpopulation Composition of Peripheral Blood Lymphocytes and its Prognostic Significance in Children with Acquired Aplastic Anemia

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Yamelyanova I. – concept and design of research, collection of material, analysis and interpretation of data, writing text; Uglova T. – concept and design of research, interpretation of data, editing; Bydanau O. – statistical processing of material; Movchan L. – collection of material.

Submitted: 14.07.2022

Accepted: 12.09.2022

Contacts: druglova@mail.ru

Abstract

The 64th and 180 days of immunosuppressive therapy (IST) in children with acquired aplastic anemia (AAA), are determined to be information points of its effectiveness. The achievement of a hematological response (HR) by the 180th day of IST is associated with long-term treatment results.

Changes in the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes (PB) in children with AA were revealed: a decrease in the initial relative content of CD16+CD56+ lymphocytes and CD19+ lymphocytes ($p<0.0001$; $p=0.0003$, respectively) and an increase in the initial content of CD3+HLA-DR+lymphocytes and CD3+CD8+ lymphocytes ($p<0.0001$; $p<0.0001$, respectively) compared with similar indicators in children in the control group.

It was found that the level of CD19+ lymphocytes on the 64th day of the IST allows predicting HR by the 180th day of the IST.

An increase in the event-free survival of patients with sAAA who received IST with additional administration of a biomedical cellular product of mesenchymal stem cells (BMCP MSCs) was revealed.

Keywords: acquired aplastic anemia, subpopulation composition of lymphocytes, children

■ ВВЕДЕНИЕ

Приобретенная апластическая анемия – это редкое заболевание с нарушением функции костного мозга (КМ), характеризующееся его гипоплазией без признаков дисплазии или фиброза и панцитопенией в периферической крови [1]. Одним из механизмов патогенеза апластической анемии является иммуноопосредованное антиген-зависимое повреждение полипотентных стволовых клеток [2–4].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение изменения субпопуляционного состава лимфоцитов у пациентов детского возраста с тПAA и его прогностическое значение в ходе ИСТ.



■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен ретроспективный анализ эффективности ИСТ у 106 пациентов детского возраста с тПАА, получивших в качестве терапии первой линии курс ИСТ в центре детской онкологии, гематологии и иммунологии в 1997–2016 гг.

Анализ субпопуляционного состава лимфоцитов ПК проведен у 80 пациентов в возрасте от 1 до 19 лет (медиана возраста 7,5 года), получивших ИСТ в период с марта 1998 г. по август 2020 г. 49 пациентам субпопуляционный состав лимфоцитов ПК исследован в динамике ИСТ на 64-й и 180-й день.

Группу контроля составили 95 здоровых детей в возрасте от 2 до 16 лет (медиана возраста 10 лет). Субпопуляционный состав лимфоцитов ПК исследовался у них после получения информированного согласия родителей / законных представителей.

Для статистического анализа данных использовали программы Microsoft Excel и R-statistics 3.2.0. Сравнение показателей крови определялось с помощью теста Манна – Уитни. Значения показателей, предопределяющих ответ к 180-му дню ИСТ, определялись с помощью ROC-анализа в соответствии с площадью под кривой (AUC). При AUC >0,6 считали диагностическую ценность показателя правомочной.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая выживаемость детей с тПАА, получивших в качестве терапии первой линии курс ИСТ, составила $59\% \pm 8\%$ (рис. 1).

У 29 пациентов этой группы (27,4%) на 64-й день ИСТ диагностирован ГО. На 180-й день он зафиксирован у 41 пациента (38,7%) ($p < 0,01$). На 360-й день ИСТ ГО имели 47 пациентов (44,3%) (рис. 2), т. е. темп ГО в период 64–180 дней ИСТ в 2 раза выше, чем в последующий.

