



**Аристова Татьяна Андреевна**

**МИЕЛОИДНЫЕ СУПРЕССОРЫ В ДИНАМИКЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ  
АУТОЛОГИЧНЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ  
МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ**

3.2.7. Иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

**Новосибирск - 2024**

**Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)**

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,  
профессор, член-корреспондент РАН

**Черных Елена Рэмовна**

**Официальные оппоненты:**

**Скворцова Наталия Валерьевна**, доктор медицинских наук, доцент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России), (г. Новосибирск).

**Повешенко Ольга Владимировна** доктор медицинских наук, доцент, заведующая лабораторией клеточных технологий Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН), (г. Новосибирск).

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М.Горбачевой (НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М.Горбачевой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России), (г. Санкт-Петербург).

Защита состоится «        » 2024 г. в                    на заседании диссертационного совета

Д 001.001.XX (24.1.184.01) в НИИФКИ по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул.Ядринцевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте <http://niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>

Автореферат разослан «    »                    2024 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,**

кандидат биологических наук

**Облеухова И.А.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность и обоснование исследования

Миелоидные супрессоры (МС) представляют собой незрелые формы клеток миелоидного происхождения, которые играют важную роль в регуляции иммунного ответа, и вовлечены в патогенез многих заболеваний, связанных с хроническим воспалением и активацией миелопоэза [Salminen A., 2018]. У человека охарактеризованы две основные субпопуляции МС – моноцитарные МС (М-МС) с фенотипом CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>low</sup> и гранулоцитарные или полиморфноядерные МС (Г-МС) с фенотипом CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD15<sup>+</sup>(CD66b<sup>+</sup>) HLA-DR<sup>low</sup> [Gabrilovich D., 2012]. Кроме того, выделяют третий тип – МС ранних стадий дифференцировки (Р-МС) с фенотипом Lin<sup>–</sup> HLA-DR<sup>–</sup>CD33<sup>+</sup> [Bronte V., 2016]

МС проявляют ингибирующие действие в отношении клеток врождённого и приобретённого иммунитета *in vitro* и *in vivo* с наиболее выраженной супрессорной активностью в отношении Т-клеток [Gabrilovich D.I. 2017]. Супрессорный эффект МС опосредуется с вовлечением различных механизмов, включая деплецию в клеточном микроокружении L-аргинина и L-триптофана (вследствие экспрессии аргиназы-1 (Arg-1) и индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO)), генерацию свободных радикалов кислорода, секрецию трансформирующего фактора роста бета (TGF- $\beta$ ), интерлейкина 10 (IL-10), экспрессию ингибиторных чек-пойнт молекул (например, PD-L1), индукцию регуляторных Т-клеток (T-reg) и др. [Veglia F., 2021; Sunakawa M., 2017]. При этом каждая из субпопуляций МС может использовать различные механизмы ингибирования Т-клеточного ответа.

Повышенное количество циркулирующих МС описано при различных солидных опухолях и рассматривается в качестве биомаркера прогрессии и резистентности к терапии [Lim H.X., 2020; Mengos A.E., 2019; Diaz-Montero, 2009]. Экспансия М-МС продемонстрирована также при различных гемобластозах, включая острые лейкозы, лимфопролиферативные и миелолипролиферативные заболевания [Palumbo G., 2019]. Тем не менее, несмотря на многочисленные исследования, роль МС при гемобластозах остаётся недостаточно исследованной и до конца неясной. С одной стороны, повышенное количество циркулирующих МС является негативным прогностическим маркером при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) [Zarobkiewicz M., 2020], множественной миеломе [Lee S.-E., 2019], диффузной В-крупноклеточной лимфоме (ДБККЛ) и лимфоме Ходжкина [Azzaoui I., 2016; Marini O., 2016]. С другой стороны, МС могут играть позитивную иммуnoreгуляторную роль при аллогенных трансплантациях гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) в силу способности подавлять острую реакцию трансплантат против хозяина (РТПХ) [Lv M., 2015; Demosthenous C., 2021].

Множественная миелома (ММ) представляет В-клеточную опухоль с экспансией в костном мозге (КМ) моноклональных плазматических клеток и аккумуляцией в периферической крови (ПК) дисфункциональных моноклональных иммуноглобулинов. ММ составляет около 1% всех опухолей и, несмотря на достижения в области терапии, остаётся одной из неизлечимых злокачественных опухолей [Картик Р., 2018]. МС костномозгового микроокружения играют важную роль в патогенезе ММ, в том числе участвуют в формировании ниш для плазматических клеток, что может способствовать «уходу» опухолевых клеток от иммунного надзора и приводить к развитию химиорезистентности опухоли [De Veirman, 2019]. Показано, что Г-МС поддерживают стволовые свойства миеломных клеток при ММ и стимулируют рост опухолевых клеток в экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo* [De Veirman K., 2019]. Тем не менее, данные о содержании различных субпопуляций МС в периферической крови при ММ у человека малочисленны и противоречивы, так же, как и не до конца ясна патогенетическая и прогностическая значимость МС на различных этапах лечения ММ.

Несмотря на внедрение в практику лечения ММ новых противоопухолевых препаратов направленного действия, высокодозная химиотерапия (ВДХТ) с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) остаётся необходимым этапом терапии ММ, обеспечивающим консолидацию достигнутой ремиссии и способствующим увеличению длительности безрецидивной выживаемости у больных ММ. В литературе имеются единичные сообщения, что высокое количество М-МС до проведения ауто-ТГСК ассоциируется с меньшим временем до развития рецидива [Lee S.-E., 2019]. Однако роль МС на посттрансплантационных этапах остаётся практически неизученной. Между тем, МС могут участвовать в регуляции приживления костного мозга и восстановления Т-клеток, которое на этапе выхода из глубокой лимфопении осуществляется за счёт гомеостатической пролиферации Т-клеток памяти, а в более поздние сроки – за счёт вновь образуемых наивных Т-клеток.

Интерес к изучению роли МС на этапах терапии при ММ связан также с тем, что сама патология и проводимая терапия, в том числе используемый для мобилизации ГСК Г-КСФ, могут существенно влиять на МС, меняя их количество и регуляторные свойства. Однако данные о количественных изменениях МС

и особенностях экспрессии ингибиторных молекул на различных этапах ауто-ТГСК, а также их прогностической значимости остаются малоизученными.

#### **Цель исследования:**

Изучить содержание и супрессорный потенциал субпопуляций миелоидных супрессорных клеток периферической крови у больных множественной миеломой в динамике высокодозной химиотерапии и трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток.

#### **Задачи исследования:**

1. Исследовать в ПК содержание субпопуляций МС у больных ММ с учётом стадии заболевания, предлеченности и ответа на терапию.
2. Изучить супрессорный потенциал МС на основе оценки экспрессии ингибиторных молекул (Arg-1, IDO, PD-L1) у больных с различными клиническими вариантами ММ.
3. Исследовать влияние Г-КСФ на содержание МС и экспрессию ингибиторных молекул субпопуляциями периферических МС у больных ММ.
4. Оценить содержание и супрессорный потенциал периферических МС в динамике ауто-ТГСК.
5. Изучить сопряженность между содержанием периферических МС в раннем посттрансплантационном периоде и показателями восстановления кроветворения и выживаемости у пациентов с ММ.

#### **Научная новизна**

Впервые показано, что пациенты с ММ в фазе ремиссии характеризуются изменениями в содержании всех субпопуляций МС – снижением Р-МС и возрастанием Г-МС и М-МС, что наиболее выражено у пациентов с III стадией, терапией бортезомибом и более глубоким ответом на терапию. При этом стадия заболевания является наиболее сильным фактором, достоверно влияющим на уровень Р-МС. Изменения в компартменте МС регистрируются уже у пациентов с впервые выявленной ММ, ослабевают в фазе ремиссии и вновь усиливаются у пациентов с прогрессией заболевания, манифестируя в последнем случае наиболее выраженным снижением доли Р-МС и возрастанием Г-МС в отсутствие достоверных изменений М-МС. Новые данные получены об изменениях в экспрессии ингибиторных молекул, в частности, меньшим содержанием у больных в ремиссии относительного содержания Arg-1<sup>+</sup>М-МС. Снижение экспрессии Arg-1 в М-МС выявляется преимущественно у пациентов с III стадией, более глубоким ответом на терапию и режимом терапии, включающим леналидомид, что в последнем случае сочетается с меньшим содержанием PD-L1<sup>+</sup>М-МС, чем у пациентов после терапии бортезомибом. В то же время пациенты с отсутствием ответа или рецидивом отличаются повышенным содержанием Arg-1<sup>+</sup>М-МС, PD-L1<sup>+</sup>М-МС и Arg-1<sup>+</sup>Р-МС, свидетельствующим о возрастании супрессорного потенциала М-МС и Р-МС на фоне прогрессии заболевания. Показано, что введение Г-КСФ на этапе мобилизации ГСК вызывает увеличение доли всех субпопуляций МС в ПК и восстановление исходно сниженной экспрессии Arg-1 в субпопуляции М-МС, однако эти изменения нивелируются к моменту проведения ВДХТ. Приоритетные данные получены о динамике МС и их супрессорном потенциале после проведения ВДХТ с ауто-ТГСК. Впервые продемонстрировано, что ранняя реконституция на этапе выхода из лейкопении характеризуется транзиторной экспансией М-МС и Г-МС и усилением супрессорного потенциала М-МС (возрастание экспрессии Arg-1 и PD-L1) и Р-МС (усиление экспрессии Arg-1 и IDO). При этом выявлена сопряженность между содержанием МС с показателями восстановления кроветворения и выживаемости. Установлено, что более высокое содержание М-МС в раннем посттрансплантационном периоде коррелирует с меньшей продолжительностью лейкопении, а более высокое относительное содержания всех субпопуляций МС в этот период ассоциировано с более высокими показателями безрецидивной выживаемости.

