
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Tratamentul diferențiat patogenetic și risc adaptat la pacienții cu anemie aplastică

Doctorand **COSMINA IOANA GAVRILUȚ (TOMESCU)**

Conducător de doctorat Prof.dr. **LJUBOMIR PETROV**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Etiologia și epidemiologia anemiei aplastice	17
1.1. Anemia aplastică constituțională și dobândită	17
1.2. Epidemiologie	18
1.3. Rolul factorilor etiologici	18
1.3.1. Benzenul și toxinele din mediu	18
1.3.2. Radiațiile	19
1.3.3. Medicamente	19
1.3.4. Virusuri	21
1.3.5. Sarcina	22
2. Patogenia anemiei aplastice	23
2.1. Autoimunitatea	23
2.2. Autoantigene	26
2.3. Hematopoeza	26
2.4. Scurtarea telomerilor	27
2.5. Citogenetica	28
2.6. Clonalitatea în anemia aplastică	28
2.7. Rolul celulelor stem mezenchimale	29
2.8. Alte mecanisme patogenetice	30
3. Prezentarea clinică, diagnosticul și tratamentul anemiei aplastice	31
3.1. Prezentare clinică, diagnostic	31
3.2. Tratamentul anemiei aplastice	32
3.2.1. Tratamentul anemiei aplastice severe	32
3.2.1.1. Transplantul medular	32
3.2.1.2. Imunosupresia	35
3.2.2. Tratamentul suportiv	39
3.2.2.1. Transfuziile de masă eritrocitară și trombocitară	39
3.2.2.2. Antibioticele	39
3.2.2.3. Factori de creștere	40
3.2.3. Tratamentul anemiei aplastice non-severe (moderate)	40
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	45
2. Metodologie generală	47
3. Studiul 1 - CX3CR1 și celularitatea biopsiei osteo-medulare, corelații cu parametrii hematologici, evoluția și supraviețuirea pacienților cu anemie aplastică.	
3.1. Introducere	49
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	50
3.3. Material și metodă	50
3.4. Rezultate	51
3.5. Discuții	56
3.6. Concluzii	58

4. Studiul 2 - Megakariocitele în anemia aplastică. Semnificația clinico-hematologică.	59
4.1. Introducere	59
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	59
4.3. Material și metodă	59
4.4. Rezultate	60
4.5. Discuții	68
4.6. Concluzii	69
5. Studiul 3. IL23R pe biopsia osteomedulară a pacienților cu anemie aplastică. Semnificația prognostică.	71
5.1. Introducere	71
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	72
5.3. Material și metodă	72
5.4. Rezultate	72
5.5. Discuții	78
5.6. Concluzii	80
6. Studiu 4. Factori de risc pentru supraviețuirea pacienților cu anemie aplastică.	81
6.1. Introducere	81
6.2. Ipoteza de lucru/obiective	81
6.3. Material și metodă	82
6.4. Rezultate	82
6.5. Discuții	88
6.6. Concluzii	90
7. Studiul 5. Factori predictivi ai răspunsului la tratament la pacienții cu anemie aplastică	91
7.1. Introducere	91
7.2. Ipoteza de lucru/obiective	91
7.3. Material și metodă	91
7.4. Rezultate	92
7.5. Discuții	99
7.6. Concluzii	101
8. Discuții generale	103
9. Concluzii generale	105
10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	107
REFERINȚE	109

Cuvinte cheie: anemia aplastică, imunohistochimie, CX3CR1, receptorul interleukinei 23, supraviețuire, tratament.

Introducere

Anemia aplastică, o formă rară de insuficiență medulară, este o afecțiune cu potențial evolutiv grav și risc crescut de mortalitate. Deși primul caz a fost descris în anul 1888 de către Paul Elrich, nici până în prezent mecanismele etiopatogenetice ale bolii nu sunt complet elucidate. Boala poate îmbrăca două forme și anume forma congenitală și forma dobândită, diferențierea dintre cele 2 forme fiind esențială pentru alegerea tratamentului adecvat. Această diferențiere este cu atât mai grea cu cât forma congenitală poate să nu fie acompaniată de manifestări somatice, și poate să apară chiar și la vârsta adultului.

Anemia aplastică dobândită poate fi secundară expunerii la anumiți factori fizici, chimici, biologici, însă la un caz dat este foarte greu de afirmat relația directă de cauzalitate. În anemia aplastică idiopatică există anomalii cantitative și calitative ale celulei stem hematopoetice, ale precursorilor, ale micromediului, ale telomerilor, ale imunității, adică anomalii ale oricărui element cheie care intervine în hematopoeză.

În fața unui pacient cu pancitopenie, cu manifestări clinice de cele mai multe ori severe (febră, infecții grave până la septicemii, hemoragii), după stabilirea diagnosticului, care presupune efectuarea medulogramei, a biopsiei osteo-medulare, următoarea problemă este cea a tratamentului. Tratamentul anemiei aplastice este determinat de severitatea bolii, de vârsta pacientului, prezența comorbidităților, existența donatorului HLA identic înrudit, neînrudit, dar și de resursele financiare. Odată cu introducerea tratamentului imunosupresor în anemia aplastică, supraviețuirea acestor pacienți s-a ameliorat semnificativ. Tratamentul standard la pacienții neeligibili pentru transplantul allogen de celule stem, este reprezentat de ATG în asociere cu CSA, cu o rată de răspuns ce variază între 50-70%. După tratament pot să apară recăderi ale bolii, care pot fi tratabile, sau poate să apară evoluția clonală a bolii.

Continuu există încercări de a îmbunătăți rata de răspuns la tratamentul imunosupresor, prin introducerea unor noi molecule imunosupresoare ce acționează pe diverse etape din mecanismul patogenetic al bolii. Din păcate însă, aceste noi molecule nu au determinat până în prezent îmbunătățirea semnificativă a ratei de răspuns la tratament sau scăderea mortalității pacienților.

