

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»

На правах рукописи



АРИСТОВА ТАТЬЯНА АНДРЕЕВНА

3.2.7. Иммунология

СУПРЕССОРНЫЕ КЛЕТКИ МИЕЛОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
НА ЭТАПАХ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

диссертация на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор,
член-корреспондент РАН
Е.Р. Черных

Новосибирск
2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. СУПРЕССОРНЫЕ КЛЕТКИ МИЕЛОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ (Обзор литературы)	12
1.1. Введение.....	12
1.2. Множественная миелома: патогенез, клиническое разнообразие, прогностические факторы.....	13
1.2.1. Патогенез и клиническое разнообразие множественной миеломы.....	13
1.2.2. Факторы прогноза при множественной миеломе.....	15
1.3. Иммунные нарушения в патогенезе множественной миеломы.....	20
1.4. Миелоидные супрессоры: общая характеристика и роль при опухолевом росте	
1.4.1. Общая характеристика миелоидных супрессоров.....	26
1.4.2. Механизмы иммуносупрессивного действия миелоидных супрессоров.....	28
1.4.3. Миелоидные супрессоры при онкологических заболеваниях и гемобластозах.....	29
1.5. Миелоидные супрессоры при множественной миеломе.....	34
1.5.1. Изменения миелоидных супрессоров при множественной миеломе.....	34
1.5.2. Современные подходы к лечению множественной миеломы и влияние терапии на содержание и функции миелоидных супрессоров.....	36
1.5.3. Миелоидные супрессоры при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.....	39
1.6. Заключение.....	40

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Характеристика пациентов, включённых в исследование.....	41
2.2. Забор образцов периферической крови и выделение моноклеарных клеток.....	43
2.3. Проточная цитофлуориметрия периферической крови: выделение миелоидных супрессоров из моноклеарных клеток и анализ экспрессии ингибиторных молекул в миелоидных супрессорах.....	44
2.4. Статистический анализ.....	46

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....46

3.1 Содержание миелоидных супрессоров в периферической крови больных множественной миеломой.....	46
3.2. Экспрессия супрессорных молекул в субпопуляциях миелоидных супрессоров при множественной миеломе.....	56
3.3. Влияние гранулоцитарного колониестимулирующего фактора на количество и супрессорный потенциал миелоидных супрессоров	63
3.4. Содержание и супрессорный потенциал циркулирующих миелоидных супрессоров при множественной миеломе в динамике аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.....	67
3.4.1. Количественная характеристика субпопуляций миелоидных супрессоров в динамике аутологичной трансплантации у больных множественной миеломой.....	67
3.4.2. Экспрессия Arg-1, PD-L1 и IDO субпопуляциями миелоидных супрессоров у больных множественной миеломой в динамике аутологичной трансплантации.....	69
3.5. Анализ сопряженности миелоидных супрессоров с длительностью лейкопении и исходами аутологичной трансплантации.....	74
3.5.1. Анализ длительности лейкопении в группах пациентов с высоким и низким содержанием субпопуляций миелоидных супрессоров на этапе восстановления лейкоцитов.....	74

3.5.2 Анализ сопряженности миелоидных супрессоров на этапе восстановления лейкоцитов после аутологичной трансплантации гемопозитических стволовых клеток с безрецидивной выживаемостью.....	77
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	88
ВЫВОДЫ.....	93
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	94
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	97

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и обоснование исследования:

Исследования последних лет показали, что супрессорные клетки миелоидного происхождения или миелоидные супрессоры (МС) играют важную роль в регуляции иммунного ответа при многих патологиях. Накопление МС описано в опухолевых тканях, селезёнке, лимфатических узлах, в костном мозге (КМ) и периферической крови (ПК) при опухолевых заболеваниях, острых и хронических инфекциях, воспалительных процессах, травмах, аутоиммунных заболеваниях и др. [1] и связано со слабо контролируемым хроническим воспалительным процессом [2].

У человека описаны две основные субпопуляции МС: 1) моноцитарные МС (М-МС) - клетки с фенотипом и морфологией, схожей с моноцитами, но отличающиеся низкой экспрессией молекулы МНС класса II, с фенотипом CD14+HLA-DR^{low}/– [3]; 2) гранулоцитарные или полиморфноядерные МС (Г-МС), фенотипически схожие с нейтрофилами с фенотипом CD11b+CD33+CD14–CD15+(CD66b+) HLA-DR^{low}/–, но характеризующиеся низкой плотностью и выраженной супрессорной активностью в отношении Т-клеток. Кроме того, выделяют третий тип – незрелые или ранние МС (Р-МС) с фенотипом Lin– (CD3+CD14+CD15+CD19+CD56+HLA-DR–CD33+, функции которых пока мало изучены [4].

МС проявляют ингибирующее действие в отношении клеток врождённого и приобретённого иммунитета *in vitro* и *in vivo* с наиболее выраженной супрессорной активностью в отношении Т-клеток [5]. 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 рост фактора бета (TGF- β), интерлейкина 10 (IL-10), экспрессию ингибиторных чек-пойнт молекул (например, PD-L1), индукцию регуляторных Т-клеток (Т-

рег) и др. [6,7] 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 неблагоприятного прогностического биомаркёра прогрессии, неблагоприятного исхода и резистентности к терапии [8; 9; 10]. Экспансия М-МС продемонстрирована также при различных гемобластозах, включая острые лейкозы, лимфопролиферативные и миелопролиферативные заболевания [11]. Тем не менее, несмотря на многочисленные исследования, роль МС при гематологических злокачественных опухолях остаётся недостаточно исследованной и до конца неясной. С одной стороны, повышенное количество циркулирующих МС является негативным прогностическим маркером при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) [12], множественной миеломе (ММ) [13], диффузной В-крупноклеточной лимфоме (ДБККЛ) и лимфоме Ходжкина [14]. С другой стороны, МС могут играть позитивную иммунорегуляторную роль при аллогенных трансплантациях гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) в силу способности донорских МС, содержащихся в аллотрансплантате, подавлять острую реакцию трансплантат против хозяина (РТПХ) после алло-ТГСК [16,17].

Множественная миелома (ММ) представляет собой В-клеточную опухоль с экспансией моноклональных плазматических клеток в КМ и аккумуляцией дисфункциональных моноклональных иммуноглобулинов в ПК. ММ составляет примерно 1% всех опухолей и, несмотря на достижения в области терапии, остаётся одной из неизлечимых злокачественных опухолей [17]. МС костномозгового микроокружения играют важную роль в патогенезе ММ, в том числе участвует в формировании ниш для плазматических клеток, что может способствовать «уходу» опухолевых клеток от иммунного надзора и приводить к развитию химиорезистентности опухоли [18]. Показано, что Г-МС поддерживают стволовые свойства опухолевых клеток ММ и способствуют росту опухоли в экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*

[19]. При этом данные о содержании различных субпопуляций периферических МС при ММ у человека малочисленны и противоречивы, так же, как и не до конца ясна патогенетическая и прогностическая значимость отдельных субпопуляций МС на различных этапах лечения ММ.

Несмотря на внедрение в практику лечения ММ новых противоопухолевых препаратов направленного действия, высокодозная химиотерапия (ВДХТ) с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) остаётся важным и необходимым этапом терапии ММ, обеспечивающим консолидацию достигнутой ремиссии и способствующей увеличению длительности безрецидивной выживаемости у больных ММ. В литературе имеются единичные сообщения, что высокое количество М-МС до проведения ауто-ТГСК ассоциируется с худшим исходом трансплантации и меньшим временем до развития рецидива [13]. 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. Тем не менее, данные о количественных изменениях МС и особенностях экспрессии ингибиторных молекул на различных этапах ауто-ТГСК, а также их прогностической значимости остаются мало изученными.

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, предлеженности и ответа на терапию.
2. Изучить супрессорный потенциал МС на основе оценки экспрессии ингибиторных молекул (Arg1, 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 уровнем 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 отсутствием ответа/рецидивом, 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+М-МС. Снижение экспрессии Arg-1 в М-МС выявляется преимущественно у пациентов с третьей стадией, более глубоким ответом на терапию и режимом терапии, включающим леналидомид, что в последнем случае сочетается с меньшим содержанием PD-L1+М-МС, чем у пациентов

после терапии бортезомибом. В то же время пациенты с отсутствием ответа или рецидивом отличаются повышенным содержанием Arg-1+M-МС, PD-L1+M-МС и Arg-1+P-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 высокодозной химиотерапии. 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 с 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 свидетельствует 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 клинико-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, практических рекомендаций и списка литературы. Материал изложен на 111 страницах машинописного текста, включающего 17 таблиц и 6 рисунков. Работа выполнена на базе лаборатории клеточной иммунотерапии и отделения гематологии 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 в 2020 г. в Сеуле, представлены на международном симпозиуме «Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия» г. Санкт-Петербурге в 2020 и 2022 гг, Апробация диссертации состоялась 21 декабря 2022 г на семинаре клинического отдела ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии.

Глава 1. СУПРЕССОРНЫЕ КЛЕТКИ МИЕЛОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

(Обзор литературы)

1.1. Введение

ММ составляет 0,8% всех злокачественных опухолей, при этом ежегодно в мире регистрируется примерно 114000 новых случаев ММ. В США ММ является 14-й по частоте злокачественной опухолью и 2-ой по частоте опухолью кроветворной ткани. В Европе ММ занимает 20-е место по частоте

среди всех опухолей и 3-е среди новообразований кроветворной ткани [20]. В России в 2017 г. заболеваемость ММ составила 2,78 на 100 тыс. населения, количество впервые диагностированных случаев - 4075, число умерших от этой патологии - 2587 пациентов [21]. При этом во всем мире наблюдается неуклонный рост ММ [20].

По своей сути ММ представляет гематологическое злокачественное новообразование, характеризующееся клональной пролиферацией плазматических клеток в костном мозге. Данное заболевание является исходом прогрессии таких предраковых состояний как моноклональная гаммапатия неопределенного значения (MGUS), с промежуточными стадиями или без них, тлеющая множественная миелома или солитарная плазмоцитома [22]. Переход между стадиями заболевания и его резистентность к лечению регулируются микроокружением опухоли. Клеточные и неклеточные компоненты ниши миеломных клеток в КМ способствуют созданию иммуносупрессивного микроокружения опухоли, которое поддерживает рост и выживание трансформированных клеток при ММ [23].

В последние годы особое внимание среди клеток микроокружения привлекают МС. Эти клетки наряду с макрофагами, играют ключевую роль в прогрессировании ММ. МС представляют гетерогенную группу незрелых клеток и включают гранулоцитарные (Г-МС), моноцитарные МС (М-МС) и МС ранних стадий дифференцировки (Р-МС). Количество МС в КМ пациентов с ММ существенно превышает таковое у пациентов с MGUS и здоровых доноров [24, 25, 26, 27, 28, 29]. Более того, количество М-МС коррелирует с количеством М- протеина в сыворотке крови и рефрактерностью к терапии [24]. МС могут принимать активное участие в прогрессировании ММ, поскольку они способны индуцировать дифференцировку Т-рег [29, 30], снижать пролиферацию Т-клеток [31], способствовать пролиферации клеток ММ [32] и ангиогенезу, и даже дифференцироваться в функциональные остеокласты [25; 30]. В частности, некоторые исследования показали, что МС могут стимулировать продукцию провоспалительных цитокинов CCL5, MIP-1 α

клетками ММ [30] и IL-6, свидетельствуя о вовлечении МС в цитокиноопосредованную паракринную регуляцию опухолевого роста.