#### **Теоретическая и практическая значимость**

Схожие по направленности изменения в содержании субпопуляций МС у пациентов с впервые выявленной ММ и больных в фазе ремиссии свидетельствуют о том, что снижение Р-МС и возрастание М-МС и Г-МС не являются следствием терапии и обусловлены наличием патологического процесса. Обнаруженные различия в структуре субпопуляций МС между группами пациентов с впервые выявленной ММ, ремиссией и прогрессией расширяют представления об особенностях дифференцировки Р-МС в более зрелые Г-МС и М-МС на различных этапах течения ММ. Кроме того, проведенные клинко-иммунологические сопоставления позволяют охарактеризовать наиболее значимые факторы, ассоциированные с изменениями в содержании МС и экспрессии супрессорных молекул. Выявление наиболее выраженных изменений в количестве и функциональном фенотипе МС у больных ММ после ауто-ТГСК в раннем посттрансплантационном периоде является аргументом в пользу участия МС в

регуляции энграфтинга и гомеостатической пролиферации, что расширяет представления о механизмах контроля указанных процессов. При этом продемонстрированная корреляционная связь между более высоким содержанием М-МС в раннем посттрансплантационном периоде и меньшей длительностью лейкопении, а также между более высокими уровнями субпопуляций МС в эти сроки и более высокими показателями безрецидивной выживаемости свидетельствует о позитивной роли МС на этапе выхода из лейкопении. Установленный факт повышенной экспрессии Arg-1 и PD-L1 в субпопуляциях М-МС и Р-МС в случае резистентности к индукционной терапии или возникновения рецидива является обоснованием для оценки прогностической значимости указанных молекул в качестве потенциальных биомаркёров прогрессии заболевания. С другой стороны, полученные данные о том, что низкое содержание циркулирующих Р-МС ( $\leq 0,50\%$ ) является независимым и достоверным фактором, ассоциированным с меньшей безрецидивной выживаемостью, расширяет представления о предикторах неблагоприятного прогноза при ауто-ТГСК у больных ММ.

#### **Положения, выносимые на защиту**

Положение 1. Количественные изменения МС (снижение содержания Р-МС и возрастание М-МС и Г-МС) являются характерным признаком ММ, регистрируются на стадии впервые выявленной ММ, ослабевают в фазе ремиссии и вновь усиливаются при прогрессии, сопровождаясь повышением экспрессии ингибиторных молекул (Arg-1 в М-МС и Р-МС и PD-L1 в М-МС).

Положение 2. Относительное количество МС у больных ММ на этапе выхода из лейкопении после ауто-ТГСК является клинически и прогностически значимым фактором восстановления гемопоэза и безрецидивной выживаемости.

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, включая 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ.

#### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», результатов собственных исследований, отраженных в пяти главах, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Материал изложен на 111 страницах машинописного текста, включающего 17 таблиц и 7 рисунков. Работа выполнена на базе лаборатории клеточной иммунотерапии и отделения гематологии с блоком ТКМ клиники иммунопатологии НИИФКИ.

#### **Апробация работы**

Основные положения работы обсуждены на отчетных конференциях аспирантов и ординаторов НИИФКИ в 2020 и 2022 гг., доложены в виде онлайн-доклада на международном конгрессе ВМТ (г. Сеул, 2020 г.), представлены на международном симпозиуме «Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия» (г. Санкт-Петербург, 2020 и 2022 гг.). Апробация диссертации состоялась 21 декабря 2022 г на семинаре клинического отдела ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

#### **Характеристика пациентов, включённых в исследование**

В исследование были включены 112 пациентов (табл.1), проходивших обследование и получавших противоопухолевую терапию в гематологическом отделении с блоком ТКМ клиники иммунопатологии НИИФКИ. Возраст пациентов варьировал от 38 до 72 лет (медиана 55 лет). Диагноз ММ устанавливался согласно критериям международной рабочей группы по изучению множественной миеломы (IMWG 2014), стадия заболевания – согласно клинической классификации Durie-Salmon (1975 г) [Durie B.G.M. 1975]. Вторая стадия заболевания регистрировалась у 32 больных, третья стадия - у 77 больных. В трех случаях в силу недостаточности анамнестических данных установить стадию не представлялось возможным.

**Таблица 1-** Характеристика пациентов

Количество пациентов (n)	112
Возраст, лет (Me, диапазон)	55 (38 –72)
Пол(м/ж)	46/66
Тип парапротеина IgG каппа IgG лямбда IgA каппа IgA лямбда Белок Бенс-Джонса Нетипированный парапротеин или несекретирующая миелома	53 (47%) 18 (16%) 11 (10%) 4 (4%) 16 (14%) 10 (9%)
Стадия по Durie-Salmon (n/%) II III Не установлена	32 (28%) 77 (69%) 3 (3%)
Функция почек (n/%): Стадия А (без снижения СКФ) Стадия Б (со снижением СКФ) Нет данных	91 (81%) 13 (12%) 8 (7%)
Предшествующая терапия (n/%) Бортезомиб-содержащие режимы – 1 линия терапии (PAD, VCD, VD) Леналидомид-содержащие режимы – 2 и более линий терапии (VRD, RD, RCD, монотерапия) Впервые диагностированная ММ, без лечения	75 (67%) 31 (28%) 6 (5%)
Уровень ответа, достигнутого на момент исследования, n/% ПО/ ОХЧО ЧО Прогрессия Не получали терапию	37 (33%) 58 (52%) 11 (10%) 6 (5%)

На момент включения в исследование 106 пациентов получали противоопухолевую терапию. Миеломная нефропатия с нарушением функции почек разной степени выраженности (стадия Б в классификации Durie-Salmon) выявлялась у 91 больного, отсутствие таковой (стадия А) – у 13 пациентов. Информация о почечной функции у 8 пациентов отсутствовала. Полный или очень хороший частичный ответ (ПО или ОХЧО) на момент исследования был достигнут у 37 человек, частичный ответ (ЧО) – у 58 пациентов. Одиннадцать пациентов были в прогрессии ММ после проведенного лечения. По типу парапротеина IgG-каппа вариант был выявлен у 53 пациентов, IgG-лямбда вариант - у 18 пациентов, IgA каппа - у 11 пациентов. У 16 больных диагностировалась миелома Бенс-Джонса, у 4 пациентов - несекретирующая миелома с нарушенным соотношением свободных легких цепей и у 6 пациентов на момент диагностики заболевания типирование парапротеина методом иммунофиксации не проводилось. Количество линий предшествующей противоопухолевой терапии до достижения ответа варьировало от 1-го до 3-х. Первую линию индукции ремиссии проводили бортезомиб-содержащими режимами (PAD, VCD). При рецидиве или резистентности к программам 1-ой линии, в качестве терапии 2-ой и 3-ей линий использовали программы с леналидомидом (VRD, RD, RCD, монотерапия леналидомидом) +/- различные комбинации цитостатических препаратов (DCEP, EDAP). Контрольную группу составили 23 сопоставимых по полу и возрасту донора.

#### **Забор образцов ПК и выделение МНК**

В ходе исследования было получено 230 образцов гепаринизированной ПК от 112 пациентов, включая 6 образцов от пациентов с впервые выявленной ММ, 47 – от пациентов после индукционной противоопухолевой терапии, 11 образцов – от пациентов с прогрессией ММ; 33 образца от пациентов

после мобилизации ГСК, 39 образцов от пациентов с ауто-ТГСК перед началом кондиционирования мелфаланом (200 мг/кв м), 56 образцов на этапе выхода из лейкопении (на 12-16 дни после инфузии ГСК), 21 и 17 образцов от пациентов на этапах 6 и 12 мес. наблюдения после ауто-ТГСК. МНК выделяли стандартным методом центрифугирования цельной гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола-верографина ( $\rho=1,077$ ) и далее сразу же проводили цитометрический анализ. При необходимости проводили лизис эритроцитов раствором VersaLyse («Beckman Coulter», France) в соответствии с инструкцией.