Contribuția personală

Datorită incidenței scăzute a bolii, am fost nevoiți să gândim un studiu retrospectiv, întins pe o perioadă mai mare de timp (respectiv 14 ani). Pacienții incluși în studiu au fost internați la Clinica de Hematologie din cadrul IOCN. Parametrii urmăriți la diagnosticul bolii au fost: vârsta, sexul, forma (idiopatică sau secundară), severitatea, hemoleucograma completă cu număr de granulocite, limfocite, trombocite, hemoglobină, reticulocite, LDH, VSH la 1 h, VSH la 2 h. Diagnosticul de anemie aplastică s-a pus pe baza medulogramei și a biopsiei osteo-medulare (BOM), care s-au efectuat la internare. Severitatea anemiei aplastice a fost definită după criteriile lui Camitta et al, și anume: anemie aplastică severă definită ca: celularitate medulară < 25% și două din următoarele 3 criterii: număr absolut de reticulocite < 20000/μl, număr granulocite < 500/μl și număr trombocite < 20000/μl, anemia aplastică foarte severă definită ca număr granulocite < 200/μl, în rest celelalte condiții ca și la forma severă, anemie aplastică de severitate medie definită ca 2 din următoarele 3 condiții: număr granulocite < 1000/μl, număr trombocite < 50000/μl, hemoglobina < 10g/dl, număr absolut de reticulocite < 60000/μl.

Biopsiile osteomedulare au fost fixate în 10% formalină neutră pentru 24 de ore, decalcificate în acid etilendiaminotetraacetic (EDTA) sarea disodică (Osteodec) timp de 3 ore, incluse în parafină și secționate la 4 micrometri. Au fost folosiți pentru imunohistochimie anticorpi specifici fiecărui studiu, conform design-ului studiului și anticorpi "comuni" utilizați în toate studiile: anticorpi monoclonali de șoarece CD45RO (clona RTU-UCH-1 Leica diluția 1:100), CD4 (clona NCL-L-CD4 368 Novocastra diluție 1:40), CD8 (clona C8/144B DakoCytomation diluție 1:150), au fost evaluate celulele nucleate medulare pentru colorare membranară. CD45RO a fost evaluat atât pe limfocitele medulare, cât și pe toate celulele nucleate. Celularitatea medulară a fost exprimată ca procent, iar megakariocitele ca prezente sau absente (acolo unde nu s-au putut identifica pe baza caracteristicilor histopatologice). Ca și parametri privind evoluția pacienților, am urmărit: infecțiile, hemoragiile majore, evoluția clonală, HPN, SMD, aplazia, durata de la diagnostic până la începerea tratamentului. Răspunsul la tratament a fost apreciat ca răspuns complet (RC), răspuns parțial (PR), lipsă de răspuns, recădere sau dependență de CSA. Supraviețuirea a fost apreciată la 2 luni, 6 ani și 10 ani.

Lucrarea de față cuprinde 5 studii. Primele 3 studii sunt efectuate pe un număr de 40 de pacienți și 10 cazuri martor, investighează aspecte legate de patogeniza bolii, respectiv receptorul unei citokine (CX3CR1) cu rol în procesele autoimune, rolul megakariocitelor și prezența unei subpopulații limfocitare Th17. Ultimele 2 studii sunt efectuate pe un număr de 80 de pacienți și investighează factorii de risc privind supraviețuirea pacienților, respectiv factorii predictivi ai răspunsului la tratament.

Studiu 1. CX3CR1 și celularitatea biopsiei osteo-medulare, corelații cu parametrul hematologici, evoluția și supraviețuirea pacienților cu anemie aplastică

Introducere

CX3CR1 este unicul receptor al citokinei fractalkină și poate media direct chemotaxia și adeziunea monocitelor și a celulelor T. Interacțiunea fractalkinei cu receptorul său mediază recrutarea leucocitelor în procese autoimune și inflamatorii. Studiile privind implicarea CX3CR1 în anemia aplastică sunt abia la început.

Obiective

Scopul studiului nostru a fost identificarea proporției în care este exprimat receptorul CX3CR1 pe celulele medulare, influența CX3CR1 și a celularității biopsiei osteo-medulare asupra parametrilor de diagnostic la pacienții cu anemie aplastică, asupra evoluției bolii și asupra supraviețuirii acestor pacienți.

Material și metoda

Am folosit anticorpi monoclonali CD4,CD8,CD45RO și anticorpi policlonali de iepure CX3CR1 (clona ab8125 Abcam, diluție 1:100). Biopsiile osteo-medulare au fost reanalizate, am luat în considerare atât intensitatea cât și procentul celulelor medulare pozitive pentru CX3CR1, iar celularitatea medulară a fost exprimată ca procent. Am împărțit pacienții în 4 grupuri, în funcție de mediana celularității BOM, care este de 15% și de intensitatea CX3CR1.

Rezultate

Diferențe semnificative statistic între cazurile de anemie aplastică și martori au fost constatate în ceea ce privește procentul celulelor CD8 pozitive (10% comparativ cu 3%), pozitivitatea CD45RO pe limfocite (15% comparativ cu 3%), pozitivitatea CD45RO pe toate celulele nucleate (80% comparativ cu 60%) și pozitivitatea CX3CR1 (80% comparativ cu 65%). Celularitatea biopsiei osteo-medulare <15% se întâlnește la 41,6% din cazuri, iar peste 15% la 58,3% din cazuri. La cazurile cu celularitate BOM <15%, se constată absența megakariocitelor la 86,7% din cazuri, iar la cazurile cu celularitate BOM >15%, se constată absența megakariocitelor la 33,3% și prezența lor la 66,6%. La cazurile cu celularitate BOM<15% se constată CX3CR1 intens la 64,7% din cazuri, iar la cazurile cu BOM>15% se constată CX3CR1 slab la 82,6%.

Diferențe între cele 4 grupuri am observat în ceea ce privește vârsta, hemoglobina, prezența megakariocitelor și supraviețuirea. Intensitatea CX3CR1 s-a asociat semnificativ statistic cu celularitatea medulară (cazurile cu CX3CR1 intens au avut celularitatea medulară semnificativ mai mică decât cazurile cu CX3CR1 slab).

Grupul B (CX3CR1 intens și BOM<15%) prezintă cea mai mare mortalitate la: 2 luni, cu o probabilitate de 8,6 ori mai mare decât celelalte grupuri, la 6 ani cu o probabilitate de 13,5 ori mai mare decât celelalte grupuri, dar și la 10 ani cu o probabilitate de 14,9 ori mai mare decât celelalte grupuri.

Studiul 2. Megakariocitele în anemia aplastică. Semnificația clinico-hematologică.

