

В.Т. Манчук, О.В. Смирнова

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ НЕЙРОСЕТЕВОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И ДИСКРИМИНАНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ НЕЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

УДК 312:616-006

Целью настоящего исследования явилось изучение состояния клеточного и гуморального звеньев иммунитета у больных ОНЛЛ, с использованием различных статистических методов для оценки. Выявлено, что 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 NK-клеток, которое способствует прогрессированию заболевания и развитию рецидива. Нейросетевое моделирование и дискриминантный анализ выявили самые значимые параметры системного анализа, изменение которых способствуют как возникновению, так и прогрессированию онкологического заболевания.

**Ключевые слова:** острый нелимфобластный лейкоз, клеточный иммунитет, гуморальный иммунитет, системный анализ.

The purpose of the present research was studying of a condition of cellular and humoral immunity links in patients with acute non-lymphoblast leukemia, using various statistical methods for estimation.

It was revealed, that at a stage of attack and remission of acute non-lymphoblast leukemia the T-cellular immunodeficiency developed, at a stage of relapse - the combined immunodeficiency with lesion of T-and B-systems of immunity. The exhaustion of the NK-cells content which promotes progressing of disease and development of relapse is the feature of acute non-lymphoblast leukemia. Neuronet modeling and the discriminant analysis have revealed the most significant parameters of the system analysis change of which promote both to occurrence, and progressing of oncological disease.

**Keywords:** acute non-lymphoblast leukemia, cellular immunity, humoral immunity, system analysis.

Острый нелимфобластный лейкоз (ОНЛЛ) – наиболее частое заболевание среди острых лейкозов [1,2,3]. Несмотря на то, что заболевание диагностируется в любом возрасте, его частота возрастает по мере старения человека. В настоящее время остаются малоизученными многие патогенетические аспекты возникновения, прогрессирования данной патологии и развития осложнений. В этой связи изучение механизмов нарушения иммунной реактивности у больных ОНЛЛ позволит не только оценить иммунопатогенез заболевания, но и послужит основой для разработки эффективных методов прогноза и терапии. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение состояния клеточного и гуморального звеньев иммунитета у больных ОНЛЛ, с использованием различных статистических методов для оценки.

**Материалы и методы исследования.** В исследование были включены пациенты, поступившие в гематологическое отделение Краевой клинической больницы № 1 г. Красноярск с 2000 по 2005 г. ОНЛЛ выявлялся у 100 больных, при этом у 30 из них (30%) в стадии первичной атаки, у 49 (49%) – в полной ремиссии после проведенного

лечения и у 21 больного (21%) – при повторном рецидиве (классификация лейкозов по ФАБ (1976-1980) и Воробьеву А.И. (1985)). В качестве контроля обследовано 125 практически здоровых лиц аналогичного возраста.

Для оценки клинической картины использовался анамнез больного и проводилось полное его клиничко-лабораторное обследование. Для верификации диагноза всем больным при поступлении проводилась стерильная пункция с количественным и процентным определением пулов клеток и цитохимическим определением ферментов.

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», г. Москва). Дополнительно вычислялись иммунорегуляторный индекс ( $CD4^+/CD8^+$ ), лейко-Т-клеточный (Лейкоциты/ $CD3^+$ ), лейко-В-клеточный индекс (Лейкоциты/ $CD19^+$ ) и индекс активации Т-лимфоцитов ( $HLA-DR^+/CD72^+$ ) [3]. Концентрацию иммуноглобулинов класса А, М и G в сыворотке определяли иммуноферментным методом. Оценка клеточного и гуморального иммунитета проводилась при поступлении больных до начала патогенетического лечения.

По результатам исследования в электронных таблицах MS Excel 2000 была сформирована база данных, на основе которой с помощью пакетов

прикладных программ Statistica 7.0 производился статистический анализ методами описательной статистики с t-критерием Стьюдента, непараметрическим с использованием точных критериев Манна-Уитни. Результаты статистической обработки сведены в таблицы и использованы в рисунках. Для решения задач системного анализа использовали нейросетевую классификатор и дискриминантный анализ. Дискриминантный анализ проводился по методу Forward stepwise (Tolerance = 0,010, F to enter = 2,30, F to remove = 1,50, Number of steps = 25). Количество заданных шагов соответствовало количеству исследуемых параметров иммунного статуса.