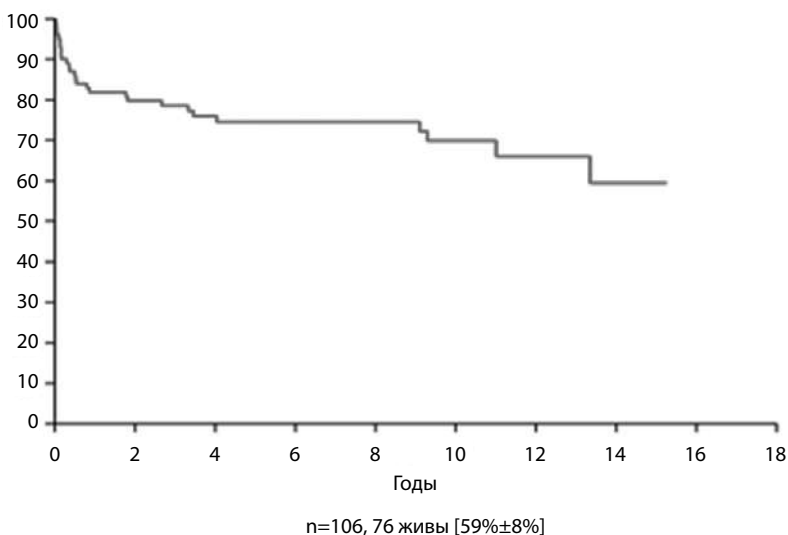


Рис. 1. Общая выживаемость пациентов с тПАА, получивших ИСТ
Fig. 1. Overall survival (OS) SAA patients treated with IST

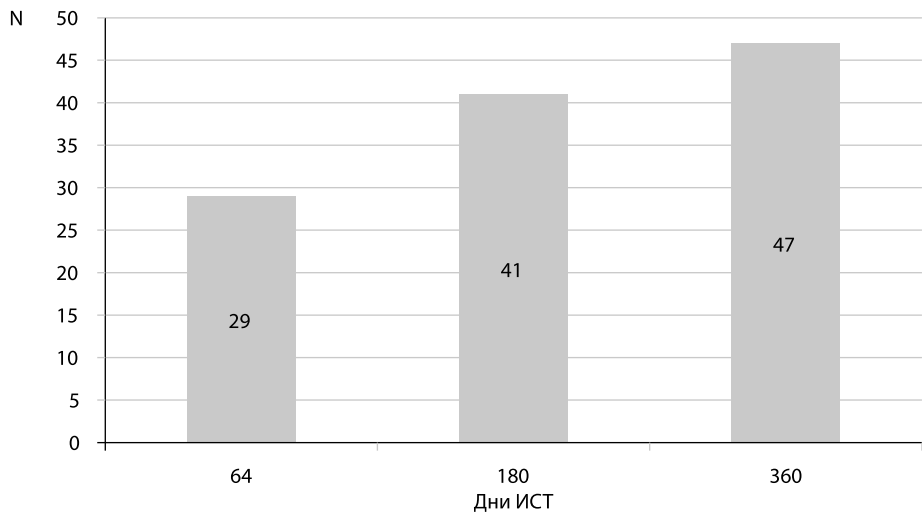
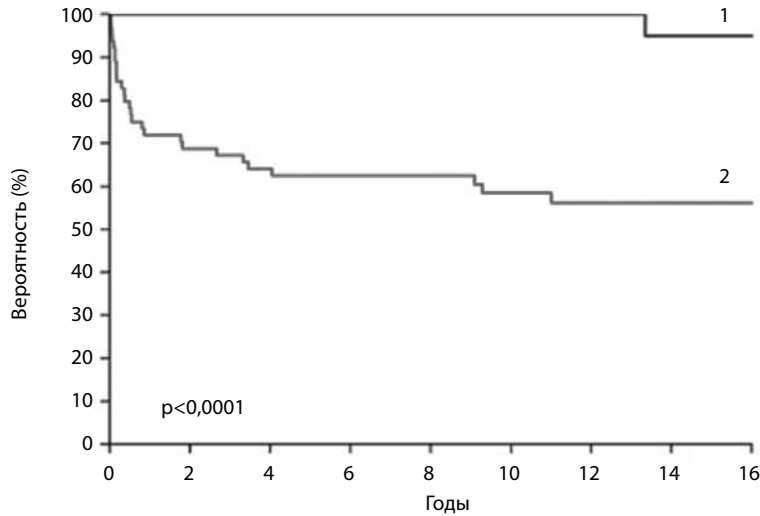