Изучение МС и их роли при ММ представляется важным для более глубокого понимания патогенеза ММ и разработки новых подходов к терапии. Тем не менее, многие вопросы, касающиеся содержания и функции этих клеток, а также их роли при различных видах терапии, в том числе на различных этапах ВДХТ с ауто-ТГСК, остаются мало изученными.

1.2. ММ: патогенез, клиническое разнообразие, прогностические факторы

1.2.1 Патогенез ММ и клиническое разнообразие ММ

ММ представляет клональное плазмоклеточное заболевание. Злокачественные плазматические клетки секретируют анормальные антитела, которые накапливаются в организме, что приводит к развитию гематологических, почечных и скелетных осложнений. Развитию ММ могут предшествовать два различных по клинической картине, биохимическим и цитологическим показателям, состояния: MGUS и тлеющая ММ. При MGUS и тлеющей ММ происходит диспропорциональная пролиферация одного клона плазматических клеток. В результате наблюдается повышение сывороточного уровня моноклонального иммуноглобулинового белка (М-протеина). М-протеины могут являться комбинацией тяжёлых и лёгких цепей или состоять только из цепей одного типа [33].

В норме плазматические клетки представляют собой иммунные эффекторные клетки, которые образуются из костномозговых лимфоцитов после стимуляции антигенами. Начальные этапы созревания В-клетки проходят в КМ, после чего незрелые В-клетки мигрируют в периферическую лимфоидную ткань (лимфатические узлы, селезёнку и Пейеровы бляшки кишечника), где дифференцируются в зрелые В-клетки. После контакта с соответствующим антигеном часть В-клеток претерпевает клональную пролиферацию и превращаются в плазматические клетки. Каждый клон плазматических клеток принимает участие в синтезе одного специфического

иммуноглобулина (антитела), который состоит из 2 идентичных тяжёлых цепей (гамма [γ], мю [μ], альфа [α], дельта [δ] или эпсилон [ϵ]) и 2 идентичных лёгких цепей (каппа [κ] или лямбда [λ]). В норме существует избыток лёгких цепей, поэтому небольшое количество свободных поликлональных легких цепей экскретируется с мочой (≤ 40 мг/24 часа). [33].

Ошибки во время физиологического развития В-клеток могут привести к первичным генетическим нарушениям, таким как гиперплоидия и транслокации. Дальнейшие генетические нарушения в онкогенных путях с нарушением функционирования генов-супрессоров опухолевого роста в результате мутаций/делеций, эпигенетических изменений и изменений в микроокружении КМ, вызывают развитие ММ с клинической манифестацией (симптомной ММ) в виде гиперкальциемии, разрушения костной ткани, анемии и почечной недостаточности.

Рефрактерные или рецидивирующие стадии заболевания характеризуются прогрессированием заболевания в высокоагрессивную терминальную стадию ММ, экстрамедуллярную миелому и плазмоклеточный лейкоз. В этой фазе заболевания, в связи с развитием вторичных генетических мутаций злокачественные плазматические клетки утрачивают зависимость от костномозгового микроокружения и способны выживать и приживаться в отдалённых участках тела или органах, включая мягкие ткани, кожу, печень, почки и центральную нервную систему [34].

Клинические проявления ММ чрезвычайно разнообразны, но в значительной мере определяются инфильтрацией костного мозга, периферической крови и органами повреждениями. Клинические признаки ММ проявляются симптомами, обусловленными костными повреждениями (боли в костях, переломы костей скелета, компрессия спинного мозга, радикулярные боли), гиперкальциемией (полиурия, полидипсия, тошнота, рвота), почечной недостаточностью (тошнота, рвота, недомогание, слабость), амилоидозом (периферическая нейропатия, отеки, органомегалия), инфильтрацией миеломными клетками КМ (анемия, геморрагический

синдром), развитием вторичного иммунодефицита на фоне снижения уровня нормальных иммуноглобулинов (частые инфекции, пневмонии), криоглобулинемией (синдром Рейно, акроцианоз), синдромом гипервязкости (одышка, транзиторные ишемические атаки, тромбоз глубоких вен, кровоизлияния в сетчатку глаза, тромбоз центральной вены сетчатки или её ветвей, носовые кровотечения). Длительность заболевания до появления первых клинических симптомов может составлять от нескольких месяцев до $\geq 2-3$ лет [33].

1.2.2. Факторы прогноза при ММ.

Более 40 лет назад был выделен ряд клинических и конституциональных факторов риска возникновения ММ: пожилой возраст, мужской пол, моноклональные гаммапатии в анамнезе, семейный анамнез ММ, африканское происхождение [20].

Чёткое понимание прогноза заболевания у конкретного пациента и стратификация риска ММ необходимы для оптимизации лечения ММ. Пациенты с ММ, стратифицированные как группа высокого риска, имеют плохой прогноз при существующих стратегиях лечения, тогда как пациенты с низким риском имеют не менее 50% шансов выжить более 10 лет.

На сегодняшний день наиболее важными факторами считаются: стадирование ММ, индекс маркировки плазматических клеток, цитогенетика и профилирование экспрессии генов, анализ тяжёлых/лёгких цепей в сыворотке, расширенные методы визуализации (МРТ, ПЭТ), мониторинг минимальной остаточной болезни методами проточной цитофлуориметрии и молекулярной диагностики. За последние 15 лет, благодаря новым методам исследования, стали доступны и другие биомаркёры в качестве прогностических факторов [35].

В 1975 г. Durie и Salmon разработали систему стадирования в качестве прогностической модели, используя следующие параметры, коррелирующие с клеточной массой опухоли: уровень гемоглобина, уровень кальция в

сыворотке, количество костных поражений по данным рентгенологического исследования, а также уровень и тип моноклонального белка [36].

Стадия	Признаки	Клеточная масса, 10 ¹² /м ²
I	Совокупность следующих признаков: Уровень гемоглобина >10 г/дл Нормальный уровень кальция сыворотки Рентгенологически нормальная структура костей или одиночный очаг поражения Низкий уровень М-протеина: а) IgG <50 г/л; б) IgA <30 г/л Белок Бенс-Джонса <4 г/сут	<0,6 (низкая)
II	Показатели, не соответствующие ни I, ни III стадиям	0,6–1,2 (средняя)
III	Один или более из следующих признаков: • Уровень гемоглобина <8,5 г/дл • Уровень кальция сыворотки превышает нормальные значения • Множественные поражения костей (>3 литических очагов) Высокий уровень М-протеина: IgG >70 г/л; IgA >50 г/л Белок Бенс-Джонса >12 г/сут	>1,2 (высокая)

Дополнительным признаком, определяющим подстадию, является состояние функции почек. При нормальной функции почек (креатинин сыворотки <170 мкмоль/л) диагностируется подстадия А, при сниженной (креатинин сыворотки ≥170 мкмоль/л или 2 г/дл) – подстадия В. [36]

В 2005 году были предложены новые факторы прогноза ММ, влияющие на общую выживаемость больных: уровень бета2-микроглобулина и альбумина на момент диагностики заболевания, ставшие основой для появления классификации ISS [37].

В последнее десятилетие было показано, что неслучайные хромосомные aberrации, такие как t(4;14), t(14;16), t(14;20), amplq21 и del 17p, связаны с неблагоприятным прогнозом. В 2015 году цитогенетические аномалии (наличие del(17p) и/или транслокации t(4;14) и/или t(14;16)) и уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) на момент диагностики было предложено использовать для определения стадии заболевания [38].

Важным фактором, определяющим клиническую картину и прогноз заболевания, является ответ на терапию. Согласно российским клиническим рекомендациям 2018 г полный ответ (ПО) диагностируется при отсутствии парапротеина в сыворотке и моче по данным иммунофиксации. Количество плазматических клеток в миелограмме должно быть менее 5%. Мягкотканые плазмцитомы при ПО отсутствуют. При ММ, «измеряемой» только по уровню свободных лёгких цепей, соотношение свободных лёгких цепей k/l должно находиться в диапазоне от 0,26 до 1,65. Строгий полный ответ диагностируется при нормальном соотношении свободных лёгких цепей и отсутствии клональных плазматических клеток в КМ по данным иммуногистохимического или иммунофлуоресцентного методов. При ОХЧО М-протеин в сыворотке определяется только при иммунофиксации. При частичном ответе (частичная ремиссия) (ЧО) уровень М-градиента в сыворотке должен уменьшиться на ≥ 50 %, а в моче на ≥ 90 %, или абсолютное количество М-протеина в моче должно быть < 200 мг/сут. При ММ, определяемой только по уровню свободных лёгких цепей иммуноглобулинов, ЧО устанавливается при снижении разницы уровня «вовлечённых» и «невовлечённых» свободных лёгких цепей иммуноглобулинов на 50 %. Стабилизация определяется как несоответствие показателей критериям ПО, ОХЧО или ЧО или прогрессирования миеломы. Прогрессия заболевания диагностируется при повышении уровня М-градиента

на ≥ 25 % от наименьшего достигнутого уровня в сыворотке (увеличение на ≥ 5 г/л), в моче (увеличение на ≥ 200 мг/сут). Для пациентов с «неизмеряемой» болезнью прогрессирование устанавливается при увеличении разницы между «вовлечёнными» и «невовлечёнными» свободными лёгкими цепями иммуноглобулинов на 100 мг/л. Также о прогрессировании свидетельствуют увеличение числа плазматических клеток в КМ (не менее 10 %), появление новых очагов в костях или увеличение размеров ранее определяемых, появление мягкотканых плазмочитом или увеличение их размеров, гиперкальциемия (скорректированный уровень кальция сыворотки $>11,5$ мг/дл или $2,75$ ммоль/л) [39].

Биомаркёры в качестве предикторов неблагоприятного течения ММ

Одним из таких показателей является PCLI —показатель пролиферации плазматических клеток костного мозга, который является значимым и независимым предиктором выживаемости у пациентов с недавно диагностированной множественной миеломой [37], а у пациентов с ММ в фазе плато является неблагоприятным параметром, который может предсказывать короткое время до прогрессирования заболевания и летального исхода [41]. Также показано, что PCLI имеет прогностическую значимость в качестве фактора риска прогрессии при тлеющей ММ [42].

Минимальная остаточная болезнь (МОБ) – показатель количества остаточных клональных плазматических клеток в костном мозге, измеряемый методом проточной цитофлуориметрии, в последнее время вошедший в рутинную практику для оценки ответа ММ перед ауто-ТГСК, показал связь с общей выживаемостью больных и высоким риском раннего рецидива при сохранении положительных значений на момент ауто-ТГСК.