Introducere

Megakariocitele sunt componente ale măduvei hematoformatoare din care se vor forma, prin fragmentarea citoplasmei, trombocitele. Megakariocitele provin din celulele stem hematopoetice, prin intermediul progenitorilor și precursorilor megakariocitari. Dar megakariocitele nu sunt doar o etapă intermediară în formarea trombocitelor, ele au un rol activ în menținerea homeostaziei celulelor stem, dar și în recuperarea lor după agresiuni.

Obiective

În acest studiu am urmărit influența megakariocitelor și a receptorului CX3CR1 asupra parametrilor de diagnostic, de evoluție și de supraviețuire la pacienții cu anemie aplastică. Considerăm oportună evaluarea aceluiași parametri ca și în studiul 1, dar de data aceasta prin prisma influenței megakariocitelor și a receptorului CX3CR1.

Material și metoda

Am împărțit lotul de pacienți în funcție de intensitatea CX3CR1 și prezența megakariocitelor în 4 grupuri și anume: grupul 1: CX3CR1 intens și megakariocite prezente, grupul 2: CX3CR1 intens și megakariocite absente, grupul 3: CX3CR1 slab și megakariocite absente și grupul 4: CX3CR1 slab și megakariocite prezente.

Rezultate

Grupul 2 cuprinde pacienții cu CX3CR1 intens și megakariocite absente, și se caracterizează prin valorile cele mai mici ale granulocitelor, limfocitelor, trombocitelor, reticulocitelor, CD45RO pe limfocite, valori mici ale CD4, CD8, celularitate BOM. Numărul de limfocite la diagnostic a fost semnificativ mai mic la pacienții cu megakariocite absente, comparativ cu pacienții cu megakariocite prezente. Numărul de trombocite la diagnostic, a fost semnificativ mai mic la pacienții cu megakariocite absente, comparativ cu pacienții cu megakariocite prezente. Nivelul hemoglobinei la diagnostic a fost semnificativ mai mic în grupul pacienților cu CX3CR1 slab și megakariocite absente (efect combinat). Celularitatea medulară a fost semnificativ mai mică la pacienții cu megakariocite absente și la pacienții cu CX3CR1 intens. Urmărind evoluția pacienților, hemoragiile majore sunt diferite semnificativ statistic între cele 4 grupuri. Grupul 2 are supraviețuirea semnificativ mai mică atât la 2 luni cât și la 6 ani și 10 ani comparativ cu celelalte 3 grupuri.

Studiu 3. IL23R pe biopsia osteomedulară a pacienților cu anemie aplastică. Semnificația prognostică.

Introducere

Rolul celulelor T CD4+ în anemia aplastică nu este pe deplin caracterizat. Celulele CD4+ includ subpopulațiile: Th1: celule T CD4+ care secretă IFN- γ ; Th2: celule T CD4+ ce secretă IL4, IL5, IL13; Tregs: celule T reglatorii și Th17: celule T CD4+ ce secretă IL17, toate având un rol major în autoimunitate. Celulele Th17 au un rol important în bolile infecțioase, bolile autoimune, bolile inflamatorii. Subpopulația Th17 se caracterizează prin prezența receptorului IL23R.

Obiective

Scopul studiului a fost de a identifica prevalența IL23R pe măduva osoasă a pacienților

cu anemie aplastică, precum și corelațiile între nivelul acestui receptor și diferiți parametri hematologici de la debutul bolii, din evoluția acesteia și din supraviețuirea pacienților.

Material și metodă

Ca și imunohistochimie, am utilizat în plus anticorpi policlonali de oaie împotriva IL23-receptor (capătul amino-terminal, clona ab53656 Abcam, diluție 1:300). Am împărțit pacienții în 2 loturi: lotul 1 cuprinde pacienții cu IL23R<40, lotul 2 cuprinde pacienții cu IL23R>40.

Rezultate

Am evaluat prezența IL23R la cazurile de anemie aplastică și la martori, și am obținut mediana de 6,1 la martori și mediana de 27,25 la cazurile de anemie aplastică. Pe lotul pacienților cu anemie aplastică, am obținut un cut-off la IL23R de 40. Diferențe semnificative statistic între loturile de pacienți cu IL23R<40 și IL23R>40 am obținut, dintre parametrii de la diagnostic, doar în ceea ce privește prezența/absența megakariocitelor, astfel din cei 29 pacienți din primul lot, 18 aveau megakariocite absente, iar din cei 11 pacienți din lotul 2, 8 erau cu megakariocite prezente. Diferențe semnificative statistic între lotul de pacienți cu IL23R<40 și IL23R>40 am obținut, dintre parametrii privind evoluția, în ceea ce privește hemoragiile, infecțiile, și obținerea RC. Toți pacienții decedați sub 2 luni, aparțineau lotului cu IL23R<40, toți pacienții decedați până la 6 ani, aparțineau lotului cu IL23R<40, un singur pacient a decedat din lotul cu IL23R>40 în decurs de 10 ani.

Studiu 4. Factori de risc pentru supraviețuirea pacienților cu anemie aplastică.

Introducere

Majoritatea studiilor care investighează durata de supraviețuire în anemia aplastică, descriu influența globulinei antitumorale de cal comparativ cu cea de iepure, uneori în asociere cu factori de creștere granulocitari sau evaluează supraviețuirea după transplantul de celule stem și doar ca obiective secundare analizează influența altor factori de prognostic.

Obiective

Obiectivul studiului nostru este de a analiza factorii de risc implicați în supraviețuirea pacienților cu anemie aplastică dobândită, axându-ne în principal pe cei legați de pacient și boală

Material și metodă

Toți pacienții au fost urmăriți cel puțin timp de 2 luni, 80% dintre pacienți au fost urmăriți cel puțin timp de 6 ani, iar 60% dintre pacienți au fost urmăriți cel puțin 10 ani.

Rezultate

Decesul precoce (<2 luni) a survenit la 11 pacienți (13.75%). Analiza univariată arată că severitatea bolii (HR 12.55, 95% CI 3.32-47.47, p<0.001), numărul de limfocite, hemoragiile majore, infecțiile, au fost asociate semnificativ statistic cu mortalitatea la 2 luni. Am analizat separat parametrii incluși în severitatea bolii, astfel numărul de granulocite și numărul de trombocite fiind semnificative statistic, iar celularitatea medulară și numărul de reticulocite nefiind semnificative statistic între pacienții decedați și supraviețuitori.

