

В.Т. Манчук, О.В. Смирнова

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ НЕЙРОСЕТЕВОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И ДИСКРИМИНАНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ НЕЛИМФОБЛASTНЫМ 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 НК-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. Красноярска 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 клинико-лабораторное обследование. Для верификации диагноза всем больным при поступлении проводилась стернальная пункция с количественным и процентным определением пупов клеток и цитохимическим определением ферментов.

Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции с использованием моно克лональных антител к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, HLA-DR (ТОО «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 таблицах и использованы в рисунках. Для решения задач системного анализа использовали нейросетевой 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-

МАНЧУК Валерий Тимофеевич – д.м.н., чл.-кор. РАМН, проф., НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН; **СМИРНОВА Ольга Валентиновна** – д.м.н., в.н.с. НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, ovsmirnova71@mail.ru.

Таблица 1

Показатели клеточного и гуморального звеньев иммунитета у больных на разных стадиях ОНЛЛ (Ме, С₂₅-С₇₅)

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

Примечание. p₁ – статистически достоверные различия с показателями контрольной группы; p₂ – -/- с показателями больных на стадии первичной атаки; p₃ – --/– 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⁺, 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⁺, 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 (λ Уилкса=0,265, p<0,001). Величины и статистическая достоверность параметров Уилкской и частичной λ представлены в табл. 2. Наиболее значимыми параметрами дискриминантной модели являются процентный уровень

Таблица 2

Величины и статистическая достоверность параметров Уилкской и частичной λ для иммунологических параметров дискриминантной модели больных ОНЛЛ и контрольной группы

Показатели	λ Уилкса	Частичная λ	P
Лимфоциты, %	0,300	0,882	0,000269
Лимфоциты, абс	0,291	0,908	0,002207
CD3 ⁺ , %	0,327	0,810	0,000001
CD4 ⁺ , абс	0,288	0,919	0,005066
CD16 ⁺ , абс	0,307	0,862	0,000050
CD19 ⁺ , %	0,296	0,893	0,000682
CD19 ⁺ , абс	0,286	0,926	0,008760
Лейкоциты/CD3 ⁺	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⁺-лимфоцитов, концентрация IgG в крови, индекс активации Т-лимфоцитов и абсолютное содержание CD16⁺-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⁺-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 относительного синтеза. В группе больных с «правильной» ремиссией единственным параметром иммунного статуса, изменившим уровень достоверности с контрольными показателями, явился уровень относительного синтеза IgA. В группе больных с «правильным» рецидивом такими показателями были относительные уровни CD19⁺-HLA-DR⁺-клеток, лейко-В-клеточный коэффициент и индекс относительного синтеза IgG.

Заключение. 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 ⁺ , %	0,0702	0,0154	-0,0279
CD4 ⁺ , абс	1,3930	-0,9614	0,0926
CD16 ⁺ , абс	1,4983	3,6773	-0,3919
CD19 ⁺ , %	0,0098	-0,0291	-0,1251
CD19 ⁺ , абс	-1,2502	0,1153	5,5192
Лейкоциты/CD3 ⁺	-0,0144	0,1182	-0,0959
HLA-DR/CD19 ⁺	-0,1828	-0,0123	0,0077
IgG, г/л	0,0112	0,0704	0,0016
IgA/CD19 ⁺	-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⁺-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, – Клин. 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.