Соотношение свободных лёгких цепей - маркер, используемый в стандартной диагностике и оценке ответа ММ, в исследованиях показал также корреляцию с плохим прогнозом при вовлечении большого количества свободных лёгких цепей. Аномальное соотношение свободных лёгких цепей перед ауто-ТГСК коррелировало с ранним рецидивом ММ. Нарушение

соотношения свободных лёгких цепей при тлеющей миеломе является предиктором ранней трансформации в симптомную миелому [43].

Хотя маркеры, используемые в настоящее время в диагностике и оценке ММ, показывают многообещающие результаты, заболеваемость и смертность при этом заболевании по-прежнему высоки, а новые программы терапии не приводят к полному излечению заболевания. Поэтому поиск новых и более информативных диагностических и прогностических биомаркёров продолжает вызывать глобальный интерес. В этом направлении активно исследуется прогностическая значимость ангиогенных факторов, микро-РНК, а также протеиномного профиля и ряда иммунологических показателей.

В 2015 году опубликовано исследование, в котором была показана роль кластера микроРНК-15a/16-1, расположенного на хромосоме 13q14, в регуляции критических генов, связанных с пролиферацией клеток, апоптозом и лекарственной устойчивостью при ММ. Снижение экспрессии данного маркера было связано с укорочением общей и безрецидивной выживаемости [44].

Также в 2015 году были опубликованы результаты исследования прогностической значимости молекулы PD-L1 в ответе на лечение и выживаемости у пациентов с ММ. Общий уровень ответа на лечение был выше у пациентов с низким уровнем PD-L1. Пациенты с более высоким содержанием PD-L1 ($> 2,783$ нг/мл) характеризовались меньшей выживаемостью без прогрессии [45].

Недавние исследования показали, что костноспецифический транскрипционный фактор Runx2 экспрессируется в первичных клетках ММ человека значительно выше, чем в плазматических клетках здоровых доноров и пациентов с MGUS. При этом сверхэкспрессия Runx2 в клетках ММ ассоциирована с агрессивным фенотипом ММ и коррелирует с плохим прогнозом [46].

Для улучшения кровоснабжения опухоли, которое способствует её быстрому росту, опухолевые клетки активируют ангиогенез за счёт усиления продукции активаторов (проангиогенные факторы) ангиогенеза или снижения

факторов, подавляющих ангиогенез (антиангиогенных факторов). К проангиогенным маркерам относятся фактор роста гепатоцитов (HGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF) и ангиопоэтины [47]. При ММ, выявлено возрастание уровня VEGF, HGF, ангиопоэтина и продемонстрировано потенциальное диагностическое и прогностическое значение этих факторов [48; 49; 50]. Более того, в экспериментальных исследованиях подавление VEGF с помощью химиотерапевтических агентов и продуктов растительного происхождения значительно снижает клеточную пролиферацию и увеличивает апоптоз опухолевых плазматических клеток.

1.3. Иммунные нарушения в патогенезе ММ

Развитие ММ сопряжено с выраженными иммунными дисфункциями, которые проявляется нарушениями не только В-клеток, но и других иммунных клеток, в частности, Т-клеток, НК-клеток, макрофагов и дендритных клеток. Кроме того, прогрессия заболевания сопряжена с экспансией иммуносупрессивных клеток, таких как Трег и МС [40].

Изменения в компартменте Т-клеток затрагивают как CD4, так и CD8 Т-лимфоциты. Наиболее часто описываемым изменением у пациентов с ММ является снижение количества CD4⁺ Т-лимфоцитов, что сопряжено с более низкой выживаемостью без прогрессирования и общей выживаемостью и более высокой вероятностью рецидива [51]. При этом соотношение Th1/Th2 по мнению разных авторов может меняться как в сторону увеличения, так и уменьшения [52; 53]. Также описано возрастание субпопуляции Th17, экспансия которой индуцируется факторами, продуцируемыми опухолевыми клетками TGF- β и IL-6 [54; 55]. Что касается цитотоксических Т-клеток, прогрессирование заболевания ассоциируется с истощением субпопуляции CD8⁺ Т-клеток памяти [56]. CD8⁺ Т-лимфоциты характеризуются сниженной продукцией IL-2, IL-6 и интерферона гамма (IFN- γ), что ослабляет их цитотоксическую активность [57]. Кроме того, цитотоксичность Т-клеток подавляется растворимыми факторами миеломных клеток, в частности, TGF- β ,

который ингибирует IL-2-зависимую пролиферацию и созревание Т-клеток и препятствует приобретению эффекторных функций наивными Т-клетками [58].

Активность эффекторных Т-лимфоцитов также ингибируется иммуносупрессивным нуклеозидом аденозином, образующимся из АТФ или НАД⁺ после последовательных каталитических реакций, инициируемых поверхностной молекулой CD38 в клетках ММ [59]. Подавление функций Т-клеток может быть также связано с экспрессией миеломными клетками лиганда к ингибиторному рецептору PD-1 на поверхности Т-клеток. Связывание PD-1 с лигандом подавляет пролиферацию, цитотоксическую активность и продукцию Th1 цитокинов [40]. Растворимая форма PD-L1, которая высвобождается с поверхности опухолевых клеток, также обладает иммуносупрессивной активностью [60]. Действительно, высокие уровни растворимого PD-L1 в сыворотке крови связаны с плохим прогнозом у пациентов с ММ, а клетки ММ, несущие на поверхности PD-L1, отличаются более высокими уровнями экспрессии антиапоптотических белков [61] и проявляют большую лекарственную устойчивость [62].

В то время, как содержание и функции эффекторных Т-клеток при ММ снижены, количество и функциональная активность Т-регуляторных клеток, обладающих супрессорной функцией и подавляющих противоопухолевый иммунитет, напротив, возрастают [63; 64]. Считается, что увеличения Т-регуляторных клеток играет важную роль в ускользании клеток миеломы от иммунной системы. Увеличение Т-регуляторных клеток возникает уже на ранней стадии развития заболевания, поскольку описано у пациентов с тлеющей ММ. Кроме того, показано, что количество Трег при симптоматической ММ выше, чем у пациентов с длительным контролем заболевания. При этом содержание Трег имеет прогностическую значимость, поскольку более высокий уровень Трег ассоциирован с меньшей общей выживаемостью [64; 65].

Угнетение противоопухолевого иммунитета проявляется также в подавлении функций NK-клеток. Показано, что функции NK-клеток в КМ

ингибируются иммуносупрессивными факторами – аденозином, который подавляет литическую активность NK-клеток [66], и/или TGF- β , который ингибирует дифференцировку функциональных CD16⁺ NK-клеток из их CD16-предшественников [67].

Нарушения в гуморальном звене у больных ММ проявляются снижением количества CD19⁺ В-клеток, содержание которых обратно коррелирует со стадией заболевания и угнетением секреции поликлональных иммуноглобулинов. Кроме того, у больных с клинической манифестацией ММ отмечается возрастание регуляторных В-клеток с фенотипом CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} [68], поддерживающих опухолевые клетки, как за счёт подавления противоопухолевой активности NK-клеток, так и за счёт продукции IL-10 [69].

Исследования антигенпрезентирующих клеток у больных ММ выявили дефектность дендритных клеток, в частности, снижение их способности к стимуляции Т-клеток, тогда как данные относительно изменений в содержании и фенотипе дендритных клеток достаточно противоречивы. Также показано, что дендритные клетки в КМ пациентов могут поддерживать рост опухолевых клеток и защищать их от действия цитотоксических Т-лимфоцитов, что, по-видимому, связано с изменением свойств дендритных клеток, в частности, сменой их стимуляторной активности на толерогенную [70;71].

Данные относительно макрофагов, в особенности, опухоль-ассоциированных макрофагов, локализованных в КМ, свидетельствуют о поляризации последних в сторону M2 противовоспалительных/иммуносупрессивных макрофагов. Костномозговые макрофаги при ММ характеризуются высокой продукцией IL-6, IL-10, проангиогенных факторов (таких как фактор роста эндотелия сосудов), металлопротеиназ и циклооксигеназы-2 [72], обеспечивающих оптимальную среду для роста клеток ММ. Так, рядом исследователей продемонстрировано, что повышенное количество макрофагов с фенотипом M2 клеток в КМ больных ММ ассоциируется с неблагоприятным прогнозом и повышенной

плотностью микрососудов [73]. Также выявлена отрицательная корреляция между экспрессией M2-ассоциированных маркеров (CD163+ и CD206+) с показателями общей выживаемости пациентов с ММ [74].

Таким образом, иммуносупрессия является общей характеристикой ММ. Это состояние в основном связано с изменениями количества и функциональности основных популяций клеток иммунной системы. С нарастанием иммуносупрессии связана эволюция заболевания от MGUS до симптомной ММ. Иммуносупрессия осуществляется клетками ММ как за счёт секреции растворимых факторов, которые ингибируют функцию иммунных эффекторных клеток, так и за счёт рекрутирования иммуносупрессивных популяций и изменений в экспрессии супрессорных молекул. При этом, учитывая, что растворимые факторы и прямые межклеточные взаимодействия регулируют миграцию плазматических клеток ММ и хоуминг в нишу КМ, факторам костномозгового микроокружения придаётся особое значение в патогенезе ММ [58; 23].

Взаимодействия между злокачественными плазматическими клетками и другими клетками КМ играют важную роль в выживании и росте опухолевого клона, а также, возможно, участвует в развитии лекарственной устойчивости. Клеточные и неклеточные компоненты костномозговой ниши способствуют созданию иммуносупрессивного микроокружения опухоли, которое поддерживает рост и выживание клеток ММ. В последние годы появляется все больше доказательств того, что микроокружение опухоли в КМ играет ключевую роль в прогрессии ММ и именно оно может стать мишенью для терапии [74].

Опухолевое микроокружение представляет микросреду, которая образуется в результате взаимодействия и образования перекрёстных связей между опухолевыми клетками и формирующими нишу различными типами клеток, включая инфильтрирующие иммунные, ангиогенные, эндотелиальные и стромальные клетки. В формировании микроокружения также принимают участие белки внеклеточного матрикса и растворимые факторы - внеклеточные

сигнальные молекулы, хемокины, цитокины, факторы роста, а также метаболические регуляторы. Среди клеток опухолевого микроокружения при ММ выделяют гемопоэтические и негемопоэтические клетки. Пул негемопоэтических клеток включает мезенхимальные стволовые клетки и их производные стромальные клетки, а также эндотелиальные клетки и перициты, адипоциты, остеобластные клетки, остеокласты и симпатические нейроны с ассоциированными с ними шванновскими клетками. Гемопоэтическое микроокружение включает лимфоидные и миелоидные клетки, участвующие в реакциях врождённого и приобретённого иммунитета – макрофаги, дендритные клетки, МС, Т- и В-лимфоциты, а также стволовые кроветворные клетки и другие гемопоэтические клетки, участвующие в иммунной модуляции и регуляции миеломных клеток [75].