Până la 6 ani au decedat 26 pacienți (32.5%), iar 20% dintre pacienți au fost pierduți din studio. Analiza univariată arată ca vârstă, severitatea, numărul de limfocite, hemoglobin, VSH la 1 h, VSH la 2 ore, hemoragiile majore, , obținerea unui răspuns parțial sau complet, au fost asociate semnificativ statistic cu mortalitatea la 6 ani. Analizând separat parametrii incluși în severitatea anemiei aplastice, am obținut numărul de granulocite ca fiind semnificativ statistic.

Valorile de cut-off obținute pentru supraviețuirea până la 2 luni sunt: granulocite>355/ μ l, trombocite>9500/ μ l, limfocite>575/ μ l. Valorile de cut-off obținute pentru supraviețuirea până la 6 ani sunt: vârstă <40 ani, granulocite>570/ μ l, limfocite>1350/ μ l, hemoglobină>6g/dl, VSH<60mm/h, VSH<103mm/2h.

Studiu 5. Factori predictivi ai răspunsului la tratament la pacienții cu anemie aplastică

Introducere

Tratamentul imunosupresor este cheia strategiei terapeutice la pacienții cu anemie aplastică. Standardul regimului imunosupresor este reprezentat de ATG și CSA. În Europa preparatul de ATG nu mai este disponibil, alternativa fiind ATG policlonală obținută de la iepure (ATGr), dar care are rata de răspuns mai scăzută.

Obiective

În acest studiu am dorit să evaluăm răspunsul pacienților cu anemie aplastică la tratament precum și factorii predictivi pentru răspunsul la 3 luni, 6 luni și 1 an.

Material și metoda

Am împărțit pacienții în 2 loturi, și anume lotul 1: pacienții care au urmat tratament cu ATG și lotul 2: pacienții care au urmat tratament cu CSA.

Rezultate

Tratamentul cu ATG s-a administrat la pacienții mai tineri (vârsta medie de 32 ani), comparativ cu pacienții care au urmat CSA (vârsta medie de 55 de ani). Răspunsul la 3 luni a fost apreciat ca răspuns parțial la 11 pacienți dintre cei tratați cu ATG (35,5%) și la 11 pacienți dintre cei tratați cu CSA (37,9%), răspuns complet la 5 pacienți dintre cei tratați cu ATG (16,1%) și la 1 pacient tratat cu CSA (3,4%), rata de răspuns am obținut la 16 pacienți dintre cei tratați cu ATG (51,6%) și la 12 pacienți (41,1%) dintre cei tratați cu CSA.

Răspunsul la 6 luni a fost apreciat ca răspuns parțial la 17 pacienți dintre cei tratați cu ATG (54,8%) și la 9 pacienți (32,1%) dintre cei tratați cu CSA, răspuns la 4 pacienți (12,9%) dintre cei tratați cu ATG și la 3 pacienți (10,7%) dintre cei tratați cu CSA, rata de răspuns la 6 luni am obținut la 21 pacienți (67.7%) dintre cei tratați cu ATG și la 12 pacienți (42,9%) dintre cei tratați cu CSA.

Răspunsul la 1 an a fost evaluat ca răspuns parțial la 10 pacienți (32,3%) dintre cei tratați cu ATG și la 5 pacienți (17,9%) dintre cei tratați cu CSA, răspuns la 10 pacienți (32,2%) dintre cei tratați cu ATG și la 6 pacienți (21,4%) dintre cei tratați cu CSA, rata de răspuns am obținut la 20 pacienți (64,5%) dintre cei tratați cu ATG și la 11 pacienți (39,3%) dintre cei tratați cu CSA.

În analiza multivariată, tratamentul cu ATG rămâne principala variabilă care determină răspunsul la 1 an, având o probabilitate de 7.16 ori mai mare de a obține răspuns față de pacienții tratați cu CSA.

Concluzii generale

1. Pozitivitatea CX3CR1 diferă semnificativ statistic între lotul pacienților cu anemie aplastică și lotul martor.

2. Pozitivitatea IL23R este mult crescută la pacienții cu anemie aplastică comparativ cu martorii.

3. Măduva osoasă a pacienților cu anemie aplastică exprimă o pozitivitate crescută pentru CD8+ și CD45RO+, posibil prin acțiunea CX3CR1.

4. Intensitatea CX3CR1 se asociază semnificativ statistic cu celularitatea medulară în anemia aplastică.

5. Celularitatea BOM se corelează cu vârsta, cu nivelul hemoglobinei la diagnostic și cu prezența megakariocitelor.

6. Numărul de limfocite și de trombocite la diagnostic se corelează cu prezența megakariocitelor, nivelul hemoglobinei la diagnostic se corelează cu efectul cumulat al prezenței megakariocitelor și intensității CX3CR1.

7. Am găsit o relație reciprocă între nivelul IL23R>40 și prezența megakariocitelor pe BOM (la diagnostic),

8. Recomandăm administrarea analogilor de receptori de trombopoetină ca tratament de linia 1 în anemia aplastică, alături de tratamentul imunosupresor.

9. Tratamentul cu anticorpi anti CX3CR1 ar putea fi util în anemia aplastică, mai ales la tineri, cu celularitatea BOM<15%.

10. Există corelație între frecvența scăzută a infecțiilor și hemoragiilor severe pe perioada evoluției bolii și nivelul IL23R.

11. Există corelație între obținerea RC la pacienții cu anemie aplastică și nivelul IL23R>40.

12. Supraviețuirea este mult mai bună la 2 luni, 6 ani, 10 ani la pacienții cu nivelul IL23R>40.

13. IL23R este un factor de prognostic foarte fidel pentru evoluția și supraviețuirea pacienților cu anemie aplastică.

14. Alți factori de prognostic pentru supraviețuirea pacienților cu anemie aplastică la 2 luni, 6 ani și 10 ani sunt: CX3CR1 intens, BOM<15%, megakariocite absente.

15. Decesul până la 2 luni la pacienții cu anemie aplastică depinde de severitatea bolii, de numărul de limfocite la diagnostic, de infecțiile și hemoragiile majore.

16. Valorile de cut-off obținute pentru supraviețuirea până la 2 luni sunt: granulocite>355/μl, trombocite>9500/μl, limfocite>575/μl

17. Decesul până la 6 ani depinde de vârsta pacientului, de severitatea bolii, de numărul de limfocite la diagnostic, de infecțiile și hemoragiile majore, de obținerea unui răspuns la tratament.