**Результаты и обсуждение.** В целом при исследовании особенностей иммунного статуса больных ОНЛЛ наиболее выраженные его изменения выявляются у больных при рецидиве заболевания (табл. 1). Состояние клеточного иммунитета у больных ОНЛЛ при первичной атаке характеризуется снижением процентной концентрации Т-клеток и  $CD4^+$ -лимфоцитов. 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 им-

Таблица 1

Показатели клеточного и гуморального звеньев иммунитета у больных на разных стадиях ОНЛЛ (Me, C<sub>25</sub>-C<sub>75</sub>)

Показатели	Контроль, N=118		Атака, N=30		Ремиссия, N=49		Рецидив, N=21	
	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>	Me	C <sub>25</sub> -C <sub>75</sub>
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	5,73	4,85 – 7,75	6,40	2,50 – 9,60	4,50	3,10 – 6,40	3,00	1,50 – 6,00
Лимфоциты, %	38,0	31,0 – 45,0	43,5	24,0 – 69,0	p <sub>1</sub> <0,001	p <sub>2</sub> <0,05	p <sub>1</sub> <0,001	p <sub>2</sub> <0,05
					28,0	23,0 – 42,0	42,0	30,0 – 78,0
CD3 <sup>+</sup> , %	67,0	60,0 – 72,0	56,0	40,0 – 65,0	p <sub>1</sub> <0,01		p <sub>2</sub> <0,05	
					57,5	40,5 – 64,0	55,0	45,0 – 60,0
CD4 <sup>+</sup> , %	44,0	34,0 – 49,0	34,0	28,0 – 40,0	p <sub>1</sub> <0,001		p <sub>1</sub> <0,001	
					31,0	26,5 – 40,0	30,0	19,0 – 43,0
CD8 <sup>+</sup> , %	27,0	20,0 – 34,0	25,0	20,0 – 33,0	p <sub>1</sub> <0,001		p <sub>1</sub> <0,01	
					23,5	16,0 – 31,0	31,0	18,0 – 33,0
CD16 <sup>+</sup> , %	20,0	17,0 – 23,0	22,0	15,0 – 31,0	p <sub>1</sub> <0,05			
					14,0	8,0 – 23,5	13,0	5,0 – 19,5
CD19 <sup>+</sup> , %	13,5	9,0 – 16,0	12,0	9,0 – 15,0	p <sub>1,2</sub> <0,05		p <sub>1</sub> <0,01	p <sub>2</sub> <0,05
HLA-DR <sup>+</sup> , %	15,0	12,0 – 20,0	15,0	9,0 – 25,0		7,0 – 16,0	10,0	7,0 – 29,0
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	1,52	1,13 – 1,95	1,30	1,00 – 1,70		9,0 – 24,0	11,0	7,0 – 33,0
	1,91	1,33 – 3,20	2,00	0,62 – 4,35	1,50	0,90 – 1,95	1,30	0,90 – 1,70
IgA, г/л					1,56	0,68 – 3,70	0,96	0,56 – 2,49
IgM, г/л	1,20	0,50 – 1,80	1,25	0,60 – 1,90				p <sub>1</sub> <0,01
					1,02	0,64 – 2,00	0,64	0,40 – 0,91
IgG, г/л	10,30	8,18 – 14,12	13,68	6,70 – 32,50			p <sub>1,2,3</sub> <0,05	p <sub>2</sub> <0,01
					7,66	5,90 – 14,52	6,10	3,89 – 7,33
					p <sub>1,2</sub> <0,05		p <sub>1,2</sub> <0,001	

Примечание. p<sub>1</sub> – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы; p<sub>2</sub> – -/- с показателями больных на стадии первичной атаки; p<sub>3</sub> – -/- с показателями больных на стадии ремиссии ОНЛЛ.

мунного статуса и уровнем содержания бластных клеток в костном мозге в зависимости от стадии заболевания. В модели нейросетевого предиктора на данной стадии обнаружена корреляционная связь между процентным уровнем Т-лимфоцитов ( $r=0,40$ ;  $p<0,05$ ) и уровнем бластных клеток в костном мозге, что свидетельствует о значимости этого показателя.

Состояние клеточного иммунитета у больных ОНЛЛ на стадии ремиссии характеризуется снижением абсолютного количества лейкоцитов, абсолютного и относительного содержания Т-, CD4<sup>+</sup>-, цитотоксических лимфоцитов, NK-клеток, абсолютного количества В-лимфоцитов и лимфоидных клеток, экспрессирующих маркер HLA-DR. Повышение величин лейко-Т- и лейко-В-клеточных коэффициентов отражает соответствующее понижение долей Т- и В-лимфоцитов в цельной фракции лейкоцитов крови, об этом также свидетельствует повышенный индекс активации Т-лимфоцитов. В модели нейросетевого предиктора на этой стадии обнаружена корреляционная связь между абсолютными количествами лимфоцитов ( $r=0,31$ ;  $p<0,05$ ), Т-клеток ( $r=0,32$ ;  $p<0,05$ ), цитотоксических лимфоцитов ( $r=0,31$ ;  $p<0,05$ ) и уровнем бластных клеток в костном мозге, что свидетельствует о важности всех этих показателей.