Созревание и дифференцировка опухолевого клона при ММ подвержена аутокринной и паракринной регуляции, которая осуществляется при тесном взаимодействии опухолевых клеток с клетками костномозговой ниши. Соответственно, нарушения в иммунной системе, в том числе в компартменте иммунных клеток микроокружения, сопровождающиеся изменением продукции цитокинов, играют важную роль в патогенезе ММ [76].

Ключевая роль в регуляции опухолевого клона отводится цитокинам. Цитокины играют критическую роль в экспансии опухолевых клеток, прогрессировании ММ, межклеточной адгезии и ангиогенезе. В целом у больных ММ отмечается превалирование активности провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, TNF- α и IFN- γ) над активностью противовоспалительных факторов (рецептора IL-1, IL-4, IL-10, IL-11, TGF- β 1 и липоксин A4) [77].

Считается, что наиболее выраженным стимулирующим действием на пролиферацию опухолевых плазматических клеток обладают IL-6 и IL-1 β . IL-6 является плеiotропным цитокином с разнообразными функциями. Данный цитокин стимулирует рост опухолевых миеломных клеток и подавляет их апоптоз посредством нескольких механизмов, вовлекающих как

провоспалительные, так и противовоспалительные сигнальные пути [77]. Первоначально IL-6 был признан аутокринным фактором, продуцируемым наиболее злокачественными плазматическими клетками, однако более поздние исследования чётко показали, что IL-6 является паракринным фактором, продуцируемым микроокружением, в основном клетками миелоидного происхождения. Также выяснилось, что основными продуцентами IL-6 в КМ являются миелоидные предшественники. Причём IL-6 вызывает экспансию пула миелоидных клеток, продуцирующих второй ключевой фактор для ММ – APRIL, - так называемый лиганд, вызывающий пролиферацию [78].

Другим плейотропным цитокином, который секретируется большим количеством клеток, включая опухолевые плазматические клетки и иммунные клетки микроокружения, является IL-1 β . Данный цитокин играет важную роль в процессах межклеточного взаимодействия, стимулируя продукцию молекул межклеточной, эндотелиально-лейкоцитарной и васкулярно-клеточной адгезии, а также активируя продукцию IL-6 [76;79]. Кроме того, IL-1 усиливает продукцию IL-6 опосредованно через простагландин E2. Согласно ряду исследований, продукция IL-1 связана с клональной эволюцией от MGUS до ММ [76].

1.4. МС: общая характеристика и роль при опухолевом росте

1.4.1. Общая характеристика МС

Популяция миелоидных клеток весьма разнообразна. Мононуклеарные миелоидные клетки включают терминально дифференцированные макрофаги и дендритные клетки, а также моноциты, которые в условиях воспаления дифференцируются в тканях в макрофаги и дендритные клетки. Гранулоцитарные миелоидные клетки включают полиморфноядерные нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и тучные клетки. Активация миелопоэза происходит обычно в ответ на патогенные стимулы и является одним из основных механизмов защиты организма. В периферической крови, в ответ на сильные сигналы, которые обычно поступают в виде молекул, ассоциированных с патогенами (PAMP) или молекулярных структур,

связанных с опасностью (DAMP), увеличивается содержание активированных нейтрофилов и моноцитов. Эта кратковременная активация приводит к усилению фагоцитоза, респираторному взрыву и высвобождению провоспалительных цитокинов. Но постоянная стимуляция, связанная с хронической инфекцией, воспалением или опухолевым ростом, включает относительно слабые сигналы, которые индуцируют умеренный, но стойкий миелопоэз [5]. Образующиеся в этих условиях миелоидные клетки, сходные с нейтрофилами и моноцитами по морфологии и фенотипу, отличаются по геномному профилю, иммунофенотипу и функциональной активности. Основной функциональной характеристикой этих клеток является их мощная способность подавлять различные типы иммунных реакций. Возможно, этот механизм развился как форма защиты от обширного повреждения тканей, вызванного неконтролируемым иммунным ответом, связанным с хроническим воспалением [5].

Нейтрофилы и моноциты с мощной иммуносупрессивной активностью были впервые описаны около 30 лет назад и только позже получили название супрессорных клеток миелоидного происхождения. Во многих исследованиях показано, что эти клетки участвуют в регуляции иммунных реакций при патологических состояниях, включая рак, хронические инфекции, сепсис и аутоиммунитет. Исследования геномных, протеомных и метаболических особенностей МС позволяют определить эти клетки как патологически активированные нейтрофилы и моноциты. При этом сегодня идентифицированы специфические пути, участвующие в приобретении нейтрофилами и моноцитами характеристик МС [6].

Сообщения о супрессорной активности МС стали появляться с начала 1970-х годов. В 1980-х и начале 1990-х годов исследования лабораторий Дайаны Лопес, Джима Талмаджа, М. Риты Янг и Ганса Шрайбера продемонстрировали, что различные типы миелоидных клеток могут подавлять иммунную функцию при опухолевых заболеваниях. Эксперименты, демонстрирующие накопление в селезёнке и опухолях большого количества

этих клеток с мощной иммуносупрессивной активностью, легко воспроизводились на большинстве опухолевых моделей у мышей [80]. Причём выяснилось, что клетки с фенотипом CD11b+Gr-1+ оказались гетерогенной популяцией. В 2007 г. незрелые миелоидные клетки, обладающие супрессорной активностью, были объединены под названием супрессорных клеток миелоидного происхождения [81].

В настоящее время в популяции МС выделяют гранулоцитарные или полиморфоядерные, которые фенотипически и морфологически сходны с нейтрофилами, и моноцитарные, фенотипически и морфологически сходные с моноцитами. Среди моноклеарных клеток (МНК) ПК Г-МС определяются как CD11b+CD14-CD15+ или CD11b+CD14-CD66b+, а М-МС - как CD11b+CD14+HLA-DR-/loCD15-. Клетки Lin- (включая CD3, CD14, CD15, CD19 и CD56) HLA-DR-CD33+ содержат смешанные группы МС, состоящие из более незрелых предшественников. Для этой последней популяции был предложен термин «ранние МС» (Р-МС) [4; 5].

1.4.2. Механизмы иммуносупрессивного действия МС

Ключевым свойством МС является их способность ингибировать иммунный ответ. Хотя МС участвуют в подавлении различных клеток иммунной системы, главными мишенями МС являются Т-клетки. Супрессорная активность МС опосредуется различными механизмами и связана с экспрессией Arg1, iNOS, TGF β , IL-10, COX2, ID), способностью снижать экспрессию L-селектина Т-клетками и многими другими. В последние годы стало ясно, что М-МС и Г-МС могут использовать разные механизмы иммуносупрессии. М-МС подавляют ответы Т-клеток как антиген-специфическим, так и антиген-неспецифическим образом, используя механизмы, связанные с продукцией NO и цитокинов [82]. Г-МС, с другой стороны, способны подавлять иммунные ответы преимущественно антиген-специфическим путём. Индукция антиген-специфической толерантности Т-клеток является одной из основных их характеристик [83] и связана с продукцией активных форм кислорода. Взаимодействие NO с супероксидом

приводит к образованию пероксинитрита, который непосредственно ингибирует Т-клетки, нитрируя рецепторы Т-клеток и снижая их чувствительность к родственным комплексам антигена с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) [84]. Пероксинитрит также снижает связывание антигенных пептидов с молекулами МНС на опухолевых клетках и блокирует миграцию Т-клеток за счёт нитрования специфичных для Т-клеток хемокинов. Продуцируемые МС активные формы кислорода оказывают прямое токсическое действие на иммунные клетки и в высоких концентрациях способны стимулировать экспрессию рецепторов VEGF на МС. Генерируемые МС высокие уровни NO (за счёт активации iNOS) усиливают экспрессию циклооксигеназы 2 (COX-2) и HIF-1 α , что, в свою очередь, активирует синтез простагландина E2 (PGE2) и повышает экспрессию IDO, IL-10, Arg-1 и других маркеров иммуносупрессии, тем самым потенцируя супрессорную активность МС [4].

Наряду с прямым иммуносупрессивным действием на эффекторные Т-клетки МС могут оказывать опосредованные эффекты, связанные с активацией или рекрутированием других субпопуляций клеток с иммуносупрессивной активностью и блокированием миграции эффекторных Т-клеток. Так, МС способны снижать уровни L-селектина на наивных Т-клетках посредством экспрессии этими клетками фермента ADAM17. В результате способность Т-клеток мигрировать в опухолевое микроокружение существенно снижается [85].

В свою очередь, секретируемые МС иммуносупрессивные цитокины (TGF- β и IL-10) вызывают экспансию Трег и усиливают экспрессию в них транскрипционного фактора Foxp3. Недавние исследования также показали, что при раке молочной железы МС могут индуцировать переход нормальных В-клеток в уникальную популяцию регуляторных В-клеток с фенотипом PD-1-PD-L1+, обладающих выраженным супрессорным эффектом на Т-клетки [81]. Кроме того, МС могут вызывать поляризацию макрофагов в сторону M2

противовоспалительных макрофагов с иммуносупрессивными свойствами, тем самым способствуя росту опухоли.

Большое количество высвобождаемых опухолевыми клетками и клетками микроокружения цитокинов, включая IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TGF- β , CCL2, CCL5, S100A8 и S100A9 перепрограммирует незрелые миелоидные клетки в иммуносупрессивные МС и привлекает их в микроокружение опухоли. Все эти растворимые медиаторы регулируют функцию МС посредством активации различных сигнальных путей, таких как Jak/Stat, NF- κ B, циклооксигеназа 2 (ЦОГ-2) и PGE2 [82]. Среди транскрипционных факторов, модулирующих функции МС, важная роль отводится Stat 3, который взаимодействует с фактором транскрипции С/ЕВР, участвующим в миелопоэзе и контроле дифференцировки и пролиферации миелоидных предшественников [3].

1.4.3. МС при онкологических заболеваниях и гемобластозах

За последние 10 лет накоплено большое количество данных, свидетельствующих о важной роли МС в детерминировании опухолевой прогрессии и прогностической значимости этих клеток при различных опухолях. В исследованиях на мышинных моделях опухолей показано, что введение МС значительно усиливает рост опухоли, а снижение числа МС приводит к разрушению метастазов после удаления первичных опухолей [86]. В клинических исследованиях показано, что Г-МС могут служить потенциальным биомаркёром прогрессирования рака шейки матки. При этом сопряженность между содержанием МС и прогнозом была характерна для субпопуляции Г-МС, в то время как возрастание М-МС выявлялось только у больных с метастатическими формами рака шейки матки [87; 88]. Прогностическая значимость М-МС была зарегистрирована при колоректальном раке, раке желудка и поджелудочной железы [89]. Повышенный уровень М-МС, ассоциированный с неблагоприятным клиническим исходом, отмечен у пациентов с продвинутой стадией немелкоклеточного рака лёгкого [90]. Напротив, пациенты с метастатической

меланомой с меньшим количеством М-МС после лечения ипилимумабом имели более высокие показатели общей и безрецидивной выживаемости [90]. Эти данные показывают, что МС также могут иметь значение, как прогностический фактор эффективности лечения при проведении иммунотерапии.