### **Проточная цитофлуориметрия**

Относительное содержание Г-МС ( $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^- \text{CD33}^+ \text{CD66b}^+$ ), М-МС ( $\text{CD14}^+ \text{HLA-DR}^{\text{low/-}}$ ) и Р-МС ( $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^- \text{CD33}^+ \text{CD66b}^-$ ) в МНК периферической крови оценивали методом проточной цитометрии, используя anti-Lineage Cocktail 1 (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56; FITC, «BD Biosciences», USA), anti-CD14 (FITC, «BD Biosciences»), anti-CD33 (PerCP-Cy5.5, «BD Biosciences», USA), anti-CD66b (APC, «BioLegend», USA), anti-HLA-DR (APC-Cy7, «BD Biosciences», USA; PerCP «BD Biosciences») моноклональные антитела. В качестве негативного контроля использовали изотипические антитела, конъюгированные с аналогичными флуорохромами. Исследование проводили в соответствии с рекомендациями Bronte с соавт. [Bronte V., 2016] включая в область гейтирования регион синглетных МНК (лимфоциты и моноциты). Для оценки М-МС из региона МНК анализировали распределение CD14 и HLA-DR молекул и клетки с фенотипом  $\text{CD14}^+ \text{HLA-DR}^{\text{low/-}}$  относили к М-МС. Для оценки Г-МС и Р-МС выделяли клетки среди всех МНК по прямому светорассеянию, в котором исследовали популяцию клеток, не несущих линейные маркеры и молекулу HLA-DR. Далее в области  $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^-$  клеток оценивали распределение клеток по экспрессии CD33 и CD66b молекул. Регион  $\text{CD33}^+ \text{CD66b}^+$  клеток относили к Г-МС, регион  $\text{CD33}^+ \text{CD66b}^-$  к Р-МС. Экспрессию молекулы PD-L1 на МС оценивали, используя PE-меченые anti-PD-L1 моноклональные антитела (BD PharMingen, USA), среди Г-МС ( $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^- \text{CD33}^+ \text{CD66b}^+$ ), Р-МС ( $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^- \text{CD33}^+ \text{CD66b}^-$ ) и М-МС ( $\text{CD14}^+ \text{HLA-DR}^{\text{low/-}}$ ) согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов. Для оценки внутриклеточной экспрессии Arg-1 и IDO МНК инкубировали с флуорохром-конъюгированными моноклональными антителами к Г-МС, Р-МС и М-МС согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов. Далее проводили процедуру пермеабилзации клеток, используя коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабилзации Transcription Factor Buffer Set (Becton Dickinson, США) и PE-конъюгированные анти-Arginase-1- (BD PharMingen, США) или PE-конъюгированные анти-IDO (BD PharMingen, США) моноклональные антитела. Относительное количество МС, экспрессирующих Arg-1, IDO и PD-L1, оценивали среди  $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^- \text{CD33}^+ \text{CD66b}^+$  and  $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^- \text{CD33}^+ \text{CD66b}^-$  клеток, и  $\text{CD14}^+ \text{HLA-DR}^{\text{low/-}}$  клеток. В качестве негативного контроля использовали изотипические антитела. Забор крови и все анализы проводили после получения письменного информированного согласия пациента.

### **Статистический анализ**

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 and GraphPad Prism 8.0 software. Данные в тексте и таблицах представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR). Для оценки значимости различий между группами использовали U-критерий Манна-Уитни. Для оценки значимости различий зависимых выборок использовали критерий знаков для парных выборок. Для выявления зависимости МС и различных клинических параметров у пациентов с ММ были проведены линейный регрессионный анализ и многофакторный дисперсионный анализ. Анализ выживаемости проведен по методу Каплана-Мейера, для оценки значимости использован log-rank-критерий. Оценку влияния различных предикторов на исход ауто-ТГСК проводили с помощью регрессионного анализа Кокса. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Содержание МС в периферической крови больных ММ**

Поскольку ауто-ТГСК в качестве первоочередного этапа включает мобилизацию ГСК, которая проводится у пациентов, достигших ремиссии после индукционной противоопухолевой терапии, отправной точкой исследования стала оценка содержания МС и их супрессорного потенциала у больных в фазе ремиссии. Сравнение больных в фазе ремиссии и здоровых доноров показало (табл.2), что пациенты характеризовались повышенным относительным и абсолютным количеством М-МС, более высоким относительным содержанием Г-МС и меньшим абсолютным количеством.

**Таблица 2** – Субпопуляции МС в периферической крови больных ММ в сравнении со здоровыми донорами

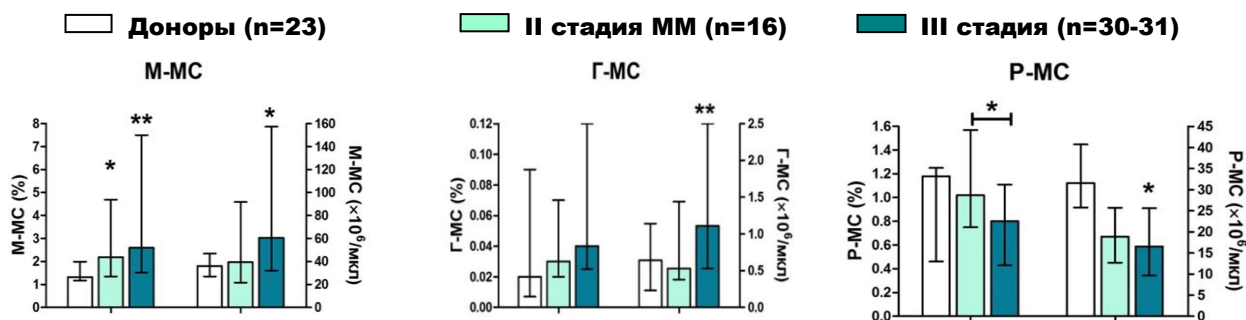
Тип МС	Доноры (n=23)	Больные ММ (n=47)	pU
М-МС (%)	1,32 (1,18-1,99)	2,36 (1,40-5,78)	0,001
Г-МС (%)	0,02(0,007-0,09)	0,03 (0,02-0,10)	0,049
Р-МС (%)	1,18 (0,46-1,25)	0,89 (0,59-1,23)	0,30
МНК ( $\times 10^9/\text{л}$ )	2,04 (1,7-2,3)	1,97 (1,49-2,45)	0,35
М-МС ( $\times 10^6/\text{мл}$ )	36,1(27-47)	57,0(31,4-110,9)	0,0003
Г-МС ( $\times 10^6/\text{мл}$ )	0,25 (0,14-0,72)	0,88 (0,47-1,72)	0,29
Р-МС ( $\times 10^6/\text{мл}$ )	31,6 (25,8-40,7)	18,4 (10,7-25,7)	0,03

Примечание: относительное (%) и абсолютное количество ( $\times 10^9/\text{л}$ ,  $\times 10^6/\text{мл}$ ) Г-МС, М-МС и Р-МС среди МНК периферической крови доноров и пациентов с ММ представлены в виде медианы и диапазона интерквартильных значений (IQR). pU – значимость различий с донорами.

Таким образом, достоверные изменения выявлялись в содержании всех трёх анализируемых субпопуляций МС.

Чтобы выяснить, какие клинические факторы могут влиять на содержание МС, далее провели сравнительный анализ содержания М-МС, Г-МС и Р-МС в группах пациентов, оппозитных по тяжести, режиму проведенной индукционной противоопухолевой терапии и ответу на лечение.

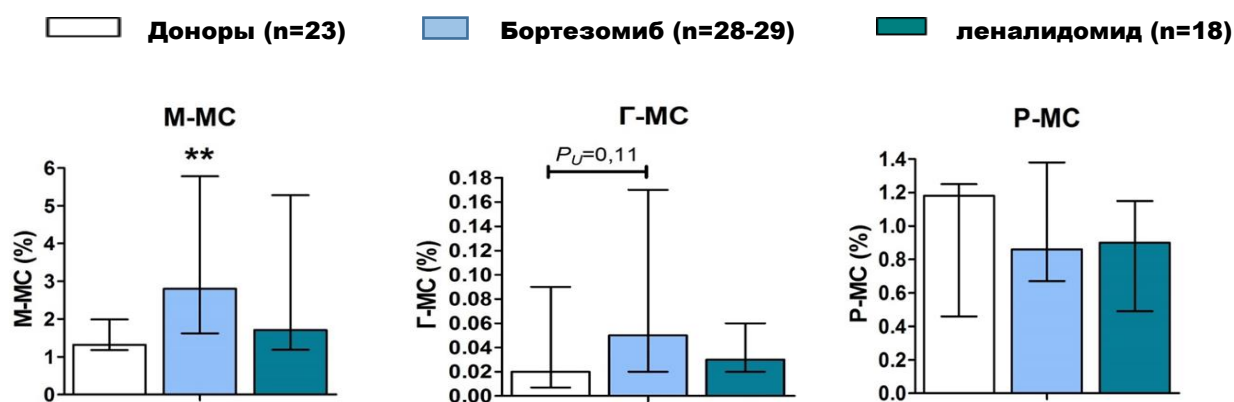
Оценка МС в группах пациентов со II (n=16) и более продвинутой III стадией (n=31) выявила сопряженность между их содержанием и тяжестью заболевания (рис.1). Так, несмотря на то, что повышение относительного количества М-МС (характерное для общей группы больных) выявлялось у пациентов как со II, так и III стадией, возрастание абсолютного количества М-МС (pU=0,046), а также относительного и абсолютного содержания Г-МС (pU=0,05 и pU=0,036, соответственно), и снижение абсолютного количества Р-МС (pU=0,04) выявлялось только у пациентов с III стадией. Кроме того, пациенты с III стадией ММ отличались меньшим относительным количеством Р-МС по сравнению с пациентами II стадии ММ (pU=0,034).



**Рисунок 1.** Содержание субпопуляций МС у пациентов с различной стадией ММ.

Здесь и далее \* - pU <0,05; \*\* - pU <0,01; pU – значимость различий по сравнению с донорами.