При рецидиве ОНЛЛ состояние клеточного иммунитета характеризуется снижением абсолютного количества

лейкоцитов и лимфоцитов в крови, относительного и абсолютного содержания Т-, CD4<sup>+</sup>-, NK-клеток и абсолютного количества цитотоксических лимфоцитов и клеток, экспрессирующих маркер HLA-DR. В модели нейросетевого предиктора обнаружена корреляционная связь между абсолютным количеством лейкоцитов крови ( $r=0,52$ ;  $p<0,05$ ), лейко-В-клеточным коэффициентом ( $r=0,48$ ;  $p<0,05$ ) и уровнем бластных клеток в костном мозге, что свидетельствует о значимости этих параметров.

При исследовании состояния гуморального звена иммунной системы обнаружено, что на стадии первой атаки заболевания никаких отклонений от нормы нет. При ремиссии выявлено снижение концентрации IgG в крови. При рецидиве снижаются в крови концентрации всех исследуемых иммуноглобулинов: IgA, IgM, IgG. При этом сывороточная концентрация IgA ( $r=-0,29$ ;  $p<0,05$ ) у больных на стадии ремиссии является наиболее информативной в модели нейросетевого предиктора, определяющего уровень бластных клеток в костном мозге. Для определе-

ния наиболее значимых показателей иммунного статуса, характеризующих стадии ОНЛЛ, и оценки равномерности распределения исследуемых показателей в контрольной группе и у больных людей нами применен дискриминантный анализ. Дискриминантный анализ проводился по методу Forward stepwise (Tolerance = 0,010, F to enter = 2,30, F to remove = 1,50, Number of steps = 25). Количество заданных шагов соответствовало количеству исследуемых параметров иммунного статуса. Установлено, что линейная дискриминантная функция состоит из 11 переменных ( $\lambda$  Уилкса=0,265,  $p<0,001$ ). Величины и статистическая достоверность параметров Уилксовой и частичной  $\lambda$  представлены в табл. 2. Наиболее значимыми параметрами дискриминантной модели являются процентный уровень

Таблица 2

Величины и статистическая достоверность параметров Уилксовой и частичной  $\lambda$  для иммунологических параметров дискриминантной модели больных ОНЛЛ и контрольной группы

Показатели	$\lambda$ Уилкса	Частичная $\lambda$	P
Лимфоциты, %	0,300	0,882	0,000269
Лимфоциты, абс	0,291	0,908	0,002207
CD3 <sup>+</sup> , %	0,327	0,810	0,000001
CD4 <sup>+</sup> , абс	0,288	0,919	0,005066
CD16 <sup>+</sup> , абс	0,307	0,862	0,000050
CD19 <sup>+</sup> , %	0,296	0,893	0,000682
CD19 <sup>+</sup> , абс	0,286	0,926	0,008760
Лейкоциты/CD3 <sup>+</sup>	0,283	0,935	0,017102
HLA-DR/CD19	0,307	0,862	0,000050
IgG, г/л	0,317	0,836	0,000005
IgA/CD19	0,277	0,955	0,070917

CD3<sup>+</sup>-лимфоцитов, концентрация IgG в крови, индекс активации Т-лимфоцитов и абсолютное содержание CD16<sup>+</sup>-клеток. Значения коэффициентов и константы линейных дискриминантных функций представлены в табл.3.

Первая линейная дискриминантная функция осуществляет классификацию показателей иммунного статуса между контрольной группой и больными на разных стадиях ОНЛЛ. Вторая линейная дискриминантная функция классифицирует лиц на стадии ремиссии заболевания и больных на стадиях первой атаки и рецидива ОНЛЛ. Третья линейная дискриминантная функция осуществляет классификацию между больными на стадиях первой атаки и рецидива заболевания. Обращает внимание, что в зависимости от задачи классификации большинство коэффициентов меняют знак от функции к функции, что свидетельствует об изменении доли участия данного параметра при классификации. Только коэффициенты показателя абсолютного количества лимфоцитов и показателя содержания IgG в крови остаются одинаковыми по знаку во всех функциях, в первом случае – отрицательный, во втором – положительный. Это свидетельствует о значимости данных параметров для всех функций.