Наряду с солидными опухолями роль МС также продемонстрирована при гемобластозах - новообразованиях, возникающие из гемопоэтических клеток. Среди субпопуляций МС наиболее выраженные изменения при гемобластозах продемонстрированы для М-МС. В опубликованном в 2019 году исследовании Palumbo и соавт. проанализирована клиническая и прогностическая значимость экспансии М-МС при различных гематологических опухолях, включая лимфому, ММ и миелопролиферативные новообразования, в том числе влияние на исход лечения пациентов, проходящих иммунотерапию. При всех рассмотренных нозологиях количество М-МС было увеличено по сравнению со здоровыми донорами [11]. В работе Romano и соавт. показана корреляция высокого содержания Р-МС в периферической крови больных лимфомой Ходжкина на момент диагностики заболевания с неблагоприятным прогнозом на фоне риск-адаптированной терапевтической стратегии [91].

В недавнем исследовании Wang и соавт. показано, что количество М-МС у пациентов с впервые диагностированной и рецидивирующей ДБККЛ положительно коррелирует с прогрессией опухоли и отрицательно — с общей выживаемостью, а IL-35 способствует накоплению М-МС при ДБККЛ [92].

Кроме того, клиническое исследование с использованием леналидомида в сочетании с программой полихимиотерапии R-GDP (ритуксимаб + гемцитабин, цисплатин и дексаметазон) при рецидивирующей/рефрактерной ДБККЛ показало, что после проведения терапии исходно повышенное содержание МС и Трег снижалось и приближалось к норме [93].

Также показано, что у пациентов с экстранодальной NK/Т-клеточной лимфомой общее количество Г-МС и М-МС являются независимыми

прогностическими факторами общей и беспрогрессивной выживаемости. Также в исследованиях было обнаружено, что провоспалительный цитокин IL-17, продуцируемый CD4⁺ Т-клетками пациентов с экстранодальной NK/Т-клеточной лимфомой, может усиливать ингибирующий эффект МС на пролиферацию Т-клеток [94].

Sun и др. обнаружили значительное увеличение Г-МС в КМ взрослых пациентов с ОМЛ с высокой МОБ. Содержание МС в КМ у этих пациентов было значительно выше, чем у пациентов с МОБ средней и низкой степени [95]. В другом исследовании более высокое количество М-МС и Р-МС в ПК больных ОМЛ [96] достоверно коррелировало с более низкой частотой клинико-гематологических ремиссий и более высокой частотой рефрактерно-рецидивирующих форм наряду с низкой общей выживаемостью [97]. При этом было показано, что воздействие на миелобласты химиотерапевтического препарата цитарабина, используемого для лечения ОМЛ, увеличивает продукцию TNF- α , что, в свою очередь, активирует IL-6/STAT3 и NF- κ B, приводя к экспансии МС и усилению их иммуносупрессивной функции [98].

Увеличение МС в периферической крови больных В-клеточным острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) выявлено в ПК [99] и КМ [100], причём возрастание в последнем случае сопряжено со снижением количества М1-макрофагов и эффекторных Т-клеток и увеличением количества М2-макрофагов, а также повышенной экспрессией Т-клетками ингибиторных рецепторов (PD-1 и CTLA-4). У пациентов с острым промиелоцитарным лейкозом показано, что возрастание М-МС связано с IL-13, который продуцируется активированными опухолью лимфоцитами, и уменьшение секреции IL-13 после лечения транс-ретиноевой кислотой (ATRA) сопровождается уменьшением количества МС [101]. При ХМЛ описано возрастание Р-МС с фенотипом CD11b(+) CD14(-) CD33(+) и экспрессией ассоциированных с иммуносупрессией маркеров (IL-10 и ARG1), количество которых снижалось до нормативных значений на фоне лечения ингибиторами тирозинкиназы (иматинибом и дазатинибом) [102; 103]. Дальнейшие

исследования установили, что лечение ингибиторами тирозинкиназы также снижает долю Г-МС, причём у пациентов, получавших дазатиниб, наблюдается также значительное снижение количества М-МС. Следовательно, М-МС могут выступать в качестве прогностического фактора у пациентов с ХМЛ, получающих дазатиниб [104].

В исследовании ХЛЛ повышенные уровни М-МС наблюдались в периферической крови у впервые диагностированных пациентов и были связаны с более низкой выживаемостью [105]. Показано, что после лечения ингибитором тирозинкиназы Брутона ибрутинибом содержание этих клеток может возвращаться к нормальному уровню в течение 1–2 лет [106]. В ходе дальнейших исследований было обнаружено, что у пациентов с ХЛЛ Г-МС обладали более выраженной иммуносупрессивной активностью и в большей степени ассоциировались с неблагоприятным клиническим прогнозом, чем М-МС. При этом выяснилось, что лечение ибрутинибом снижает количество Г-МС, не влияя на содержание М-МС; индуцирует дифференцировку наивных Т-клеток в сторону Th1, и тем самым улучшает микроокружение опухоли при ХЛЛ [106].

Как уже отмечалось выше, многие лекарства или таргетные препараты для лечения гематологических опухолей ингибируют МС, что ставит вопрос о том, имеют ли эти препараты общие или сходные терапевтические механизмы для опухолевых клеток и МС. Более того, недавние исследования также установили, что эпигенетическая и метаболическая регуляция тесно связана с генерацией иммуносупрессивных функций в МС, и, следовательно, комбинация эпигенетических терапевтических агентов (например, азацитидин и децитабин) с традиционными химиотерапевтическими агентами или новыми лекарствами для лечения злокачественных гематологических заболеваний может дать хорошие терапевтические результаты [107].

Суммируя имеющиеся данные о роли МС при опухолевых заболеваниях и, в частности, гемобластозах, можно выделить следующие важные моменты.

1) Наиболее выраженное увеличение М-МС по сравнению со здоровыми донорами отмечено при ХЛЛ и ХМЛ, в меньшей степени при моноклональной гаммапатии и тлеющей миеломе и болезни Вальденстрема [11].

2) Способность МС подавлять NK- и Т-клетки способствует ремоделированию опухолевого микроокружения, формированию ниши для прогрессирования опухоли и ее метастазированию.

3) Увеличение количества МС в ПК при гематологических злокачественных новообразованиях коррелируют с плохим прогнозом. Высокое количество МС более характерно для рефрактерно-рецидивирующего течения заболевания, т.е., как правило, связано с неблагоприятным прогнозом.

4) Методы лечения, нацеленные на МС при гематологических злокачественных новообразованиях, являются привлекательной стратегией.

1.5. МС при ММ

1.5.1. Изменения МС при ММ

Как и в случае других опухолей при ММ иммунная система и опухолевое микроокружение играют ключевую роль в регуляции функций опухолевых клеток (пролиферации, выживании, миграции) и формировании лекарственной резистентности плазматических клеток, а также детерминируют клинические особенности течения ММ. При ММ клеточные компоненты костномозговой ниши вместе с белками внеклеточного матрикса, молекулами адгезии, цитокинами и факторами роста, продуцируемыми как стромальными клетками, так и самими плазматическими клетками, способны защитить опухолевые плазматические клетки от цитотоксического воздействия при проведении противоопухолевой терапии [107; 108].

Поскольку МС при ММ присутствуют в КМ и ПК и, соответственно, могут оказывать влияние на иммунную систему и опухолевые миеломные клетки, изучение роли МС в патогенезе ММ и развитии лекарственной устойчивости, а также исследования МС в качестве возможных факторов прогноза и мишеней для терапии стало сферой интенсивных исследований [96].

Первые исследования в этом направлении продемонстрировали, что у больных с впервые выявленной ММ в периферической крови наблюдается повышенное содержание М-МС (CD14+HLA-DRlow/-) [110]. Позже было показано, что повышенный уровень М-МС при впервые выявленной ММ обнаруживается также в КМ и регистрируется у пациентов с прогрессией. В то же время в фазе ремиссии доля М-МС в крови и КМ не отличалась от показателей у доноров. Относительное содержание М-МС коррелировало с прогрессией, в частности, у пациентов с III стадией было выше, чем у больных I-II стадиями, не коррелировало с уровнем Трег и снижалось после лечения бортезомибом. Причём эффект бортезомиба был непрямым и опосредовался через миеломные клетки (т.е. подавлялась способность последних индуцировать экспансию М-МС) [107].

Более поздние исследования выявили также возрастание Г-МС при ММ. Повышенное содержание Г-МС (CD11b+CD14-CD33+CD15+HLA-DRlow) выявлялось в КМ и ПК и ассоциировалось с активностью заболевания. Также было продемонстрировано, что Г-МС участвуют в ангиогенезе опухоли, а М-МС могут являться предшественниками остеокластов [109]. Значительное накопление CD11b(+) CD14(-) CD33(+) МС в КМ регистрировалось уже у пациентов с впервые диагностированной ММ. Также было показано, что введение мышам миеломных опухолевых клеток уже через неделю вызывало накопление Г-МС в КМ [111]. Стимулирующий эффект миеломных клеток на МС продемонстрирован также в культуре *in vitro*. При культивировании МС (CD11b+CD14-HLA-DR-/lowCD33+CD15+) доноров с клеточными линиями ММ в течение 4-6 дней было отмечено 50-кратное увеличение МС [112].

Впоследствии было продемонстрировано, что значительное увеличение абсолютного и относительного содержания Г-МС (CD11b+CD14-CD33+CD15+HLA-DRlow) в ПК больных ММ регистрируется как в активной фазе, так и в ремиссии. Причём доля этих клеток в КМ у больных ММ в прогрессии была значительно выше, чем в образцах ПК, что не было характерно для больных в ремиссии и доноров [26]. В других исследованиях

были показаны функциональные различия Г-МС больных ММ, MGUS и здоровых доноров. На экспериментальной модели *in vitro* было показано что мезенхимальные стволовые клетки, полученные у пациентов с MGUS и ММ были способны генерировать одинаковое количество МС, но только Г-МС из мезенхимальных клеток больных ММ обладали иммуносупрессивной активностью: 1) повышали продукцию иммуносупрессивных факторов, таких как Arg-1 и TNF α , 2) экспрессировали более высокие уровни PROK2, важного для ангиогенеза и воспалительного процесса, и 3) проявляли способность переваривать костный матрикс.

Исследование группы Wang с соавт. показало, что уровни М-МС в крови положительно коррелировали с рецидивом ММ и отрицательно коррелировали с результатами лечения. Кроме того, выяснилось, что нейтрофилы КМ пациентов с ММ проявляли активность МС, а дальнейшая иммуногеномная идентификация показала, что CD11b + CD13 + CD16 + нейтрофилы при ММ являются Г-МС [29].