18. Valorile de cut-off obținute pentru supraviețuirea până la 6 ani sunt: vârsta <40 ani, granulocite>570/μl, limfocite>1350/μl, hemoglobină>6g/dl, VSH<60mm/h, VSH<103mm/2h.

19. Decesul până la 10 ani depinde de vârsta pacientului, de severitatea bolii, de

durata până la începerea tratamentului, de tipul de tratament administrat (ATG sau CSA), de hemoragiile majore.

20. Valoarea de cut-off pentru supraviețuirea până la 10 ani, avem pentru vârsta pacienților < 40 ani.

21-Rata de răspuns diferă semnificativ statistic la 6 luni și 12 luni la pacienții ce au urmat tratament cu ATG comparativ cu pacienții ce au urmat tratament cu CSA.

22-Factorii de prognostic pentru răspunsul la 6 luni sunt: severitatea bolii, durata până la începerea tratamentului, numărul de granulocite și numărul de trombocite de la diagnostic.

23-Factorii de prognostic pentru răspunsul la 12 luni sunt: severitatea bolii, durata până la începerea tratamentului, nivelul hemoglobinei, numărul de limfocite și numărul de trombocite de la diagnostic.

24-Tratamentul cu ATG rămâne factorul principal în regresia multiliniară, pentru răspunsul la tratament atât la 6 luni cât și la 12 luni.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Originalitatea tezei constă în identificarea prevalenței CX3CR1 pe măduva osoasă a pacienților cu anemie aplastică, a pozitivității și a intensității CX3CR1, găsirea unei corelații între intensitatea receptorului CX3CR1 și celularitatea BOM.

Megakariocitele, încep să fie percepute ca elemente active în homeostazia medulară, datorită feed-back-ului cu celulele stem, am evidențiat mai mulți parametri hematologici de la diagnostic, în inter-relație cu megakariocitele, precum și parametri de evoluție și supraviețuire.

O altă contribuție a tezei este identificarea unui nou factor de prognostic privind supraviețuirea pacienților cu anemie aplastică, și anume nivelul IL23R, pornind de la o subpopulație limfocitară, Th17.

Am evaluat diverși parametri și am identificat factorii care intervin în răspunsul la tratament, respectiv în decesul pacienților cu anemie aplastică, pe lotul de pacienți studiați.

THE SUMMARY OF THE PhD THESIS

Pathogenetic differentiated treatment and risk adapted to aplastic anaemia patients

PhD Student **COSMINA IOANA GAVRILUȚ (TOMESCU)**

PhD Supervisor Prof.dr. **LJUBOMIR PETROV**

Contents

INTRODUCTION	13
CURRENT STATUS OF KNOWLEDGE	15
1. Aetiology and epidemiology of aplastic anaemia	17
1.1. Constitutional and acquired aplastic anaemia	17
1.2. Epidemiology	18
1.3. Role of aetiology factors	18
1.3.1. Benzene and other organic solvents	18
1.3.2. Ionizing radiation	19
1.3.3. Medication	19
1.3.4. Viruses	21
1.3.5. Pregnancy	22
2. Pathogenesis of aplastic anaemia	23
2.1. Autoimmunity	23
2.2. Autoantigens	26
2.3. Haematopoiesis	26
2.4. Shortening of telomeres	27
2.5. Cytogenetics	28
2.6. Clonality in aplastic anaemia	28
2.7. Role of mesenchymal stem cells	29
2.8. Other pathogenetic mechanisms	30
3. Clinical presentation, diagnosis and treatment of plastic anaemia	31
3.1. Clinical presentation, diagnosis	31
3.2. Treatment of aplastic anaemia	32
3.2.1. Treatment of severe aplastic anaemia	32
3.2.1.1. Bone marrow transplantation	32
3.2.1.2. Immunosuppression	35
3.2.2. Supportive treatment	39
3.2.2.1. Erythrocytes and platelets mass transfusions	39
3.2.2.2. Antibiotics	39
3.2.2.3. Growth factors	40
3.2.3. Treatment of non-severe aplastic anaemia (moderate)	40
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Hypothesis/objectives	45
2. Methods	47
3. Study 1 - CX3CR1 and the cellularity of osteo-medullar biopsy, correlations with haematological parameters, evolution and survival of aplastic anaemia patients.	
3.1. Introduction	49
3.2. Hypothesis/ objectives	50
3.3. Material and methods	50
3.4. Results	51
3.5. Discussion	56

3.6. Conclusions	58
4. Study 2 - Megakaryocytes in aplastic anaemia. Clinical-haematological significance.	
4.1. Introduction	59
4.2. Hypothesis/objectives	59
4.3. Material and methods	59
4.4. Results	60
4.5. Discussion	68
4.6. Conclusions	69
5. Study 3- IL23R on osteo-medullar biopsy of aplastic anaemia patients. Prognosis significance.	
5.1. Introduction	71
5.2. Hypothesis/objectives	72
5.3. Material and methods	72
5.4. Results	72
5.5. Discussion	78
5.6. Conclusions	80
6. Study 4- Risk factors for the survival of aplastic anaemia.	
6.1. Introduction	81
6.2. Hypothesis/objectives	81
6.3. Material and methods	82
6.4. Results	82
6.5. Discussion	88
6.6. Conclusions	90
7. Study 5- Predictive factors of the response to treatment for patients with aplastic anaemia	
7.1. Introduction	91
7.2. Hypothesis/objectives	91
7.3. Material and methods	91
7.4. Results	92
7.5. Discussion	99
7.6. Conclusions	101
8. General discussion	103
9. General conclusions	105
10. The originality and innovative contributions of the thesis	107
REFERENCES	109

Key words: aplastic anemia, imunohistochemistry, CX3CR1, interleukin 23 receptor, survival, treatment

Introduction

Aplastic anaemia, a rare form of bone marrow insufficiency, is a potentially serious disease, with increased risk of death. Although the first case was described in the year 1888 by Paul Elrich, the etiopathogenetic mechanisms of the disease are not completely clarified. The disease may take two forms, that is the congenital form and the acquired form, the differentiation between the 2 forms being essential for the selection of adequate treatment. This differentiation is as difficult as the congenital form may not be accompanied by somatic manifestations, and may occur even at the adult age.