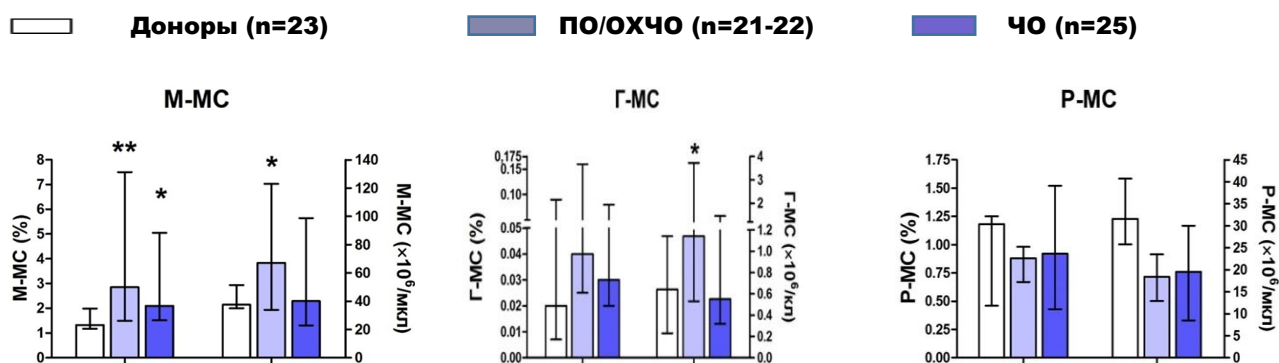
При анализе сопряженности МС с режимом проводимой индукционной терапии сравнили пациентов двух групп (рис.2). Первую группу составили пациенты, получившие режимы терапии, включающие бортезомиб (n=29), вторую – больные, резистентные к бортезомибу и получившие леналидомид-содержащие режимы терапии (n=18). Пациенты указанных групп не различались в распределении по стадиям.



**Рисунок 2.** Содержание МС у больных ММ с различными режимами терапии

Повышенное содержание М-МС и Г-МС (достоверно для М-МС и в виде тренда для Г-МС) было характерно для пациентов с терапией бортезомибом. В то же время в группе пациентов с терапией леналидомидом содержание М-МС и Г-МС не отличалось от показателей доноров. Таким образом, терапия бортезомибом не влияла на содержание М-МС и Г-МС, тогда как леналидомид снижал содержание этих клеток до нормативных значений.

Чтобы выяснить, как количество МС ассоциируется с глубиной ответа, сравнили содержание МС в группах 22 пациентов с полным (ПО) или очень хорошим частичным ответом (ОХЧО) и 25 больных с частичным ответом (ЧО). Относительное содержание М-МС было повышено в обеих группах, однако возрастание абсолютного количества М-МС и Г-МС отмечалось только в группе с ПО/ОХЧО (рис. 3).



**Рисунок 3.** Содержание МС в зависимости от глубины ответа. ПО – полный ответ, ОХЧО – очень хороший частичный ответ, ЧО – частичный ответ.

Представленные выше данные показали, что изменения в содержании МС в фазе ремиссии были наиболее выражены у пациентов с III стадией, терапией бортезомибом и полным или очень хорошим ответом. Однако учитывая гетерогенность анализируемых пациентов одновременно по нескольким параметрам (стадия, режим индукционной терапии, глубина ответа), мы также провели многофакторный дисперсионный анализ (табл.3). Наибольшая сопряженность клинических факторов с содержанием МС выявлялась в отношении субпопуляции Р-МС. Стадия ММ была наиболее значимым фактором, детерминирующим содержание Р-МС в периферической крови.

**Таблица 3 – Влияние клинических факторов на содержания МС у больных ММ**

Фактор	М-МС (%)		Г-МС (%)		Р-МС (%)	
	F	p	F	p	F	p
Стадия ММ	1,09	0,30	1,19	0,28	5,62	0,023
Ответ	0,68	0,41	0,09	0,76	0,58	0,45
Режим ИТ	0,18	0,67	0,61	0,44	0,04	0,84
Стадия ММ/ответ	1,66	0,20	0,68	0,41	5,28	0,027
Стадия ММ/режим ИТ	0,61	0,44	0,11	0,74	4,27	0,046
Ответ режим/ ИТ	0,03	0,85	0,14	0,71	0,66	0,42
Стадия ММ/ ответ/режим ИТ	0,07	0,79	0,35	0,55	0,37	0,55

Примечание: F- сила фактора, p – достоверность.

#### Экспрессия супрессорных молекул в субпопуляциях МС при ММ

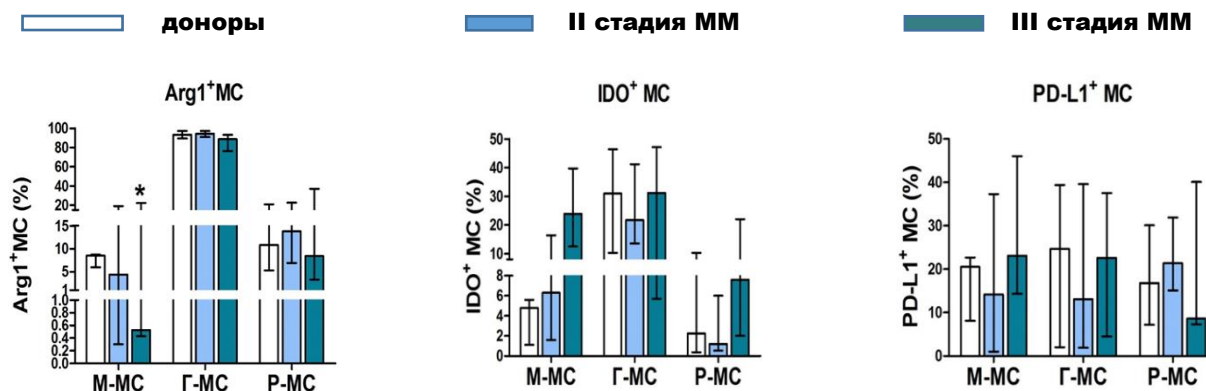
Оценка экспрессии ингибиторных молекул МС у больных в фазе ремиссии показала, что в общей группе больных, достигших ремиссии после индукционной терапии, статистически достоверные изменения в экспрессии исследуемых супрессорных молекул регистрировались исключительно в отношении аргиназы, что проявлялось снижением содержания Arg-1<sup>+</sup> клеток в популяции М-МС в сравнении с донорами (табл. 4).

**Таблица 4 – Экспрессия супрессорных молекул в МС больных ММ**

Субпопуляция МС	Маркер	Доноры (n=8-13)	Больные ММ (n=7-17)	pU
Г-МС	Arg-1	95,6 (89,3-97,2)	91,0 (77,4-94,3)	0,16
	IDO	20,5 (0,28-41,7)	27,0 (10,8-47,1)	0,75
	PD-L1	35,4 (11,9-39,4)	21,9 (3,8-37,5)	0,52
Р-МС	Arg-1	7,5 (5,6-17,6)	11,1 (6,3-34,4)	0,45
	IDO	4,1 (0,29-11,5)	4,1 (1,7-10,3)	0,73
	PD-L1	20,2 (8,7-37,7)	9,7 (7,6-31,9)	0,60
М-МС	Arg-1	9,6 (7,3-29,6)	0,62 (0,26-19,2)	0,045
	IDO	8,0 (2,9-41,9)	12,5 (2,4-23,9)	1,0
	PD-L1	20,5 (8,1-39,7)	21,8 (14,2-56,5)	0,53

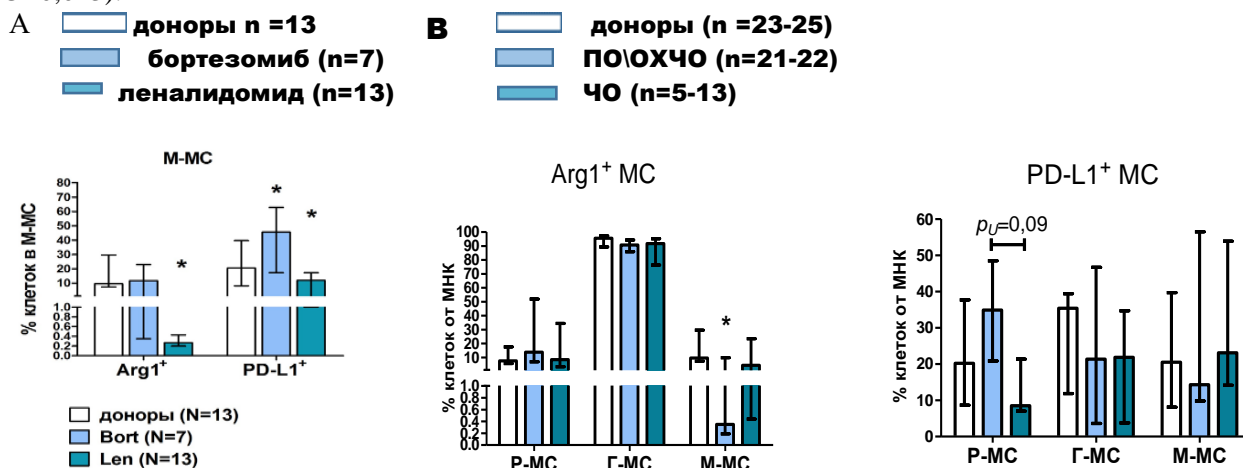
Примечание: данные представлены как процент позитивных клеток среди Г-МС, М-МС и Р-МС. pU – значимость различий с донорами.

При исследовании сопряженности между экспрессией ингибиторных молекул со стадией заболевания (рис. 4) уменьшение доли Arg-1<sup>+</sup>клеток в популяции М-МС у больных со II стадией проявлялось в виде тренда (pU=0,12), а у больных с III стадией было более выраженным и достоверным (pU=0,045). В популяции Г-МС снижение доли Arg-1<sup>+</sup>клеток проявлялось только у пациентов с III стадией и в виде тренда (pU=0,10). Доля Arg-1<sup>+</sup>клеток в популяции Р-МС не отличалась от таковой у доноров. Относительное содержание IDO<sup>+</sup> и PD-L1<sup>+</sup> клеток в субпопуляциях МС у больных ММ в фазе ремиссии и доноров также не различалось (рис. 4).



**Рисунок 4.** Экспрессия ингибиторных молекул в МС при ММ в зависимости от стадии ММ. рU –  $* < 0,05$  – достоверность различий с донорами.