1.5.2. Современные подходы к лечению ММ и влияние терапии на содержание и функции МС

Ведущее место в лечении больных ММ принадлежит лекарственным средствам, которые повреждают опухолевые клетки (за счёт блокирования пролиферации и индукции апоптоза) и блокируют ангиогенез. В течение многих десятилетий для лечения ММ использовались различные цитостатические препараты в режиме монотерапии или в виде комбинированной химиотерапии (ХТ). Однако лечение нередко оказывалось неэффективным в силу развития множественной лекарственной устойчивости. Причём смена программы ХТ и использование высокодозных режимов не всегда позволяли преодолеть лекарственную устойчивость. В XXI веке основное значение в лечении ММ приобрели новые противоопухолевые препараты направленного действия (ингибиторы протеасом: бортезомиб, карфилзомиб, иксазомиб, иммуномодуляторы: талидомид, леналидомид, помалидомид, моноклональные антитела: даратумумаб, элутезумаб), которые

используются в первой, второй и третьей линиях терапии в различных комбинациях, а в последнее время — на всех этапах лечения, включая ВДХТ с последующей ауто-ТГСК, а также на этапах консолидации и поддерживающей терапии. Линия терапии определяется как изменение режима лечения, обусловленное рецидивом, побочными эффектами противоопухолевых препаратов или отсутствием ответа на лечение. Программа терапии может содержать один или комбинацию из нескольких препаратов. Повторное использование режима терапии следует рассматривать как новую линию, если это лечение было вызвано прогрессированием заболевания. Больные, получающие поддерживающую или консолидирующую терапию после ауто-ТГСК, относятся к пациентам первой линии терапии [113].

Несмотря на совершенствование тактики лечения ММ заболевание в большинстве случаев остаётся неизлечимым, хотя в последние годы значительно увеличилась общая выживаемость больных. Все текущие усилия сосредоточены на разработке новых диагностических и терапевтических методов в надежде превратить болезнь в излечимую. Пациентам с впервые выявленной ММ в возрасте до 65 лет, а также пациентам 65–70 лет с хорошим соматическим статусом без тяжёлых сопутствующих заболеваний, достигшим ПР, ОХЧО или ЧО после индукционной терапии, рекомендуется выполнение мобилизации ГСК последующего выполнения ауто-ТГСК [39]. Выполнение ауто-ТГСК позволяет существенно уменьшить объем клеток патологического клона, повысить качество ответа, снизить вероятность рецидива и, как следствие, улучшить показатели беспрогрессивной и, нередко, общей выживаемости. Важно подчеркнуть, что несмотря на внедрение в клиническую практику новых лекарственных средств таргетного действия, ауто-ТГСК не утратила своё принципиальное место в лечении больных ММ [114].

При выполнении ауто-ТГСК выделяют несколько этапов - заготовку ГСК, включающую их мобилизацию из КМ в ПК, криоконсервирование и хранение; введение цитостатических препаратов (кондиционирование), инфузию ГСК, посттрансплантационный период. Наибольшее распространение в качестве

режима мобилизации получили подкожные инъекции Г-КСФ и внутривенные инфузии циклофосфида (ЦФА), назначаемые в виде монотерапии или в комбинации друг с другом [114].

Эффект мобилизации ГСК из КМ в ПК при сочетанном назначении цитостатических средств и Г-КСФ опосредован нарушением взаимодействия молекул адгезии VCAM-1 и CXCR4 с их лигандами и экспрессии SDF-1. Дополнительным фактором служит стимуляция кроветворения вследствие постцитостатической аплазии костного мозга.

При анализе оптимального режима кондиционирования при выполнении ауто-ТГСК больным ММ в качестве «золотого» стандарта у пациентов моложе 60 лет рассматривается мелфалан в дозе 200 мг/м² [114; 4]. У пациентов старше 60 лет и (или), имеющих сопутствующую патологию, в частности, нарушение функции почек, доза мелфалана в кондиционировании может быть снижена до 140-100 мг/м².

В последнее десятилетие в терапии ММ активно используются препараты с различными иммуноопосредованными механизмами воздействия на клетки опухоли, а блокирующие противоопухолевый иммунный ответ МС могут представлять собой серьёзное препятствие для иммунотерапии. Поэтому большой интерес представляет исследование эффектов указанных препаратов на количество и функциональную активность МС. При этом МС могут выступать как в качестве терапевтических мишеней, так и биомаркёров эффективности противоопухолевой терапии.

В настоящее время разрабатываются различные стратегии, направленные на инактивацию МС и их иммуносупрессивной функции. Терапевтические подходы таргетного воздействия на МС можно разделить на пять категорий: 1) ингибирование экспансии и рекрутирования МС 2) стимулирование дифференцировки МС в зрелые миелоидные клетки; 3) ингибирование функции МС; 4) ингибирование метаболизма МС; 5) непосредственное истощение МС. Функции МС могут быть подавлены путём блокировки секреции NO, ROS и аргиназы, например, с помощью ингибиторов

фосфодиэстеразы, нитроаспиринов, синтетических тритерпеноидов, ингибиторов ЦОГ-2, ингибиторов ARG1, антигликановых антител, CSF-1R, IL-17 и ингибиторов гистамина. Среди агентов, блокирующих развитие МС, следует также отметить N-бисфосфонаты, модуляторы тирозинкиназ и ингибиторы STAT3 [115]. Имеются данные, что улучшение противоопухолевого иммунитета при использовании антител к CD38 (даратумумаб) у пациентов с ММ связан с уменьшением количества иммуносупрессивных клеток, таких как Трег, В-регуляторных клеток и МС [116]. Показано, что иммуномодулирующие препараты леналидомид и помалидомид снижают экспрессию CCL5 и фактора торможения миграции макрофагов в клетках миеломы, тем самым подавляя образование МС. Причём совместное использование моноклональных анти-CD38 антител, леналидомида и PD-1-ингибиторов может дополнительно сократить количество МС [107].

Несмотря на достаточно длительное использование ингибитора протеасом бортезомиба и иммуномодулирующего средства леналидомида в стандартах лечения ММ, данные об их влиянии на МС остаются неоднозначными. Группа Wang с соавт. обнаружили, что бортезомиб в сочетании с дексаметазоном постепенно снижал уровни М-МС [107]. Однако группа Görgün обнаружила, что *in vitro* комбинация бортезомиба и леналидомида не оказывала воздействия на общее количество и иммуносупрессивную способность Г-МС (CD11b+CD14–HLA-DR–/lowCD33+CD15+) [116].

1.5.3 МС при трансплантации ГСК

Ауто-ТГСК с кондиционированием высокими дозами мелфалана является стандартом терапии в лечении ММ. Тем не менее, роль МС при ауто-ТГСК изучена недостаточно хорошо. Показано, что доля Г-МС в продукте афереза ГСК, полученном после введения Г-КСФ выше, чем в образцах ПК. Данный факт, по-видимому, объясняет наблюдения Favaloro с соавт о более длительном восстановлении лимфоцитов у больных с более высоким содержанием Г-МС в продукте афереза [26]. Таким образом, накопление Г-МС в продукте афереза при проведении мобилизации ГСК может играть негативную роль.

Негативный эффект МС на этапе ауто-ТГСК может также проявляться в индукции резистентности к мелфалану, используемому на этапах кондиционирования. Так, в исследованиях *in vitro* показано, что цитотоксический эффект мелфалана на клетки ММ может подавляться в присутствии М-МС, что объясняет корреляцию плохого клинического исхода после ауто-ТГСК с высоким уровнем М-МС до проведения кондиционирования высокими дозами мелфалана и ауто-ТГСК [117].

Следует отметить, что МС в опухолевом микроокружении при описанных выше гематологических злокачественных новообразованиях играют в основном негативную роль, подавляя противоопухолевый иммунный ответ и стимулируя рост опухолевых клеток, что приводит к прогрессии заболевания. В то же время при трансплантации ГСК обсуждается и позитивная роль МС. Так, МС могут подавлять РТПХ при трансплантации аллогенных ГСК. МС трансплантата, полученного из ПК в процессе афереза после мобилизации ГСК с использованием Г-КСФ, могут сильно подавлять реакции, опосредованные, в первую очередь, Т-клетками и, в меньшей степени, В-клетками и НК-клетками. Отсутствие различия в частоте острой РТПХ при использовании КМ и продукта афереза ПК, несмотря на более, чем в 10 раз большее количество Т-клеток в последнем, объясняется высоким содержанием МС в продукте афереза [17]. Также показано, что продукты сепарации, полученные при мобилизации ГСК с помощью пегилированной формы Г-КСФ, содержат более высокое количество МС, и трансплантация таких продуктов сепарации снижает тяжесть острой РТПХ [118].

Наконец, учитывая способность МС участвовать в формировании костномозговых ниш для стволовых клеток и повышать выживаемость и пролиферацию раковых клеток [119], можно ожидать, что МС в ранние сроки после трансплантации ГСК способны повышать эффективность энграфтинга и восстановление гемопоэза.

1.6. Заключение

Проведённые за последние годы исследования МС позволяют уверенно говорить о том, что эти клетки играют важную роль в регуляции иммунного ответа в норме и при патологии. На данный момент есть чёткое понимание происхождения МС и некоторых механизмов их иммуносупрессивных эффектов. Однако точные механизмы, которые детерминируют дифференцировку нейтрофилов и моноцитов в МС, остаются неясными [6]. Изучение влияния МС при опухолевом росте, в частности на различных этапах терапии больных ММ, патогенетической и прогностической значимости этих клеток в качестве новых биомаркёров течения заболевания и эффективности терапии представляет большой интерес. При этом анализ влияния различных препаратов на содержание и функции МС, а также выяснение роли МС на отдельных этапах противоопухолевой терапии позволяет более обдуманно подходить к назначению препаратов, способных прямо или косвенно влиять на количество и функции МС. Учитывая отсутствие систематизированной информации о субпопуляциях МС и их функциональном статусе в зависимости от стадии, особенностей клинического течения заболевания и терапевтических воздействий, дальнейшие исследования этих клеток может представлять значительный интерес в плане разработки новых прогностических и терапевтических стратегий при ММ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Клиническая характеристика больных и распределение их по группам, дизайн исследования

Диссертационная работа выполнена в дизайне открытого проспективного одноцентрового когортного сравнительного исследования, в которое было включено 112 пациентов (рис.1). Все пациенты на момент исследования, в период с августа 2017 года по март 2023 года, проходили обследование и получали противоопухолевую терапию в гематологическом отделении с блоком ТКМ клиники иммунопатологии НИИФКИ. Перед включением в

исследование всеми пациентами было подписано информированное согласие. Степень достоверности полученных результатов проведенного исследования определялась соответствием дизайна исследования критериям доказательной медицины, репрезентативным объемом клинических наблюдений, количеством выполненных лабораторных и инструментальных исследований. Возраст пациентов варьировал от 38 до 72 лет (медиана 55 лет). Диагноз ММ у всех пациентов был установлен согласно критериям международной рабочей группы по изучению множественной миеломы (IMWG 2014). Для стадирования была использована клиническая классификации Durie-Salmon (1975 г) [36]. Применение более современных классификаций ISS и RISS было невозможно из-за недостаточного количества данных на момент постановки диагноза. По классификации Durie-Salmon у 32 больных была II стадия заболевания, у 77 больных – III стадия, у 3-х пациентов было недостаточно анамнестических данных для установления стадии на момент диагностики заболевания. На момент включения в исследование 106 пациентов уже получали ту или иную противоопухолевую терапию, 6 пациентов были с впервые диагностированной ММ. Миеломную нефропатию с нарушением функции почек разной степени выраженности, оценённой по скорости клубочковой фильтрации СКД-EPI, на момент диагностики заболевания имели 13 пациентов, что соответствовало стадии Б в классификации Durie-Salmon, у 91 больных миеломная нефропатия со снижением СКФ отсутствовала (стадия А), у 8 пациентов данных о почечной функции на момент диагностики заболевания не было.