The aplastic anaemia may be secondary to the exposure to certain physical, chemical, biological factors, but at a certain case, it is very difficult to affirm the direct causality condition. In the idiopathic aplastic anaemia there are quantitative and qualitative abnormalities of hematopoietic stem cell, of predecessors, of micro-environment, of telomeres, of immunity, that is abnormalities of any key element which intervenes in haematopoiesis.

In which regards a patient with pancytopenia, with severe clinical manifestations (fever, serious infections, such as sepsis, haemorrhage), after establishing the diagnosis, which supposes the performance of medullogram, osteo-medullar biopsy, the following question is the treatment. The treatment of aplastic anaemia is determined by the seriousness of the disease, patient's age, presence of comorbidities, the existence of identical related, unrelated HLA donor, but also by the financial resources. In the same time with the introduction of immunosuppressant treatment in aplastic anaemia, the survival of these patients was significantly improved. The standard treatment at non-eligible patients for allogenic stem cells transplant is represented by ATG in association with CSA, with a response rate between 50-70%. After the treatment disease relapse may occur; this may be treated, or may appear the cloning evolution of the disease.

There are continuous attempts to improve the response rate to the immunosuppressant treatment, by introduction of new immunosuppressant molecules which act on various phases from the pathogenetic mechanism of the disease. Unfortunately, however, these new molecules did not determine, until now, the significant improvement of the response rate to treatment or the decrease of patients' mortality.

Personal contribution

Due to the low incidence of the disease, we had to think a retrospective study, on a longer period of time (respectively 14 years). All patients included in this study was diagnosed with aplastic anemia in Hematology Clinic Cluj from IOCN. At presentation we evaluated: age, gender, type (idiopathic or secondary), severity, complete blood count, erythrocyte sedimentation rate at 1 hour and 2 hours, lactate dehydrogenase.

The diagnosis of aplastic anemia was put on the basis of bone-marrow biopsy (BOM). In all patients bone-marrow biopsy was performed, subsequently fixed in paraffin and analyzed / reviewed. Exclusion criteria: inadequate bone-marrow biopsies, patients lost during follow-up.

The severity of aplastic anemia was defined by the criteria of Camitta et al, namely: severe aplastic anemia defined as: bone marrow cellularity <25% and two of the following 2 criteria: the absolute number of reticulocytes <60.000/ μ l, number of granulocytes <500/ μ l and number of platelets < 20.000/ μ l, very severe aplastic anemia defined as the number granulocytes <200/ μ l, otherwise the other conditions as in case of severe form, aplastic anemia medium severity defined as 2 of the following three conditions: number of granulocytes < 1500/ μ l, number of platelets <50.000 / μ l, hemoglobin <10g / dl.

Bone marrow biopsies were fixed in 10% formalin for 24 hours, decalcified in EDTA for 3 hours, embedded in paraffin and sectioned at 4 microns. CD45RO (clone RTU-UCH-1 Leica dilution 1: 100), CD4 (clone NCL-L-CD4 Novocastra 368 dilution 1:40), CD8 (clone C8 / 144B DakoCytmatation dilution 1: 150), bone marrow nucleated cells were evaluated for staining of membrane. CD45Ro was evaluated both on medullary lymphocytes, and on all nucleated cells. Marrow cellularity was expressed as a percentage and megakaryocytes as present or absent (where they could not be identified based on the histopathology characteristics). Regarding the evolution of patients, we follow: the infections, major bleeding, clonal evolution, HPN, SMD, aplasia, the duration until the start of treatment. The response of the treatment was evaluated as complete response, partial response, the lack of response, relapse, Csa dependence. The survival was appreciated to: 2 months, 6 years and 10 years.

The herein work contains 5 studies. The first 3 studies are performed on a number of 40 patients and 10 control cases, investigates aspects related to the disease pathogenesis, respectively the receptor of cytokines (CX3CR1) with role in the autoimmune processes, the role of megakaryocytes and the presence of lymphocytes subpopulation Th17. The last 2 studies are performed on a number of 80 patients and investigate the risk factors regarding the survival of patients, respectively predictive factors of the response to treatment.

Study 1-CX3CR1 and the cellularity of osteo-medullar biopsy, correlations with haematological parameters, evolution and survival of aplastic anaemia patients

Introduction

CX3CR1 is the unique receptor of fractalkine cytokine and can directly mediate chemotaxis and adhesion of monocytes and T cells. Fractalkine interaction with its receptor mediates leukocyte recruitment in autoimmune and inflammatory processes. Studies on CX3CR1 involvement in aplastic anemia are only in their early beginning.

Hypothesis/objectives

The objectives of the study was to identify the proportion in which is expressed the receptor CX3CR1 on bone marrow of aplastic anaemia patients, the influence of CX3CR1 and the cellularity of osteo-medullar biopsy, on the various haematological parameters from the start of the disease, from its evolution and from the survival of patients.

Material and methods

Monoclonal antibody CD4,CD8,CD45RO, rabbit liquid polyclonal antibody to CX3CR1 (clone ab8125 Abcam, dilution 1: 100), were used. Bone marrow nucleated cells were evaluated for staining of membrane. CX3CR1 was evaluated using a score system that takes into account both the intensity and the percentage of positive cells and marrow cellularity was expressed as a percentage. We divided the group of patients depending on the cellularity of bone-marrow biopsy median which is 15%, and the intensity of CX3CR1, in 4 groups.

Results

Statistically significant differences between the groups of patients with aplastic anemia and the control group, were found in terms of the percentage of CD8 positive cells (10% compared to 3%), CD45RO positive on lymphocytes (15% versus 3%), CD45RO positive on all nucleated cells (80% versus 60%) and CX3CR1 positive cells (80% versus 65%). The cellularity of bone-marrow biopsy <15% occurs in 41.6% of cases, and >15% in 58.3% of cases. In cases with bone-marrow cellularity <15%, there is the absence of megakaryocytes in 86.7% of cases, and in cases with bone-marrow cellularity > 15%, there is the absence of megakaryocytes in 33.3% to and their presence in 66.6%. In cases with bone-marrow cellularity <15%, there is the intense CX3CR1 in 64,7% of cases, and in cases with bone-marrow cellularity > 15%, there is the weak CX3CR1 in 82,6% of cases.

The differences between the 4 groups we notice in terms of age, hemoglobin, presence of megakaryocytes and survival. The intensity of CX3CR1 is statistically significantly associated with bone marrow cellularity in aplastic anaemia (patients with CX3CR1 intense have a significantly lower bone marrow cellularity than patients with CX3CR1 weak).