Сравнение экспрессии супрессорных молекул в зависимости от режима индукционной терапии показало (рис. 5А), что снижение экспрессии Arg-1 в М-МС наблюдалось только в группе пациентов, получивших леналидомид в качестве 2-ой или последующих линий терапии. Доля Arg-1-экспрессирующих М-МС в этой группе была в 35 раз ниже (Me 0,27 %) по сравнению со здоровыми донорами ( $pU=0,016$ ). Кроме того, пациенты этой группы отличались достоверно более низким содержанием PD-L1<sup>+</sup>М-МС по сравнению с пациентами, получившими терапию бортезомибом ( $pU=0,013$ ).



**Рисунок 5.** Экспрессия ингибиторных молекул в МС при ММ в зависимости от режима терапии (А) и глубины ответа (В), рU –  $* < 0,05$  – достоверность различий с донорами. ПО - полный ответ, ОХЧО – очень хороший частичный ответ, ЧО – частичный ответ.

При анализе пациентов с различным ответом (рис.5В) сниженная экспрессия Arg-1 в М-МС (в виде тренда) обнаруживалась у пациентов с ПО/ОХЧО. Доля Arg-1<sup>+</sup>, IDO<sup>+</sup> и PD-L1<sup>+</sup> клеток в субпопуляциях МС у больных с ПО/ОХЧО и ЧО значимо не различалось. Единственной особенностью, которая проявлялась на уровне тренда ( $pU=0,09$ ), было более высокое содержание PD-L1<sup>+</sup>Р-МС у пациентов с ПО/ОХЧО, чем у больных с ЧО.

Таким образом, изменения в экспрессии ингибиторных молекул было наиболее характерным для пациентов с III стадией, в группе с терапией леналидомидом и у пациентов с полным или очень хорошим ответом. Среди указанных факторов наиболее сильным по данным многофакторного анализа (табл. 5) оказался режим терапии, оказывающий достоверное влияние на экспрессию PD-L1 и на уровне тренда – на экспрессию Arg-1 в М-МС.

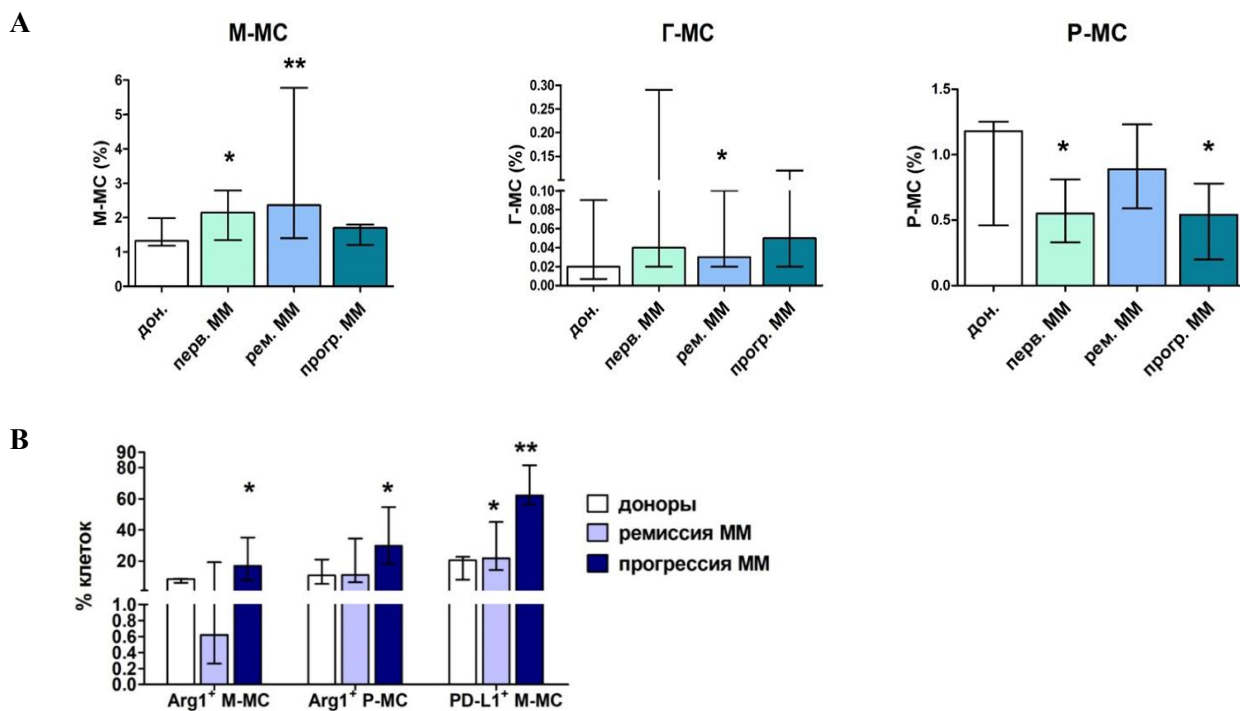
**Таблица 5** – Влияние клинических параметров на экспрессию супрессорных молекул в популяциях МС у больных ММ

Фактор	Arg-1 <sup>+</sup> М-МС (%)		Arg-1 <sup>+</sup> Р-МС (%)		PD-L1 <sup>+</sup> М-МС (%)	
	F	p	F	p	F	p
Стадия ММ	0,09	0,77	1,66	0,24	0,29	0,60
Тип ответа	0,12	0,73	0,74	0,42	0,12	0,73
Режим ИТ	2,76	0,12	0,0005	0,98	<b>5,20</b>	<b>0,046</b>
Стадия ММ/ответ	0,80	0,38	3,05	0,13	0,41	0,54
Стадия ММ/ Тип ИТ	0,0004	0,98	0,0011	0,97	0,09	0,77
Ответ/Тип ИТ	0,30	0,59	–	–	0,38	0,55

Примечание: F- сила фактора, p - достоверность.

Для выяснения возможной патогенетической значимости МС на этапе индукционной терапии также сравнили больных в ремиссии с группой пациентов с впервые выявленной ММ и прогрессией (рис. 6). Сниженное относительное содержание Р-МС и повышенное количество более дифференцированных

М-МС и Г-МС отмечалось уже у пациентов с впервые выявленной ММ.



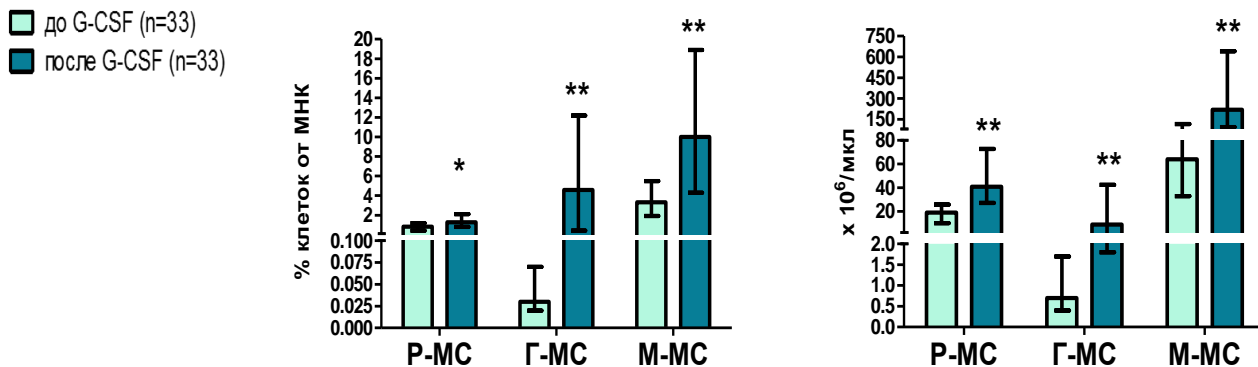
**Рисунок 6.** Относительное содержание (А) и экспрессия ингибиторных молекул (В) в субпопуляциях МС у больных ММ в различные фазы заболевания, рU – \*<0,05; \*\*<0,01 – достоверность различий с донорами.

В фазе ремиссии изменения в содержании МС (снижение Р-МС независимо от режима ИТ и возрастание М-МС, особенно после терапии леналидомидом) становилось менее выраженным. В то же время при прогрессии содержание Р-МС вновь снижалось, а повышенное содержание Г-МС не сопровождалось возрастанием М-МС, однако было ассоциировано с усилением экспрессии ингибиторных молекул, что проявлялось возрастанием доли Arg1<sup>+</sup> и PD-L1<sup>+</sup> клеток в М-МС и PD-L1<sup>+</sup> клеток в Р-МС.

Таким образом, снижение Р-МС и возрастание М-МС и Г-МС у больных являются характерными изменениями в компартменте МС, которые регистрируются уже у пациентов с впервые выявленной ММ, ослабевают при достижении ремиссии и вновь усиливаются при прогрессировании ММ. При этом отличительными особенностями прогрессии являются наиболее выраженное снижение доли Р-МС и увеличение доли Г-МС в отсутствии достоверного увеличения М-МС, а также усиление супрессорного потенциала М-МС и Р-МС.

#### Влияние Г-КСФ на количество и супрессорный потенциал МС

Учитывая, что одним из этапов трансплантации является мобилизация с использованием Г-КСФ, который может влиять на генерацию и функции МС, далее исследовали изменения, происходящие с МС на фоне введения Г-КСФ. Как видно из данных рис. 7, введение Г-КСФ приводило к значимому возрастанию относительного и абсолютного содержания всех трёх анализируемых субпопуляций МС, наиболее выраженному в отношении Г-МС.



