

Influence of extracorporeal photopheresis on lymphocytes subpopulations in peripheral blood of patients with chronic graft-versus-host disease

Yulia O. Davydova, Vera A. Vasilieva, Nikolay M. Kapranov, Ekaterina D. Mikhaltsova, Irina V. Galtseva, Tatyana V. Gaponova, Larisa A. Kuzmina, Elena N. Parovichnikova, Valery G. Savchenko
 National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

Contact: Dr. Yulia O. Davydova
 E-mail: davydova.y@blood.ru

Introduction

Currently, extracorporeal photopheresis (ECP) occupies a confident position in the therapy of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), as a part of the treatment in acute and chronic graft-versus-host disease (cGVHD). ECP has an immunomodulatory effect consisting in elimination of immune cells involved in the cGVHD pathogenesis. However, the effect of ECP on the patients' lymphocytes remains unclear.

The aim of present study was to determine absolute counts of T-helper (Th) cells, cytotoxic T-lymphocytes (CTL), B- and NK-cells in peripheral blood of chronic GVHD (cGVHD) patients undergoing ECP.

Patients and methods

Blood samples of ten patients with hematological malignancies after allo-HSCT with an extensive form of cGVHD (6 women, 4 males, median age of 45 years old) were subject to examination. The study of lymphocyte subpopulations was carried out before the first ECP procedure, and after four ECP procedures (a one-month course). Absolute counts of T-helper cells (CD3+/CD4+), cytotoxic T cells (CD3+/CD8+), B cells (CD19+) and NK cells (CD3-/CD56+) were determined by flow cytometry (BD FACS Canto II). Wilcoxon signed-rank test was used to determine differences in lymphocytes subpopulations before and after ECP procedures. Statistical processing of data was carried out using GraphPad Prism.

Table 1.

Lymphocyte subpopulation	Reference values, $\times 10^9/l$	Medium \pm SEM (minimum..maximum) before ECP procedures $\times 10^9/l$ n=10	Medium \pm SEM (minimum..maximum) after 4 ECP procedures $\times 10^9/l$ n=10	p
Th	0.576-1.336	0.820 \pm 0.207 0.351..2.593	0.623 \pm 0.978 0.255..1.354	0.131
CTL	0.372-0.974	1.609 \pm 0.222 0.267..2.639	0.976 \pm 0.169 0.175..2.031	0.002*
B-cells	0.111-0.376	0.341 \pm 0.130 0.023..1.396	0.326 \pm 0.091 0.026..0.901	0.275
NK-cells	0.123-0.369	0.477 \pm 0.099 0.128..1.234	0.383 \pm 0.080 0.165..1.009	0.131

Results

Before performing ECP, Th count was above the reference range in 4 patients (40%), CTL count in 9 (90%), B-cell count, in 4 (40%) and NK-cell count, in 6 cases (60%). After the 4 ECP procedures, 3 out of 4 patients reached normal Th-cell counts. Six out of 8 patients showed reduction of CTL and approached the reference interval. Numbers of NK-cells reduced and reached normal values in 5 patients. Reduction of the B cell amounts did not occur. Upon analysis of absolute number of different lymphocyte subpopulations, a statistically significant decrease after ECP courses was observed for CTLs (Table. 1), regardless of CTL number before ECP.

Conclusion

It was shown in our study that, after 4 ECP procedures, there was a significant decrease in absolute amounts of cytotoxic T-cells, whereas no significant change in T-helper cells, B-cells, or NK-cells was observed. It is necessary to continue research in larger cohorts of patients.

Keywords

Extracorporeal photopheresis, graft-versus-host disease, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, lymphocytes subpopulations, flow cytometry.