На момент исследования ПО или ОХЧО был достигнут у 37 человек, ЧО – у 58 пациентов; 11 пациентов были в прогрессии ММ после проведённого лечения, 6 пациентов не получали никакой терапии. По типу парапротеина у 53 пациента был выявлен IgG-каппа вариант, у 18 – IgG-лямбда вариант, IgA каппа у 11 пациентов, парапротеин IgA-лямбда имели 4 участника исследования, у 16 человек диагностирована миелома Бенс-Джонса, у 4 пациентов диагностирована несекретирующая миелома с нарушенным соотношением свободных легких цепей в сыворотке крови и у 6 пациентов на

момент диагностики заболевания не было проведено типирование парапротеина методом иммунофиксации. Количество линий предшествующей противоопухолевой терапии до достижения ответа варьировало от 1 до 3. Первую линию индукции ремиссии проводили бортезомибсодержащими 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). Для проведения исследования все пациенты по предшествующей терапии были разделены на 2 группы: достигшие ответа после одной линии, включающей бортезомибсодержащие режимы (75 человек) и резистентные к бортезомибсодержащим режимам или рецидивировавшие в срок до 12 мес после первой линии пациенты, получившие в качестве второй линии леналидомид-содержащие режимы +/- химиотерапия (31 человек), 6 пациентов не получали противомиеломную терапию до включения в исследование.

Также в исследовании участвовало 23 здоровых донора.

Дизайн исследования



Рисунок 1. Дизайн исследования.

2.2 Забор образцов ПК и выделение МНК

В ходе исследования было получено 230 образцов гепаринизированной ПК от 112 пациентов, в том числе 6 образцов от пациентов с впервые выявленной ММ, 47 образцов крови пациентов, получивших индукционную противоопухолевую терапию перед проведением мобилизации, 11 образцов от пациентов с прогрессией ММ, 33 образца от пациентов после мобилизации ГСК (в день проведения афереза ГСК непосредственно перед процедурой, 39 образцов в день перед проведением ауто-ТГСК (до начала кондиционирования мелфаланом 200 мг/кв м, 56 образцов на этапе выхода приживления

трансплантата после ауто-ТГСК (на 12-16 дни после инфузии ГСК) при количестве лейкоцитов в ПК более $1,5 \times 10^9/\text{л}$, 21 и 17 образцов пациентов через 6 и 12 мес после проведения ауто-ТГСК, соответственно. В силу технических причин части пациентам не удалось организовать исследование МС на всех контрольных точках наблюдения. Группы пациентов, относящихся к разным временным точкам исследования, не различались по возрасту, полу, типу предлеженности, стадии ММ, ответу на терапию. Для исследования выделяли МНК стандартным методом центрифугирования цельной гепаринизированной венозной крови (10 мл) в градиенте плотности фиколла-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.

2.3. Проточная цитофлуориметрия ПК

Методом проточной цитометрии в МНК периферической крови оценивали относительное содержание Г-МС (Lin–HLA-DR–CD33+CD66b+), М-МС (CD14+HLA-DR^{low/–}) и Р-МС (Lin–HLA-DR–CD33+CD66b–), 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. [4] с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния, при этом в область гейтирования включали регион синглетных МНК (лимфоциты и моноциты). На рис. 2 представлена стратегия гейтирования. Для оценки количества М-МС из региона синглетных МНК анализировали распределение CD14 и HLA-DR молекул и клетки с фенотипом CD14+HLA-DR^{low/–} относили к М-МС. Для оценки количества Г-МС и Р-МС выделяли синглетные клетки среди всех МНК по прямому светорассеянию, в котором исследовали

популяцию клеток, не несущих линейные маркеры и молекулу HLA-DR. Далее в области Lin[−]HLA-DR[−] клеток оценивали распределение клеток по экспрессии CD33 и CD66b молекул. Регион CD33⁺CD66b⁺ клеток относили к Г-МС, регион CD33⁺CD66b[−] к Р-МС.

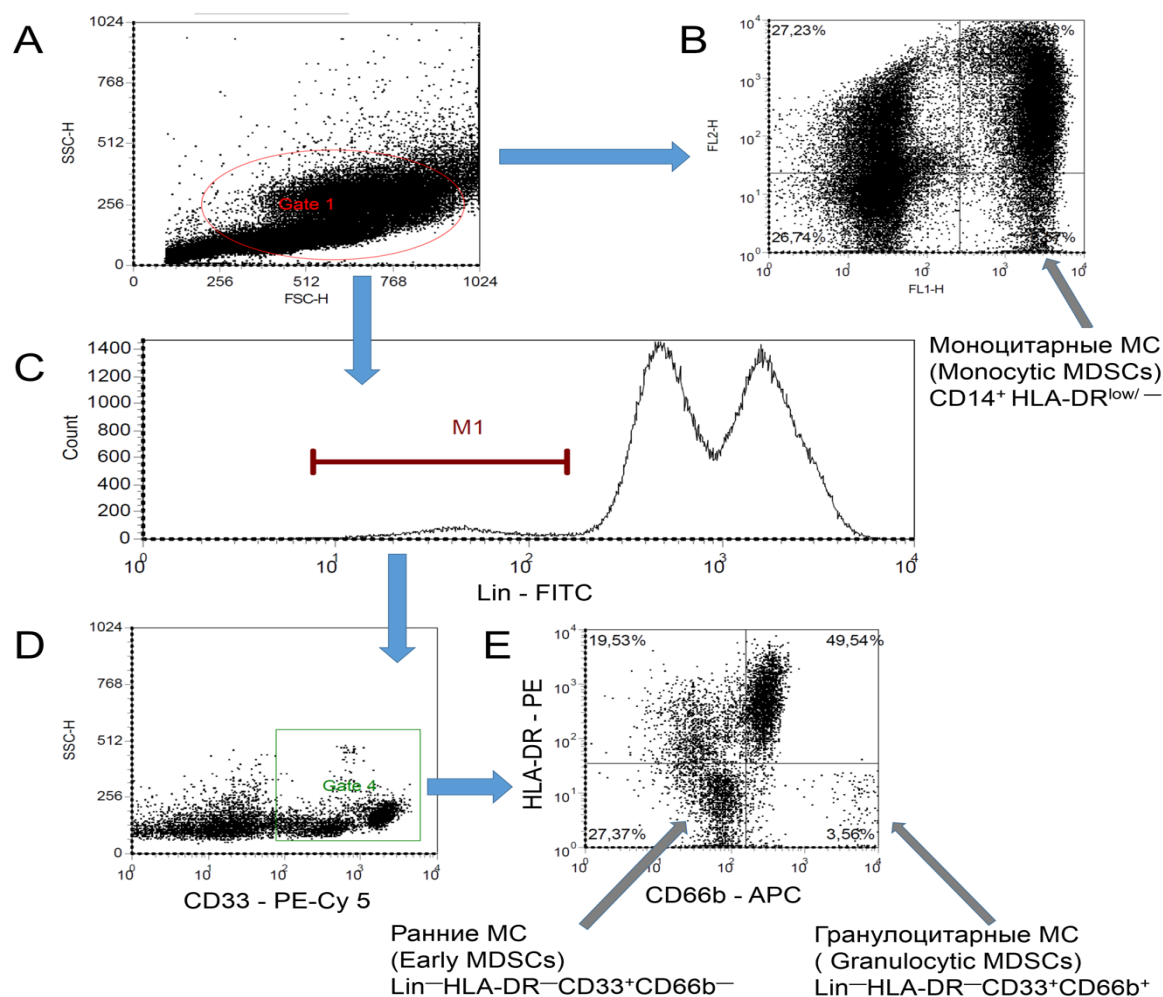


Рисунок 2. Стратегия гейтирования и цитометрическая характеристика субпопуляций миелоидных супрессорных клеток ПК.

Экспрессию молекулы PD-L1 на МС оценивали, используя PE-меченые anti-PD-L1 моноклональные антитела (BD PharMingen, USA), среди Г-МС (Lin[−]HLA-DR[−]CD33⁺CD66b⁺), Р-МС (Lin[−]HLA-DR[−]CD33⁺CD66b[−]) и М-МС (14⁺HLA-DR^{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, описанной выше. Далее проводили процедуру пермеабилзации клеток, используя коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабилзации Transcription Factor Buffer Set (Becton Dickinson, США) и PE-conjugated anti-Arginase-1- (BD PharMingen, США) или PE-conjugated anti-IDO (BD PharMingen, США) моноклональные антитела. Относительное количество МС, экспрессирующих Arg-1, IDO и PD-L1, оценивали среди Lin–HLA-DR–CD33+CD66b+ and Lin–HLA-DR–CD33+CD66b– клеток, и CD14+HLA-DRlow/– клеток. В качестве негативного контроля использовали изотипические антитела, конъюгированные с аналогичными флуорохромами.

2.4. 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 $p < 0,05$.

Глава 3. Результаты собственных исследований

3.1 Содержание МС в периферической крови больных ММ

МС играют существенную роль в прогрессии ММ. Ведущее значение отводится МС, которые генерируются в КМ из миелоидных предшественников в условиях воздействия провоспалительных медиаторов, в том числе опухолевого происхождения, и участвуют в формировании костномозговых

ниш для плазматических клеток. Костномозговые МС, способствуют усилению роста опухолевых клеток, ускользанию их от иммунного надзора и формированию резистентности к противоопухолевой терапии [120]. Возрастание МС не ограничено КМ. Увеличение этих клеток отмечается также в ПК и по данным ряда исследователей сопряжено с прогрессией заболевания [121, 122]. Однако содержание различных субпопуляций периферических МС и их взаимосвязь со стадией, режимами терапии и ответом на лечение при ММ изучена недостаточно.