**Рисунок 7.** Содержание МС в ПК больных ММ до и после введения Г-КСФ, рU – \*<0,05; \*\*<0,01 – достоверность между группами.

Увеличение относительного количества М-МС сопровождалось увеличением в них доли Arg-1<sup>+</sup> клеток более чем в 20 раз (pU=0,004). Экспрессия других молекул значимо не менялась. Тем не менее, содержание в циркуляции клеток с фенотипом Г-МС и М-МС, экспрессирующих Arg-1 и PD-L1, значимо возрастало (табл. 6).

**Таблица 6** - Содержание МС с супрессорным фенотипом среди МНК

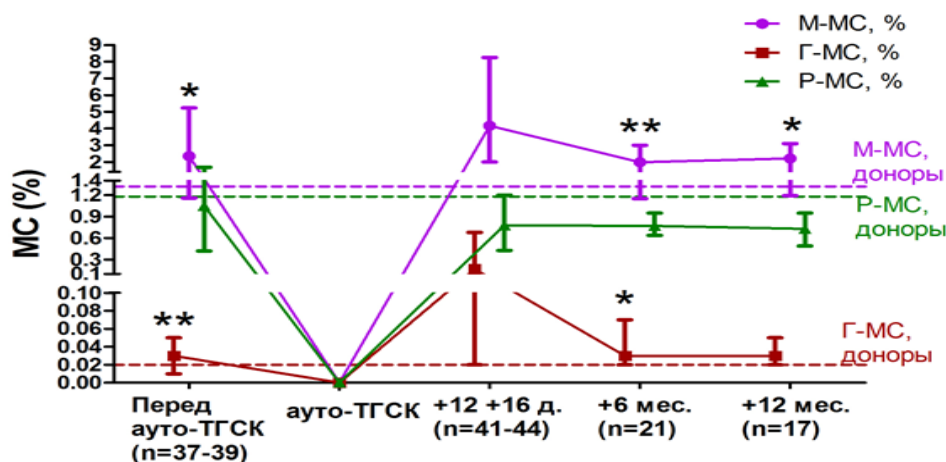
Клеточный фенотип МС (%)	До Г-КСФ	После ГКСФ	pU
Г-МС Arg+	0,02 (0,015-0,027)	2,37 (0,32-23,1)	0,0013
P-МС Arg+	0,13 (0,05-0,18)	0,31 (0,05-0,44)	0,28
M-МС Arg+	0,02 (0,01-0,08)	0,88 (0,23-1,76)	0,0002
Г-МС IDO+	0,0027(0,0025-0,0028)	0,024 (0,004-0,11)	0,25
P-МС IDO+	0,021 (0,004-0,038)	0,11 (0,00-0,13)	0,93
M-МС IDO+	0,07 (0,04-0,07)	0,14 (0,01-4,07)	0,79
Г-МС PD-L1+	0,009 (0,004-0,028)	0,16 (0,04-0,36)	0,008
P-МС PD-L1+	0,22 (0,008-0,43)	0,24 (0,04-0,42)	0,94
M-МС PD-L1+	0,43 (0,09-0,75)	1,19 (0,56-7,18)	0,01

Примечание: указанные фенотипы рассчитаны в процентном выражении от МНК. P<sub>U</sub> – значимость различий показателей в парных выборках до и после введения Г-КСФ.

#### Содержание и супрессорный потенциал циркулирующих МС у пациентов с ММ в динамике ауто-ТГСК

Дальнейший этап работы был посвящен оценке МС в динамике ВДХТ и ауто-ТГСК. несмотря на существенное возрастание МС на этапе мобилизации ГСК, на момент начала кондиционирования абсолютное и относительное количество всех субпопуляций МС значимо снижалось и соответствовало исходным значениям, регистрируемых у пациентов с ММ в фазе ремиссии до введения Г-КСФ.

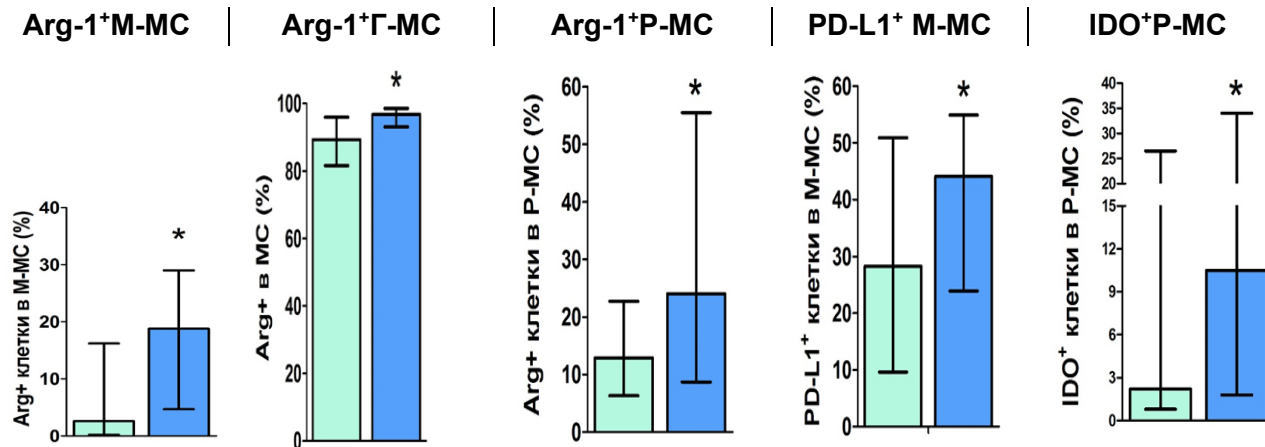
Анализ в группе пациентов с сохраняющейся после ауто-ТГСК в течение 12 мес. ремиссией показал (рис. 8), что в раннем посттрансплантационном периоде, соответствующем приживлению трансплантата и выходу из лейкопении (12-16 день после ауто-ТГСК) абсолютное и относительное содержание М-МС и Г-МС возрастало, а абсолютное количество Р-МС снижалось, однако к 6-12 мес. наблюдения содержание всех субпопуляций МС восстанавливалось до уровня перед ауто-ТГСК. Характерно, что содержание М-МС в ПК на этапе выхода из лейкопении не коррелировало с долей этих клеток в продукте афереза ТГСК ( $R_s=0,277$ ;  $p=0,16$ ;  $n=27$ ). Учитывая этот факт, а также то, что Г-МС при криоконсервации продукта афереза разрушаются, можно предположить, что содержащиеся в продукте лейкоафереза предшественники миелопоэза, трансплантируемые вместе с ГСК, не играют ключевой роли в формировании общего пула М-МС после ауто-ТГСК.



**Рисунок 8.** Изменения МС в динамике ауто-ТГСК.

pU –  $* < 0,05$ ;  $** < 0,01$  – достоверность различий между группами пациентов на этапах ауто-ТГСК.

Изменения в содержании МС на этапе выхода из лейкопении сопровождались усилением экспрессии ингибиторных молекул - возрастанием доли Arg-1-позитивных клеток во всех субпопуляциях МС, PD-L1- позитивных клеток - в субпопуляции М-МС и IDO – позитивных клеток - в субпопуляции Р-МС (рис. 9).

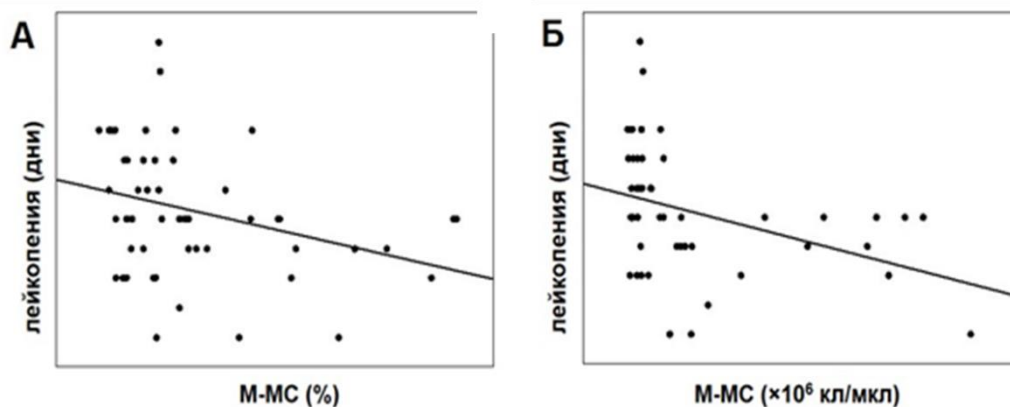


**Рисунок 9.** Экспрессия супрессорных молекул в МС на этапе выхода из лейкопении, pU –  $* < 0,05$  – достоверность по сравнению с предтрансплантационным этапом.

Таким образом, выход из лейкопении, соответствующий приживлению трансплантата и запуску гомеостатической пролиферации, ассоциировался с транзитным возрастанием М-МС и Г-МС и усилением супрессорного потенциала М-МС и Р-МС.

#### Анализ сопряженности МС с длительностью лейкопении и исходами ауто-ТГСК

Анализ сопряженности МС с параметрами восстановления кроветворения показал, что процентное и абсолютное содержание М-МС обратно коррелировало с длительностью лейкопении (рис. 10).



**Рисунок 10.** Взаимосвязь между длительностью лейкопении и относительным (А) и абсолютным (В) количеством М-МС на этапе выхода из лейкопении.

Важно отметить, что по данным многофакторного анализа (табл. 7) доля М-МС достоверно влияла на длительности лейкопении, не уступая по значимости такому фактору, как количество  $CD34^+$  кл/кг в трансплантате.