In the group B: bone marrow cellularity <15% and CX3CR1 intense, we notice the big mortality at: 2 months, with a probability of 8.6 times higher compare to the others groups, at 6 years, with a probability of 13.5 times higher compare to the others groups and at 10 years, with a probability of 14.9 times higher compare to the others groups.

Study 2-Megakaryocytes in aplastic anaemia. Clinical-haematological significance.

Introduction

Megakaryocytes are components of the hematopoietic bone marrow of which platelets will result by cytoplasm fragmentation. Megakaryocytes come from hematopoietic stem cells through megakaryocyte progenitors and precursors. But megakaryocytes are not just an intermediate step in platelet formation, they have an

active role in maintaining stem cell homeostasis and in their recovery after aggressions.

Hypothesis/objectives

In this study, we aimed to evaluate the significance of CX3CR1 and megakaryocytes in aplastic anemia and their relationship with hematological parameters in diagnosis, from its evolution and from the survival of patients. We considered timely evaluation of the same parameters used in the study 1, but this time in the light of the influence of megakaryocytes and CX3CR1.

Material and methods

We divided the group of patients depending on the intensity of CX3CR1 and presence of megakaryocytes in 4 groups, namely: group 1: CX3CR1 intense and megakaryocytes present, group 2: CX3CR1 intense and megakaryocytes absent, group 3: CX3CR1 weak and megakaryocytes absent and group 4: CX3CR1 weak and megakaryocytes present.

Results

Group 2 includes patients with intense CX3CR1 and absent megakaryocytes, and is characterized by the lowest values of granulocytes, lymphocytes, platelets, reticulocytes and the higher value of positive CD45RO on lymphocytes and small values of CD4, CD8, bone-marrow cellularity. Lymphocyte count at diagnosis was significantly lower in patients with megakaryocytes absent compared with patients with megakaryocytes present. Platelet count at diagnosis was significantly lower in patients with megakaryocytes absent compared with patients with megakaryocytes present. Hemoglobin levels at diagnosis was significantly lower in the group of patients with CX3CR1 weak and megakaryocytes absent. Marrow cellularity was significantly lower in patients with absent megakaryocytes and in patients with intense CX3CR1. Regarding the evolution, major bleeding were statistically significant different between the 4 groups. In the group 2 we notice the small survival at 2 months, 6 years and 10 years comparative with the others 3 groups.

Study 3-IL23R on osteo-medullar biopsy of aplastic anaemia patients. Prognosis significance.

Introduction

Role of cells T CD4+ in aplastic anaemia is not fully characterized. The CD4+ cells include the subpopulations: Th1: cells T CD4+ which secrete IFN- γ ; Th2: T CD4+ cells which secrete IL4, IL5, IL13; Tregs: T regulatory cells and Th17: cells T CD4+ which secretes IL17, all having a major autoimmunity role. The Th17 cells have an important role in infectious diseases, autoimmune diseases, and inflammatory diseases. The Th17 subpopulation is characterized by the presence of IL23R receptor.

Hypothesis/objectives

The purpose of the study was to identify the prevalence of IL23R on bone marrow of plastic anaemia patients, as well as the correlations between the level of this receptor and various haematological parameters from the start of the disease, from its evolution and from the survival of patients.

Material and methods

As immunohistochemistry, we used in addition sheep polyclonal antibodies against IL23-receptor (amino-terminal head, clone ab53656 Abcam, dilution 1:300). We

divided the patients into 2 lots: lot 1 contains patients with IL23R<40, lot 2 contains patients with IL23R>40.

Results

We evaluated the presence IL23R at cases of aplastic anaemia and at control cases, and we obtained the median of 6,1 at control and median of 27,25 at aplastic anaemia cases. On the lot of patients with aplastic anaemia, we obtained a cut-off to IL23R of 40. The statistically significant differences between the lots of patients with IL23R<40 and IL23R>40 we obtained, among the diagnosis parameters, only in which concerns the presence/absence of megakaryocytes, thus, out of the 29 patients from the first lot, 18 had absent megakaryocytes, and out of the 11 patients from the lot 2, 8 were with megakaryocytes present. The significant statistical differences between the lot of patients with IL23R<40 and IL23R>40 we obtained, of the parameters regarding the evolution, in which concerns the haemorrhages, infections and obtaining RC. All the deceased patients under 2 months belonged to the lot with IL23R<40, all the deceased patients until 6 years belonged to the lot of IL23R<40, only one patient died from the lot with IL23R>40 during 10 years.

Study 4-Risk factors for the survival of aplastic anaemia.

Introduction

Most studies investigating the survival time in aplastic anemia describe the influence of horse antithymocyte globulin compared to the rabbit one, sometimes in combination with granulocyte growth factors or assess survival after stem cell transplantation and only as secondary endpoints they analyze the influence of other prognostic factors.

Hypothesis/objectives

The objective of our study was to analyze the risk factors involved in the survival of patients with acquired aplastic anemia, focusing mainly on those related to patient and disease.

Material and methods

All patients were followed for at least 2 months, 80% of patients were followed for at least 6 years and 60% of patients were followed for at least 10 years.

Results

Early death (<2 months) occurred in 11 patients (13.75%). Univariate analysis shows that the severity of the disease (HR 12.55, 95% - CI 3.32-47.47, p <0.001), the number of lymphocytes, major bleeding, infections were significantly associated with mortality in two months. We separately analyzed the parameters included in the severity of the disease, so the number of granulocytes and platelet count were statistically significant while bone marrow cellularity and the number of reticulocytes was not statistically significant between patients who died and survivors.

In 6 years, 26 patients died (32.5%) and 20% of patients were lost to study. univariate analysis showed that age, disease severity, the number of lymphocytes, hemoglobin, ESR at 1 hour, ESR at 2 hours, major bleeding, infections, obtaining a partial or complete response were significantly associated with mortality at 6 years. Separately analyzing the parameters included in the severity of the disease, we obtained the number of granulocytes as statistically significant.

The cut-off values obtained for survival up to 2 months are: granulocytes >

355/ μ l, platelets > 9500/ μ l, lymphocytes > 575/ μ l. The cut-off values obtained for the survival up to 6 years are: the age <40 years, granulocytes>570/ μ l, lymphocytes>1350/ μ l, haemoglobin>6g/dl, VSH<60mm/h, VSH<103mm/2h.