Рис. 2. Гематологический ответ на 64-й, 180-й и 360-й день ИСТ у детей с тПAA
Fig. 2. Hematological response at 64, 180 and 360 days of IST in children with SAA



1 – ГО к 180-му дню ИСТ, n=41, 38 живы [95%±5%]
2 – Без ГО к 180-му дню ИСТ, n=65, 37 живы [56%±6%]

Рис. 3. Общая выживаемость пациентов с тПAA в зависимости от достижения ГО к 180-му дню ИСТ
Fig. 3. Overall survival of patients with SAA, depending on the achievement of a HR by day 180 of IST



Общая выживаемость пациентов с тПАА, у которых на 180-й день ИСТ зафиксирован ГО, составила 95,5%, что достоверно выше, чем у пациентов, не ответивших на ИСТ к этому времени ($p < 0,0001$) (рис. 3). Следовательно, ГО на 180-й день терапии является важным прогностическим фактором вероятной долгосрочной выживаемости пациентов детского возраста с тПАА.

Общая выживаемость пациентов, имевших ГО на 360-й день ИСТ, практически не отличалась от выживаемости пациентов, имеющих ГО на 180-й день, и составила $93\% \pm 5\%$.

Таким образом, 64-й и 180-й дни являются информативными точками эффективности ИСТ у детей с тПАА.

Принимая во внимание, что одним из основных звеньев патогенеза ПАА являются иммунологические изменения, поиск прогностических факторов ГО на 180-й день ИСТ в первую очередь сосредоточился на выявлении изменений адаптивного иммунитета до и в процессе лечения.

У пациентов детского возраста с тПАА выявлены достоверно значимые инициальные изменения Т- и В-клеточного звена иммунитета, в частности увеличение активированных Т-лимфоцитов (CD3+HLA-DR+), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+), снижение естественных киллеров (CD3-CD16+CD56+) и В-лимфоцитов (CD19+) (табл. 1).

Субпопуляции лимфоцитов в ПК у пациентов детского возраста с тПАА, имевших и не имевших ответ к 180-му дню ИСТ, практически не отличались (табл. 2).

Наиболее значимые различия выявлены в уровне CD19+ лимфоцитов на 64-й день ИСТ: у пациентов, достигших ГО к 180-му дню ИСТ, относительное содержание в сыворотке крови CD19+ колебалось от 0 до 11,8% (медиана 4,45%), а у пациентов, не достигших ГО у 180-му дню, – от 0,05 до 65% (медиана 6,2%).

ROC-анализ и построение характеристической кривой (Receiver Operating Characteristic curve, или ROC-кривые) позволили выявить прогностическую значимость CD19+ лимфоцитов на 64-й день ИСТ (площадь под кривой (AUC) составила 0,6574) для достижения ГО к 180-му дню ИСТ. Показатель CD19+ в ПК, равный 5,1% на 64-й день ИСТ, позволяет прогнозировать ГО к 180-му дню у пациентов детского возраста с тПАА с чувствительностью 63,3%, специфичностью 66,7% (рис. 4).