Влияние экстракорпорального фотофереза на основные субпопуляции лимфоцитов крови у пациентов с хронической реакцией трансплантат против хозяина

Юлия О. Давыдова, Вера А. Васильева, Николай М. Капранов, Екатерина Д. Михальцова, Ирина В. Гальцева, Татьяна В. Гапонова, Лариса А. Кузьмина, Елена Н. Паровичникова, Валерий Г. Савченко

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, РФ

Введение

В настоящее время экстракорпоральный фотоферез (ЭКФФ) занимает уверенные позиции в терапии пациентов после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК), в рамках лечения острой и хронической реакции трансплантат против хозяина (РТПХ). ЭКФФ обладает иммуномодулирующим воздействием, способствуя элиминации иммунных клеток, участвующих в патогенезе хронической РТПХ. Однако остается не до конца изученным влияние ЭКФФ на субпопуляции лимфоцитов крови пациента. Цель работы состояла в изучении изменений абсолютного количества Т-хэлперов, цитотоксических Т-клеток, В-клеток и NK-клеток у пациентов с хронической РТПХ, проходящих терапию ЭКФФ.

Пациенты и методы

Проведено исследование образцов крови 10 пациентов с гемобластомами после алло-ТГСК с экстенсивной формой хронической РТПХ (6 женщин, 4 мужчины, медиана возраста 45 лет). Исследование субпопуляций лимфоцитов проводилось в периферической крови пациентов до первой процедуры ЭКФФ и через месяц терапии после 4 процедур ЭКФФ.

Определяли абсолютное количество Т-хэлперов (CD3+CD4+), цитотоксических Т-клеток (CD3+CD8+), В-клеток (CD19+) и NK-клеток (CD3-CD56+) на точном цитометре BD FACS Canto II. Отличия между

связанными выборками определялись с помощью критерия Вилкоксона. Статистическая обработка данных проводилась с помощью GraphPad Prism.

Результаты

До выполнения ЭКФФ количество Т-хэлперов выше референсного интервала наблюдалось у 4 пациентов (40%), цитотоксических Т-клеток – у 9 (90%), В-клеток – у 4 (40%) и NK-клеток – у 6 (60%). После проведения 4-х процедур ЭКФФ снижение количества Т-хэлперов до значений референсного интервала произошло у 3 из 4 пациентов с увеличенным их количеством, цитотоксических Т-клеток – у 6 из 8, NK-клеток – у 5 из 6, снижения количества В-клеток не происходило. При анализе абсолютного количества различных субпопуляций лимфоцитов статистически значимое снижение после курсов ЭКФФ наблюдалось только среди цитотоксических Т-клеток (Табл. 1) не зависимо от того, было ли их количество выше верхней границы референсного интервала до ЭКФФ.

Выводы

В данном исследовании показано, что после проведения 4-х процедур ЭКФФ происходило достоверное снижение абсолютного количества цитотоксических т-клеток, тогда как значимого изменения Т-хэлперов, В-клеток и NK-клеток не происходило. Необходимо продолжить исследование на большей когорте пациентов

Таблица 1.

Субпопуляция лимфоцитов	Референсный интервал, $\times 10^9/\text{л}$	Значения до ЭКФФ: среднее \pm стандартная ошибка среднего, минимум..максимум, $\times 10^9/\text{л}$ n=10	Значения после 4х процедур ЭКФФ: среднее \pm стандартная ошибка среднего минимум..максимум, $\times 10^9/\text{л}$ n=10	p
Т-хэлперы	0,576-1,336	0,820 \pm 0,207 0,351..2,593	0,623 \pm 0,978 0,255..1,354	0,131
Цитотоксические Т-клетки	0,372-0,974	1,609 \pm 0,222 0,267..2,639	0,976 \pm 0,169 0,175..2,031	0,002*
В-клетки	0,111-0,376	0,341 \pm 0,130 0,023..1,396	0,326 \pm 0,091 0,026..0,901	0,275
НК-клетки	0,123-0,369	0,477 \pm 0,099 0,128..1,234	0,383 \pm 0,080 0,165..1,009	0,131

Ключевые слова

Экстракорпоральный фотоферез, реакция трансплантат против хозяина, трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, субпопуляции лимфоцитов, проточная цитометрия.