Study 5-Predictive factors of the response to treatment for patients with aplastic anaemia

Introduction

The immunosuppressant treatment is the key of therapeutic strategy for aplastic anaemia patients. The standard of immunosuppressant regime is represented by ATG and CSA. In Europe, the preparation ATGh is not available anymore, the alternative being polyclonal ATG obtained from rabbit (ATGr), but which has a lower response rate.

Hypothesis/objectives

In this study, we wished to assess the response of aplastic anaemia patients at the treatment, as well as the predictive factors for the response at 3 months, 6 months and 1 year.

Material and methods

We divided the patients into 2 lots, which is lot 1: the patients who underwent ATG treatment and lot 2: patients who underwent CSA treatment.

Results

The ATG treatment was administered at younger patients (average age of 32 years), in comparison with the patients who underwent CSA (average age of 55 years). The answer at 3 months was assessed as partial response at 11 patients from those treated with ATG (35,5%) and at 11 patients from those treated with CSA (37,9%), complete response at 5 patients of those treated with ATG (16,1%) and at 1 patient treated with CSA (3,4%), the response rate obtained at 16 patients among those treated with ATG (51,6%) and at 12 patients (41,1%) among those treated with CSA.

The answer at 6 months was assessed as partial response at 17 patients among those treated with ATG (54,8%) and at 9 patients (32,1%) among those treated with CSA, complete response at 4 patients (12,9%) among those treated with ATG and at 3 patients (10,7%) among those treated with CSA, the response rate at 6 months we obtained at 21 patients (67.7%) among those treated with ATG and at 12 patients (42,9%) among those treated with CSA.

The answer at 1 year was assessed as partial response at 10 patients (32,3%) among those treated with ATG and at 5 patients (17,9%) among those treated with CSA, complete response at 10 patients (32,2%) among those treated with ATG and at 6 patients (21,4%) among those treated with CSA, the response rate obtained at 20 patients (64,5%) among those treated with ATG and at 11 patients (39,3%) among those treated with CSA.

In the multivariate analysis, the ATG treatment remains the main variable determining the answer at 1 year, with a probability of 7.16 times higher to obtain response related to the patients treated with CSA.

General conclusions

1. Positivity CX3CR1 significantly differs from a statistical point of view between the lot of patients with aplastic anaemia and the lot of control .

2. Positivity IL23R is much increased at aplastic anaemia patients in comparison to the controls.

3. The bone marrow of patients with aplastic anaemia expresses an increased positivity for CD8+ and CD45RO+, possibly through the action of CX3CR1.

4. The intensity of CX3CR1 is statistically significantly associated with bone marrow cellularity in aplastic anaemia.

5. The BOM cellularity is associated with the level of haemoglobin at diagnosis and with the presence of megakaryocytes.

6. The number of lymphocytes and platelets at diagnosis is correlated with the presence of megakaryocytes, the level of haemoglobin at diagnosis is correlated to the cumulated effect of the presence of megakaryocytes and intensity of CX3CR1.

7. We identified a mutual relation between the level of IL23R>40 and the presence of megakaryocytes on BOM (at diagnosis),

8. We recommend the administration of receptors analogue of thrombopoietin as treatment of line 1 in aplastic anaemia, next to the immunosuppressor treatment.

9. The treatment with antibodies anti CX3CR1 might be useful in aplastic anaemia, especially at young people, with cellularity BOM<15%.

10. There is a correlation between the decreased frequency of infections and severe haemorrhages during the evolution of diseases and the level of IL23R.

11. There is a correlation between obtaining RC at patients with aplastic anaemia and the level of IL23R>40.

12. The survival is much better at 2 months, 6 years, 10 years at patients with level IL23R>40.

13. IL23R is a faithful prognosis factor for the evolution and survival of patients with aplastic anaemia.

14. Other prognosis factor for the survival of patients with aplastic anaemia at 2 months, 6 years and 10 years are: CX3CR1 intense , BOM<15%, absent megakaryocytes.

15. The death up to 2 months at patients with aplastic anaemia depends on the severity of the disease, number of lymphocytes at diagnosis, major infections and haemorrhages.

16. The cut-off values obtained for survival up to 2 months are: granulocytes > 355/ μ l, platelets > 9500/ μ l, lymphocytes > 575/ μ l

17. The death up to 6 years depends on the patient's age, seriousness of the disease, number of lymphocytes at diagnosis, major infections and haemorrhages, obtaining a response to treatment.

18. The cut-off values obtained for the survival up to 6 years are: the age <40 years, granulocytes>570/ μ l, lymphocytes>1350/ μ l, haemoglobin>6g/dl, VSH<60mm/h, VSH<103mm/2h.

19. The death up to 10 years depends of the patient's age, the disease severity, duration up to the initiation of treatment, type of treatment administered (ATG or CSA), of major haemorrhages.

20. The cut-off value for the survival up to 10 years, we have for the patients' age < 40 years.

21- The response rate statistically significantly differs at 6 months and 12 months at patients undergoing treatment with ATG in comparison to the patients who underwent CSA treatment.

22- The prognosis factors for the 6 months answer are: severity of the disease, duration until the initiation of treatment, number of granulocytes and number of platelets from diagnosis.

23- The prognosis factors for the 12 months answer are: severity of the disease, duration until the initiation of treatment, level of haemoglobin, number of lymphocytes and number of platelets from diagnosis.

24- The ATG treatment remains the main factor in multiline regression for the answer to treatment at 6 months, as well as at 12 months.

The originality and innovative contributions of the thesis

The thesis originality is represented by the identification of prevalence of CX3CR1 on the bone marrow of patients with aplastic anaemia, of positivity and intensity of CX3CR1, identification of a correlation between the intensity of receptor CX3CR1 and cellularity of BOM.

Megakaryocytes start to be perceived as active elements in the bone marrow homeostasis, due to the feedback with stem cells, we emphasized several haematology parameters from the diagnosis, in inter-relation to megakaryocytes, as well as the evolution and survival parameters.

Another contribution of the thesis is the identification of a new prognosis factor regarding the survival of aplastic anaemia patients, that is the level IL23R, starting from the lymphocytes subpopulation, Th17.

We assessed various parameters and we identified the factors which intervene in the response to treatment, respectively in the death of patients with aplastic anaemia, on the lot of studied patients.