Дискриминантный анализ изучения выборки больных ОНЛЛ и контрольной группы обнаружил, что наиболее значимыми показателями иммунного статуса при классификации по стадиям ОНЛЛ являются уровни относительного содержания Т- и В-лимфоцитов, абсолютные количества CD4<sup>+</sup>-клеток, NK- и В-лимфоцитов, лейко-Т-клеточный коэффициент, индекс активации Т-лимфоцитов, содержание IgG и уровень относительного синтеза IgA. Только 72,7% лиц из всех представленных случаев были распознаны классификатором как правильные. Наибольшее число параметров, изменивших уровень достоверности различий с контрольными показателями, были у

больных с «правильным» рецидивом, а наименьшее – у больных с «правильной» ремиссией.

В группе больных с «правильной» атакой параметрами иммунного статуса, изменившими уровень достоверности с контрольными показателями, явились концентрация IgG в крови и уровень его относительно-го синтеза. В группе больных с «правильной» ремиссией единственным параметром иммунного статуса, изменившим уровень достоверности с контрольными показателями, являлся уровень относительного синтеза IgA. В группе больных с «правильным» рецидивом такими показателями были относительные уровни CD19<sup>+</sup>- HLA-DR<sup>+</sup>-клеток, лейко-В-клеточный коэффициент и индекс относительного синтеза IgG.

**Закключение.** Таким образом, 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 NK-клеток, которое способствует прогрессированию заболевания и развитию рецидива [5,6,7]. Дополнительные методы статистического анализа позволили системно оценить состояние клеточного и гуморального звеньев иммунитета, оценивая вклад каждого параметра в формирование иммунного статуса для определенной стадии ОНЛЛ. Интересен тот факт, что оба дополнительных метода системного анализа (нейросетевое модели-

Таблица 3

Значения коэффициентов и константы линейных дискриминантных функций показателей иммунного статуса при классификации по стадиям ОНЛЛ

Показатели	Функция 1	Функция 2	Функция 3
Лимфоциты, %	-0,0122	0,0250	-0,0424
Лимфоциты, абс	-0,3135	-0,0929	-0,8246
CD3 <sup>+</sup> , %	0,0702	0,0154	-0,0279
CD4 <sup>+</sup> , абс	1,3930	-0,9614	0,0926
CD16 <sup>+</sup> , абс	1,4983	3,6773	-0,3919
CD19 <sup>+</sup> , %	0,0098	-0,0291	-0,1251
CD19 <sup>+</sup> , абс	-1,2502	0,1153	5,5192
Лейкоциты/CD3 <sup>+</sup>	-0,0144	0,1182	-0,0959
HLA-DR/CD19 <sup>+</sup>	-0,1828	-0,0123	0,0077
IgG, г/л	0,0112	0,0704	0,0016
IgA/CD19 <sup>+</sup>	-0,0022	0,0019	0,0020
Константа	-4,2060	-3,6458	5,9155

рование и дискриминантный анализ) выявили самые значимые параметры, а именно – показатели относительного содержания Т- и В-лимфоцитов, абсолютные количества лимфоцитов, Т-, CD4<sup>+</sup>-клеток, NK- и В-лимфоцитов, содержание IgG и IgA, уровень относительного синтеза IgA и ряд коэффициентов. Следовательно, изменение этих параметров способствует возникновению и прогрессированию онкологического заболевания.

### Литература

1. Волкова М.А. Клиническая онкогематология / М.А. Волкова, – М.: Медицина, 2001.
2. Воробьев А.И. Руководство по гематологии. В 3 т. / А.И. Воробьев, – М.: Ньюдиамед, 2002. – Т. 1.
3. Земсков А.М. Дополнительные методы оценки иммунного статуса / А.М. Земсков, В.М. Земсков, – Клини. лаб. диагностика. – 1994. – № 3. – С. 34-35.
4. Ковалева Л.Г. Острые лейкозы / Л.Г. Ковалева, – М.: Медицина, 1990.
5. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect / S.S. Faray [et al.] // Blood.- 2002.- №100.- p. 1935-1947.
6. Lanier L.L. Natural killer cell receptor signaling / L.L. Lanier // Current Opinion in Immunology.- 2003.- №15.- P. 308-314.
7. Lian R.H. Murine natural killer cell progenitors and their requirements for development / R.H. Lian, V. Kumar // Immunology.- 2002.- №14.- p. 453-460.