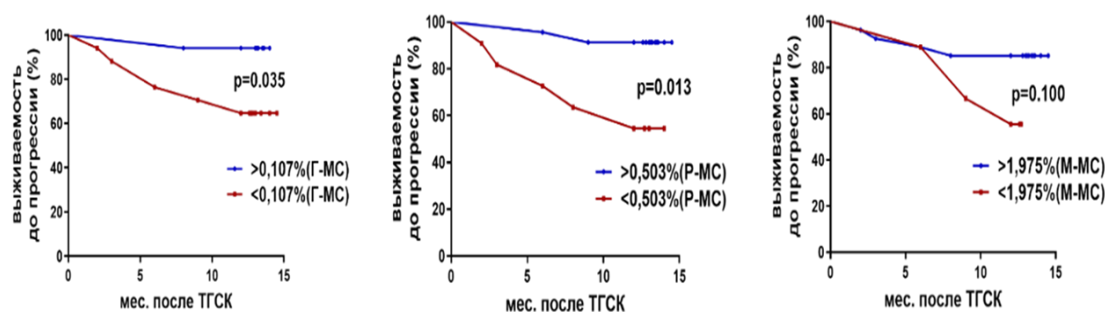
Таким образом, можно полагать, что более высокое относительное содержание М-МС в раннем периоде (12-16 день после введения ГСК) ассоциируются с более эффективным восстановлением гемопоэза.

**Таблица 7** – Влияния клинических параметров на длительность лейкопении после ауто-ТГСК у пациентов с ММ (многофакторный анализ).

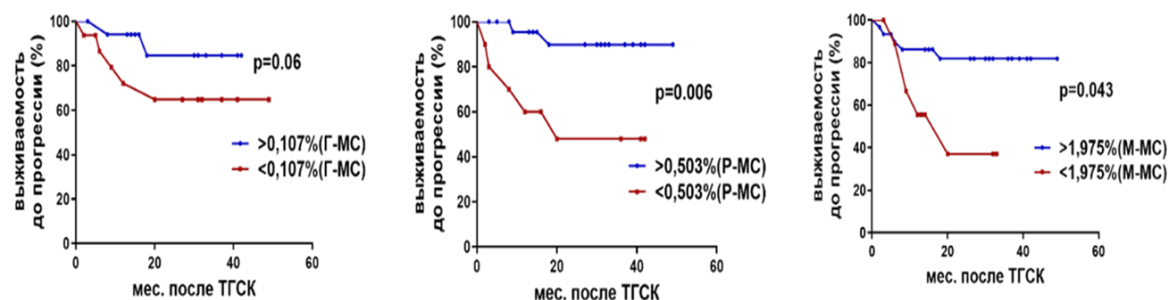
Фактор	F	p
Количество CD34 <sup>+</sup> клеток/кг (> Ме или <Ме)	6,95	0,01
М-МС, % (> Ме или <Ме)	7,66	0,008
Ответ (ПО или ЧО)	0,33	0,57
Минимальная остаточная болезнь (наличие или отсутствие)	0,15	0,70
Стадия II или III	0,003	0,96

При анализе безрецидивной выживаемости в группе больных, прошедших 12 месячный срок наблюдения (рис. 11А), пациенты с более высоким уровнем МС на момент выхода из лейкопении характеризовались более высокими показателями безрецидивной выживаемости. Отсутствие рецидива в группе с содержанием Г-МС>0,11% регистрировалось чаще, чем у пациентов с уровнем Г-МС≤0,11% (91,3% против 68,4%;  $p_{\log\text{-rank}}=0,059$ ). Доля пациентов без рецидива в группе с содержанием Р-МС>0,50% была выше, чем у пациентов с уровнем Р-МС≤0,50% (93,1% по сравнению с 53,8%;  $p_{\log\text{-rank}}=0,003$ ). Схожая ассоциация была установлена для М-МС.

**А**



**В**



**Рисунок 11.** Анализ безрецидивной выживаемости в зависимости от пороговых значений отдельных субпопуляций МС.

Выявленные закономерности в целом сохранялись в общей группе со сроком наблюдения от 2 до 60 мес (рис. 11В). Различия в частоте безрецидивных случаев между пациентами с уровнем Г-МС>0,11% и Г-МС≤0,11% достигали статистической значимости (73,7% по сравнению 45,7%;  $p_{\log\text{-rank}}=0,028$ ), в частоте пациентов без рецидива ММ в зависимости от содержания М-МС продолжали сохраняться на уровне статистической значимости (93,1% по сравнению с 53,8 %;  $p_{\log\text{-rank}}=0,028$ ). Более низкая безрецидивная выживаемость у пациентов с содержанием М-МС ≤1,47 % по сравнению с группой пациентов с М-МС>1,47 % проявлялась на уровне тренда (42,9 по сравнению с 58,4%,  $p_{\log\text{-rank}}=0,15$ ).

**Таблица 8** – прогностическая значимость клинических и лабораторных показателей в качестве предикторов развития рецидивов после ауто-ТГСК у больных ММ

Показатель	Однофакторный анализ Кокса			Многофакторный анализ Кокса		
	B (SE)	HR	p	B(SE)	HR	p
Стадия ММ (II/III)	0,84 (0,67)	0,900	0,21	1,96 (0,86)	1,610	0,02
Глубина ответа (ПО/ЧО)	1,09 (0,57)	4,56	0,057	1,79 (0,84)	9,01	0,03
Длительность лимфопении (<12 дней / >12 дней)	-0,20 (0,60)	0,903	0,74	-0,28 (0,76)	1,77	0,72
МОБ перед ауто-ТГСК (полож. /отрицательн.)	-1,37 (0,94)	0,003	0,15	0,01 (1,18)	0,02	0,99
Режим терапии (борт/ лен)	0,59 (0,59)	1,10	0,32	-0,41 (0,75)	0,39	0,58
М-МС (>1,47/ ≤1,47%)	1,16 (0,62)	4,26	0,059	1,39 (0,89)	4,79	0,12
Г-МС (>0,11/ ≤0,11%)	1,13 (0,58)	4,58	0,049	1,33 (0,71)	3,28	0,06
Р-МС (>0,50 / ≤0,50%)	1,29 (0,54)	5,11	0,017	1,38 (0,64)	3,06	0,03

Примечание: В – коэффициент регрессии, SE – стандартная ошибка, HR — отношение рисков.

В свою очередь относительное количество Р-МС ≤0,50% являлось независимым достоверным фактором риска (табл. 8), ассоциированным с меньшей безрецидивной выживаемостью. При этом данный параметр не уступал по силе таким известным предикторам как более продвинутая стадия и глубина ответа перед трансплантацией.

Полученные в целом результаты свидетельствуют о клинической и прогностической значимости МС в раннем посттрансплантационном периоде и позволяют предположить, что более высокое содержание МС на этапе энграфтинга и запуска гомеостатической пролиферации позитивно сказывается на продолжительности безрецидивного периода.

### Заклучение

Настоящая работа посвящена клинко-иммунологическому анализу содержания МС и экспрессии этими клетками ингибиторных молекул (Arg-1, IDO, PD-L1) у больных ММ в динамике ауто-ТГСК и нацелена на изучение клинической и прогностической значимости МС на различных этапах терапии.

Согласно полученным данным больные ММ в фазе ремиссии характеризуются возрастанием относительного и абсолютного количества М-МС и увеличением доли Г-МС в сочетании со снижением абсолютного количества Р-МС, что в наибольшей степени выражено в группах пациентов с более продвинутой (III) стадией, получивших терапию бортезомибом и с полным или очень хорошим частичным ответом. При этом стадия заболевания является наиболее значимым фактором, достоверно влияющим на содержание Р-МС. Кроме того, для МС пациентов в ремиссии характерно снижение экспрессии Arg-1 в М-МС, наиболее ярко проявляющееся у пациентов с III стадией ММ, более глубоким ответом на терапию и режимом терапии, включающим леналидомид. В последнем случае пациенты отличаются также достоверно меньшим содержанием PD-L1<sup>+</sup> клеток в М-МС в сравнении с оппозитной группой, причём режим терапии является фактором, достоверно влияющим на содержание PD-L1<sup>+</sup> клеток в М-МС.

Сравнительный анализ больных, обследованных на момент постановки диагноза, в ремиссии и прогрессии, показал, что изменения в содержании МС регистрируется уже у больных с впервые выявленной ММ, ослабевают в фазе ремиссии и вновь усиливаются у больных с прогрессией, т.е. не ответивших на терапию или рецидивировавших после достижения ремиссии. При этом отличительной особенностью прогрессии является более глубокое снижение Р-МС, которое сочетается с преимущественным увеличением Г-МС (в отсутствие достоверного возрастания М-МС) и усилением экспрессии Arg-1 и PD-L1 в М-МС и Arg-1 в Р-МС. Эти данные свидетельствуют об изменениях субпопуляционной структуры в компартменте МС и возрастании супрессорного потенциала МС на фоне прогрессии ММ.

Мобилизация ГСК, как неотъемлемый этап ауто-ТКМ, предусматривающий введение Г-КСФ, вызывает увеличение доли всех субпопуляций МС в ПК, восстановление до донорских значений исходно сниженной экспрессии Arg-1 в субпопуляции М-МС и экспансию периферических Г-МС и М-МС, экспрессирующих Arg-1 и PD-L1 молекулы. Однако к моменту начала высокодозной химиотерапии исследуемые показатели МС возвращаются к исходному уровню.