Таблица 1
Субпопуляционный состав лимфоцитов ПК пациентов с тПАА и здоровых доноров
Table 1
Subpopulation composition of lymphocytes in patients with SAA and healthy donors

Показатели	Пациенты с тПАА (n=80)	Здоровые (n=95)	P
CD3+HLA-DR+, %; Me (колебания)	5,5 (0,3–50,5)	3,1 (0,1–13,0)	<0,0001
CD3+CD4+, %; Me (колебания)	38,35 (1,28–64,3)	39,5 (15,3–55,2)	0,2537
CD3+CD8+, %; Me (колебания)	30,7 (11,5–64,3)	23,3 (13,5–39,3)	<0,0001
CD19+, %; Me (колебания)	12,25 (1,1–50,9)	16,9 (7,9–32,7)	0,0003
CD3+CD16+CD56+, %; Me (колебания)	5,9 (0–28,0)	10,9 (4,4–21,4)	<0,0001

Таблица 2
Субпопуляции лимфоцитов периферической крови у пациентов детского возраста с тПЛАА в зависимости от ГО к 180-му дню ИСТ
Table 2
Subpopulations of peripheral blood lymphocytes in pediatric patients with SAA depending on HR by day 180 of IST

Показатели	Пациенты с ГО (n=18)	Пациенты без ГО (n=31)	p
CD3+HLA-DR+, %; 0 день; Ме (колебания)	5,2 (1,5–36,4)	5,8 (0,7–50,5)	0,55
CD4+, %; 0 день; Ме (колебания)	34,2 (1,28–57,6)	38,4 (11,6–56,7)	0,84
CD8+, %; 0 день; Ме (колебания)	32 (14,5–52,2)	30,3 (11,7–64,1)	0,91
CD19+, %; 0 день; Ме (колебания)	10,15 (6–21,1)	11,7 (1,1–29,7)	0,72
CD16+CD56+, %; 0 день; Ме (колебания)	9,65 (1,6–29,9)	5,5 (0,6–28,0)	0,22
CD3+HLA-DR+, %; 64-й день; Ме (колебания)	5,4 (1,6–16,1)	6,05 (0,7–60,0)	0,70
CD4+, %; 64-й день; Ме (колебания)	34,1 (6,9–56,2)	32,3 (7,7–58,1)	0,7
CD8+, %; 64-й день; Ме (колебания)	36,75 (22,9–75,7)	39,15 (24,6–81,2)	0,98
CD19+, %; 64-й день; Ме (колебания)	4,45 (0–11,8)	6,2 (0,05–65)	0,07
CD16+CD56+, %; 64-й день; Ме (колебания)	9,2 (2,5–38,9)	8,5 (0,7–28,0)	0,52

С целью усиления иммуносупрессивной терапии нами предложено введение БМКП МСК на 8-е и 31-е сутки ИСТ в дозе $>1,0 \times 10^6$ /кг. После терапии БМКП МСК у пациентов достоверно снижалось абсолютное количество CD3+CD8+ и CD3+HLA-DR+ лимфоцитов в ПК в период с 0 до 180-го дня ИСТ ($p < 0,05$), тогда как у пациентов, не получивших БМКП МСК, отсутствовали изменения в содержании этих субпопуляций лимфоцитов ПК.

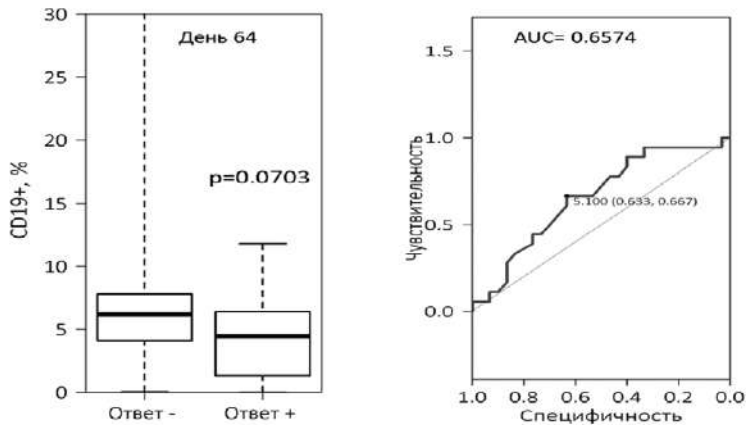
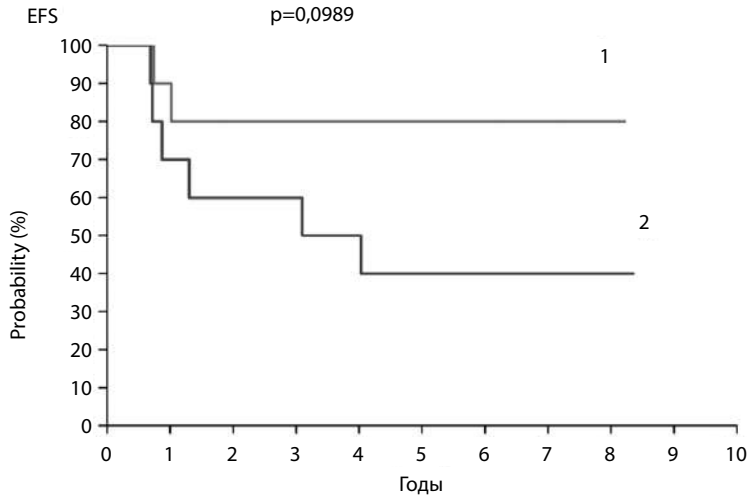


Рис. 4. Относительное содержание CD19+ лимфоцитов на 64-й день ИСТ и их прогностическая значимость
Примечания: «Ответ –» – группа пациентов, не имеющих ГО на 180-й день ИСТ; «Ответ +» – группа пациентов, имеющих ГО на 180-й день ИСТ; AUC – площадь под кривой.

Fig. 4. The relative content of CD19+ lymphocytes on the 64th day of IST and their prognostic significance



1 – пациенты, получившие ИСТ+ БМКП МСК, n=10, 8 без событий [80,0%±12,6%]
2 – пациенты с ИСТ, n=10, 4 без событий [40%±15,5%]

Рис. 5. Бессобытийная выживаемость пациентов с тПAA в зависимости от вида терапии
Fig. 5. Event-free survival of patients with SAA, depending on the type of therapy

Ведение БМКП МСК имело значение и для долгосрочного прогноза у пациентов детского возраста с тПAA. Бессобытийная выживаемость пациентов с тПAA, получивших дополнительное введение БМКП МСК, была значительно выше и составила 80% по сравнению с пациентами, которые получали стандартную ИСТ (40%).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

64-й и 180-й дни ИСТ являются прогностическими факторами долгосрочной выживаемости пациентов с тПAA. У пациентов с тПAA отмечается достоверное снижение относительного уровня CD16+CD56+ лимфоцитов ($p < 0,0001$) и CD19+ лимфоцитов ($p = 0,0003$) и увеличение уровня CD3+HLA-DR+ лимфоцитов ($p < 0,0001$) и CD3+CD8+ лимфоцитов ($p < 0,0001$) по сравнению со здоровыми донорами. Относительный уровень CD19+ 5,1% в ПК на 64-й день ИСТ позволяет прогнозировать ГО к 180-му дню. Бессобытийная выживаемость пациентов с тПAA, получивших ИСТ, повышалась при применении БМКП МСК.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Bueno C., Roldan M., Anguita E., Romero-Moya D., Martin-Antonio B. et al. (2014) Bone marrow mesenchymal stem cells from patients with aplastic anemia maintain functional and immune properties and do not contribute to the pathogenesis of the disease. *Haematologica*, vol. 99, pp. 1168–1175.
2. Young N.S. Pathophysiologic mechanisms in acquired aplastic anemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program. 2006. P. 72–7.
3. Maciejewski J.P., O'Keefe C., Gondek L., Tiu R. (2007) Immune-mediated bone marrow failure syndromes of progenitor and stem cells: molecular analysis of cytotoxic T cell clones. *Folia histochemica et cytobiologica*, vol. 45, pp. 5–14.
4. Young N.S., Scheinberg P., Calado T. (2008) Aplastic anemia. *Curr Opin Hematol*, vol. 15, pp. 162–168.