Анализ МС в динамике ауто-ТГСК продемонстрировал транзитное возрастание М-МС и Г-МС в комбинации с уменьшением Р-МС, а также усиление супрессорного потенциала М-МС и Р-МС на этапе ранней реконституции. Выявленные изменения отражают, по-видимому, ускоренное созревание ранних предшественников в М-МС и Г-МС и не связаны с пролиферацией трансплантируемых М-МС и Г-МС в составе сепарата, поскольку Г-МС разрушаются после криоконсервации, а содержание М-МС в сепарате не коррелирует с уровнем этих клеток в ПК.

Характерно, что возрастание количества М-МС сопровождается усилением в них экспрессии Arg-1 и PD-L1, тогда как в субпопуляции Г-МС умеренное возрастание экспрессии Arg-1 сочетается со снижением экспрессии PD-L1. Увеличение количества клеток с фенотипом Г-МС, которые лишены способности к PD-L1-опосредованной иммуносупрессии, может быть связано с появлением незрелых форм гранулоцитов на этапе восстановления кроветворения. Р-МС, несмотря на снижение численности этой субпопуляции, демонстрируют возрастание экспрессии в них Arg-1 и IDO. Таким образом, выход из лейкопении, соответствующий приживлению трансплантата и запуску гомеостатической пролиферации, ассоциирован с усилением супрессорного потенциала М-МС и Р-МС, а уменьшение экспрессии PD-L1 в субпопуляции клеток с фенотипом Г-МС на данном этапе обусловлено, скорее всего, возрастанием незрелых форм гранулоцитов, не являющихся МС.

Важно отметить, что содержание М-МС на этапе ранней реконституции обратно коррелирует с длительностью лейкопении и доля циркулирующих М-МС является фактором, достоверно влияющим на длительности лейкопении, не уступая такому фактору, как количество трансплантированных CD34<sup>+</sup> клеток/кг. Кроме того, выяснилось, что более высокие уровни всех субпопуляций МС на этапе выхода из лейкопении ассоциированы с более высокими показателями безрецидивной выживаемости. В то же время относительное количество циркулирующих Р-МС  $\leq 0,50\%$  является независимым фактором риска, ассоциированным с меньшей безрецидивной выживаемостью, наряду с такими известными факторами прогноза, как более продвинутая стадия ММ и глубина ответа перед проведением ауто-ТГСК.

Полученные в целом результаты свидетельствуют о клинической и прогностической значимости МС в раннем посттрансплантационном периоде и позволяют предположить, что более высокое содержание МС на этапе энgraфтинга и запуска гомеостатической пролиферации играет позитивную роль в исходах ауто-ТГСК.

## ВЫВОДЫ

1. В фазе ремиссии ММ отмечается снижение абсолютного количества Р-МС и возрастание содержания М-МС и Г-МС, что наиболее выражено у пациентов с III стадией, терапией бортезомибом и ПО/ОХЧО и свидетельствует о сопряженности МС со стадией заболевания, типом индукционной терапии и глубиной ответа.
2. Изменения в содержании МС выявляются у пациентов с впервые выявленной ММ, ослабевают в фазе ремиссии и вновь усиливаются на фоне прогрессии, характеризуясь наиболее выраженным снижением Р-МС и повышением Г-МС в отсутствие достоверных изменений М-МС, что свидетельствует о патогенетической значимости МС и изменениях их субпопуляционной структуры на фоне прогрессии заболевания.
3. В фазе ремиссии относительно содержание Arg-1<sup>+</sup> М-МС снижается, тогда как при отсутствии ответа или рецидиве наблюдается возрастание Arg-1<sup>+</sup> и PD-L1<sup>+</sup> клеток в М-МС и Arg-1<sup>+</sup> клеток в Р-МС, что свидетельствует о прямой сопряженности прогрессии заболевания с усилением экспрессии молекул, ассоциированных с иммуносупрессией.
4. Введение Г-КСФ вызывает увеличение в циркуляции относительного и абсолютного количества всех субпопуляций МС, восстановление исходно сниженной экспрессии Arg-1 и экспансию Г-МС и М-МС, экспрессирующих Arg-1 и PD-L1, что свидетельствует об усилении супрессорного потенциала МС на этапе мобилизации ГСК.
5. На этапе выхода из лейкопении после ауто-ТГСК наблюдается транзитное возрастание М-МС и Г-МС и уменьшение Р-МС, а также возрастание доли Arg-1<sup>+</sup> клеток во всех субпопуляциях МС, PD-L1<sup>+</sup> М-МС и IDO<sup>+</sup> Р-МС, что свидетельствует об экспансии М-МС и Г-МС и усилении экспрессии ингибиторных молекул на этапе энgraфтинга и ранней иммунной реконституции.
6. Содержание М-МС у больных ММ на этапе восстановления лейкоцитов обратно коррелирует с длительностью лейкопении, а уровни М-МС  $>1,98\%$ , Г-МС  $>0,11\%$  и Р-МС  $>0,50\%$  – ассоциированы с более высокими показателями безрецидивной выживаемости, что свидетельствует о сопряженности МС с эффективностью приживления трансплантата и исходами ауто-ТГСК.

## Список основных работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Sergeevicheva V. Myeloid-derived suppressor cells recover quickly following autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma patients/ Batorov E., Aristova T., Sizikova S., Ostanin A., Chernykh E.// The 46th Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation: Physicians Poster Session. Bone Marrow Transplant. 2020 - Vol.55 - P.554-555.
2. Aristova T. Effect of HSC mobilization procedure in patients with multiple myeloma on the level of myeloid suppressor cells in peripheral blood/ Batorov E., Sergeevicheva V., Ostanin A, Chernykh E.// Cellular Therapy and Transplantation. 2020- Vol. 9, Num 3. -P. 42.
3. Аристова Т. Миелоидные супрессорные клетки периферической крови у больных множественной миеломой на этапе мобилизации гемопоэтических стволовых клеток /Баторов Е., Сергеевичева В., Останин А., Черных Е. //Гематология и трансфузиология. 2021 - Vol.66 (2) - P.218-230.
4. Aristova T. Hematopoietic stem cell mobilization leads to the expansion of circulating myeloid-derived suppressor cells in multiple myeloma patients /Tyrinova T., Batorov E., Sergeevicheva V., Ostanin A., Chernykh E.// Annals of Oncology. 2021-Vol 32, Suppl. 7.- P.1463.
5. Tyrinova T. V. Expression of Inhibitory Molecules (Arginase-1, IDO, and PD-L1) by Myeloid-Derived Suppressor Cells in Multiple Myeloma Patients in Remission. Batorov E. V., Aristova T. A., Denisova V. V., Ostanin A. A., and Chernykh E. R. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2022 - Vol. 174, No. 1 - P.84-88.
6. Тыринова Т.В. Супрессорные клетки миелоидного происхождения у больных множественной миеломой на этапе иммунной реконституции и после высокодозной химиотерапии и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток /Баторов Е.В., Аристова Т.А., Ушакова Г.Ю., Сизикова С.А. Денисова В.В., Останин А.А., Черных Е.Р. //Сибирский онкологический журнал. 2022- Vol. 21, № 6- P.47-58.
7. Tyrinova T., Myeloid derived suppressor cells as a prognosis factor after autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma / Aristova T., Batorov E., Ushakova G., Sizikova S., Denisova V., Chernykh E.// Abstract book. 2023 - P. 229. (The Korean Association of Immunologists International Meeting, Incheon, Korea, 13 - 16.09. 2023).
8. Anmut V. Association of myeloid-derived suppressor cells with hematopoietic recovery after high-dose chemotherapy in multiple myeloma / Tyrinova T., Batorov E., Aristova T., Chernykh E. // Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya. 2023 – Vol. 25, 1159-1164.
9. Tyrinova T. Decreased circulating myeloid-derived suppressor cell count at the engraftment is one of the risk factors for multiple myeloma relapse after autologous hematopoietic stem cell transplantation / Batorov E., Aristova T., Chernykh E. //Heliyon. 2024 - Vol. 10, no. 5– P. 26362.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ММ	Множественная миелома
МС	Миелоидные супрессоры
КМ	Костный мозг
ПК	Периферическая кровь
М-МС	Моноцитарные миелоидные супрессоры
Г-МС	Гранулоцитарные миелоидные супрессоры
Р-МС	Ранние миелоидные супрессоры
Arg-1	аргиназа-1
IDO	индоламин-2,3-диоксигеназа
PD-L1	Лиганд к рецептору программированной клеточной смерти-1
TGF	Трансформирующие факторы роста
IL	Интерлейкины
ХЛЛ	Хронический лимфолейкоз
ДБКЛ	Диффузная В-крупноклеточная лимфома
ГСК	Гемопоэтические стволовые клетки
Алло-ТГСК	Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

Ауто-ТГСК	Аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
ВДХТ	Высокодозная химиотерапия
TCR	Т-клеточный рецептор
Г-КСФ	Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
РТПХ	Реакция трансплантат против хозяина
MGUS	моноклональная гаммапатия неопределенного значения
MPT	Магнитно-резонансная томография
ПЭТ	Позитронно-эмиссионная томография
Ig G, A	Иммуноглобулины
МОБ	Минимальная остаточная болезнь
Трег	Т-регуляторные клетки
ПО, ОХЧО, ЧО	Глубина ответа на терапию ММ: полный ответ, очень хороший частичный ответ, частичный ответ
ИТ	Индукционная терапия (индукция ремиссии) ММ
TNF	Факторы некроза опузхоли
МНК	Мононуклеарные клетки
COX2	Циклооксигеназа 2
MHC	Главный комплекс гистосовместимости
NK-клетки	Натуральные киллерные клетки
PD-L1	Лиганд к рецептору программированной клеточной смерти-1