Учитывая вышесказанное, задачей первого этапа исследования стало проведение оценки содержания субпопуляций циркулирующих МС у пациентов с ММ с учётом клинических особенностей течения заболевания. Основная группа больных ММ на начальном этапе исследования представляла собой пациентов, получивших индукционную противоопухолевую терапию (ИТ) и находящихся на момент исследования в фазе ремиссии.

Как видно из данных таблицы 1, больные ММ в фазе ремиссии демонстрировали статистически значимое, почти двухкратное увеличение относительного и абсолютного количества циркулирующих М-МС ($pU=0,001$ и $pU=0,0003$, соответственно), а также относительного количества Г-МС ($pU=0,049$) в сравнении со здоровыми донорами. Относительное количество Р-МС в группе больных ММ и доноров значимо не различалось. Тем не менее, несмотря на схожее абсолютное количество МНК, абсолютное количество Р-МС у пациентов было значимо снижено ($pU=0,03$) (табл. 2).

Таблица 1 – субпопуляции МС в периферической крови больных ММ в сравнении со здоровыми донорами

Субпопуляция МС	Доноры (n=23)	Больные ММ (n=46-47)	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 ($\times 10^6$ /мл)	36,1(27-47)	57,0 (31,4-110,9)	0,0003
Г-МС ($\times 10^6$ /мл)	0,25 (0,14-0,72)	0,88 (0,47-1,72)	0,29
Р-МС ($\times 10^6$ /мл)	31,6 (25,8-40,7)	18,4 (10,7-25,7)	0,03

Примечание: данные об относительном (%) и абсолютном количестве ($\times 10^9$ /л, $\times 10^6$ /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 между донорами и больными.

Учитывая описанную в литературе связь высокого количества МС в ПК больных ММ с тяжестью заболевания, была проведена сравнительная оценка количества МС у больных со II и, более продвинутой, III стадией ММ. Повышенное относительное количество М-МС, характерное для общей группы больных, было выявлено как у пациентов со II стадией, так и с III стадией ММ (табл. 2). В то же время 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 ($pU=0,04$) по сравнению с группой здоровых доноров выявлялось только у пациентов с III стадией ММ. Кроме того, пациенты с III стадией ММ отличались значимо меньшим относительным количеством Р-МС по сравнению с пациентами II стадии ММ ($pU=0,034$). Таким образом, изменения всех трёх субпопуляций МС (повышение содержания М-МС и Г-МС и снижение Р-МС) были максимальными и достигали статистической значимости у больных с III стадией и были наиболее выраженными в отношении Г-МС и Р-МС.

Таблица 2 - содержание субпопуляций МС в ПК больных ММ в зависимости от стадии заболевания

Субпопуляция МС	Доноры (n=23) 1	II ст (n=16) 2	III ст (n=30-31) 3	pU
М-МС (%)	1,32 (1,18-1,99)	2,19 (1,35-4,69)	2,60 (1,52-7,50)	p1-2 0,039 p1-3 0,006 p2-3 0,45

Г-МС (%)	0,02(0,007-0,09)	0,03 (0,02-0,07)	0,04(0,025-0,18)	p1-2 0,46 p1-3 0,05 p2-3 0,26
Р-МС (%)	1,18 (0,46-1,25)	1,02 (0,75-1,57)	0,80 (0,43-1,11)	p1-2 0,36 p1-3 0,20 p2-3 0,034
МНК ($\times 10^9$ /л)	2,04 (1,7-2,3)	1,97 (1,53-2,24)	1,98 (1,51-2,51)	p1-2 0,10 p1-3 0,14 p2-3 0,49
М-МС ($\times 10^6$ /мл)	37,5 (35,0-51,4)	39,4 (21,6-91,8)	60,6 (32,1-57,4)	p1-2 0,2 p1-3 0,046 p2-3 0,22
Г-МС ($\times 10^6$ /мл)	0,25 (0,14-0,72)	0,53 (0,38-1,44)	1,11 (0,53-3,73)	p1-2 0,57 p1-3 0,036 p2-3 0,11
Р-МС ($\times 10^6$ /мл)	31,6 (25,8-40,7)	18,9 (12,7-25,7)	16,5 (9,7-25,6)	p1-2 0,16 p1-3 0,04 p2-3 0,29

Примечание: данные об относительном (%) и абсолютном количестве ($\times 10^9$ /л, $\times 10^6$ /мл) Г-МС, Р-МС и М-МС среди МНК периферической крови доноров и пациентов с ММ представлены в виде медианы и диапазона интерквартильных значений (IQR); pU – значимость различий показателей между указанными группами.

Пациенты с ММ, включённые в исследование, отличались по количеству линий терапии, что подразумевало получение разного количества курсов ИТ с включением различных противоопухолевых агентов. Соответственно, вариации в предлеченности могли оказать влияние на содержание МС в ПК. В связи с этим, мы проанализировали содержание субпопуляций МС в двух принципиально различающих по терапии группах. Первую группу составили пациенты, достигшие ответа после первой линии терапии, которые получали лечение по программам, включавшим бортезомиб (n=29). Во вторую группу вошли пациенты, резистентные к терапии первой линии (включающей бортезомиб), которые в связи с резистентностью или ранним рецидивом получили две и более линий терапии, включающей леналидомид +/- химиотерапию (n=18). Больные указанных групп не различались по соотношению пациентов со II и III стадиями, которое в группе

1 (бортезомиб) составляло 10 к 19 больных, соответственно, а в группе 2 (леналидомид) – 6 к 12 больных, соответственно ($p=0,06$; $p=0,81$). Чтобы оценить ответ на терапию, мы также дополнительно оценили содержание МС в ПК пациентов с впервые выявленной ММ ($n=6$), т.е. до начала проведения индукционной терапии.

В таблице 3 представлены данные, характеризующие относительное и абсолютное содержание трёх субпопуляций МС в сформированных группах в сравнении со здоровыми донорами и пациентами, не получавшими лечение. Пациенты с впервые диагностированной ММ отличались от здоровых доноров значимо повышенным относительным ($pU=0,05$) и абсолютным ($pU=0,006$) содержанием М-МС, а также тенденцией к повышенному относительному ($pU=0,15$) и абсолютному ($pU=0,06$) содержанию Г-МС. В группе с терапией бортезомибом содержание М-МС и Г-МС было таким же, как у пациентов с впервые диагностированной ММ. Относительное и абсолютное содержание М-МС после терапии в этом случае оставалось достоверно повышенным ($pU=0,001$ и $pU=0,05$, соответственно) в сравнении с донорами, а повышенный уровень относительного ($pU=0,08$) и абсолютного количества ($pU=0,11$) Г-МС проявлялся в виде тенденции. То есть терапия бортезомибом не влияла на содержание М-МС и Г-МС. В группе пациентов, которые получили терапию, включающую леналидомид, содержание М-МС и Г-МС уже не отличалось от донорских значений. Процентное содержание Р-МС у пациентов, не получавших лечение, было более чем в 2 раза ниже по сравнению с донорами ($pU=0,048$). У пациентов, получивших 1 линию терапии бортезомиб-содержащими режимами, доля Р-МС была выше аналогичного показателя в группе больных, не получавших лечение, ММ ($pU=0,05$) и не отличалось от доноров ($pU=0,96$). В группе пациентов, получивших в качестве второй, третьей или четвертой линий леналидомид-содержащие режимы ИТ, относительное количество Р-МС оставалось на том же уровне, что и у пациентов с терапией бортезомибом. При этом несмотря на более низкое абсолютное количество МНК у пациентов с терапией бортезомибом и

леналидомидом, чем у пациентов, не получавших противоопухолевую терапию, ($p=0,003$ и $pU=0,015$, соответственно) абсолютное содержание Р-МС в указанных группах значимо не отличалось от такового у пациентов с впервые выявленной ММ (табл. 3).

Таблица 3 - содержание субпопуляций МС в периферической крови больных ММ в зависимости от режима противоопухолевой индукционной терапии

Субпопул-ция МС	Доноры (n=23), %	Впервые выявленная ММ (n=5-6)	Бортезомиб-содержащие режимы (n=29)	Леналидомид-содержащие режимы (n=18)	pU
	1	2	3	4	
М-МС (%)	1,32 (1,18-1,99)	2,15 (1,34-2,79) $p_{1-2} 0,05$	2,80 (1,62-5,78) $p_{1-3} 0,001$	1,71 (1,19-5,28) $p_{1-4} 0,19$	$p_{2-3} 0,39$ $p_{2-4} 0,82$ $p_{3-4} 0,25$
Г-МС (%)	0,02 (0,007-0,09)	0,04 (0,02-0,29) $p_{1-2} 0,15$	0,05 (0,02-0,17) $p_{1-3} 0,08$	0,03 (0,02-0,06) $p_{1-4} 0,28$	$p_{2-3} 0,89$ $p_{2-4} 0,64$ $p_{3-4} 0,43$
Р-МС (%)	1,18 (0,46-1,25)	0,55 (0,33-0,81) $p_{1-2} 0,048$	0,86 (0,67-1,38) $p_{1-3} 0,92$	0,90 (0,49-1,15) $p_{1-4} 0,37$	$p_{2-3} 0,05$ $p_{2-4} 0,21$ $p_{3-4} 0,47$
МНК ($\times 10^9/\text{л}$)	2,04 (1,7-2,3)	3,38 (2,99-5,22) $p_{1-2} 0,009$	1,97 (1,47-2,45) $p_{1-3} 0,11$	1,88 (1,59-2,45) $p_{1-4} 0,049$	$p_{2-3} 0,003$ $p_{2-4} 0,015$ $p_{3-4} 0,82$
М-МС ($\times 10^6/\text{мл}$)	37,5 (35,0-51,4)	87,05 (84,4-151,9) $p_{1-2} 0,006$	57,0 (32,1-106,7) $p_{1-3} 0,05$	53,3 (25,3-125,1) $p_{1-4} 0,33$	$p_{2-3} 0,29$ $p_{2-4} 0,38$ $p_{3-4} 0,98$
Г-МС ($\times 10^6/\text{мл}$)	0,25 (0,14-0,72)	5,8 (0,56-16,2) $p_{1-2} 0,06$	1,02 (0,39-2,50) $p_{1-3} 0,11$	0,68 (0,50-1,36) $p_{1-4} 0,11$	$p_{2-3} 0,16$ $p_{2-4} 0,25$ $p_{3-4} 0,75$
Р-МС ($\times 10^6/\text{мл}$)	31,6 (25,8-40,7)	14,3 (5,8-29,5) $p_{1-2} 0,32$	16,6 (10,0-27,7) $p_{1-3} 0,43$	21,2 (14,2-25,7) $p_{1-4} 0,35$	$p_{2-3} 0,65$ $p_{2-4} 0,63$ $p_{3-4} 0,72$

Примечание: данные об относительном (%) и абсолютном количестве ($10^6/\text{мл}$) 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 показателей между указанными группами.

Для того, чтобы выяснить, как количество МС у больных ММ ассоциируется с глубиной достигнутого на ИТ ответа, мы сравнили содержание субпопуляций МС в группах пациентов, имеющих ПО или ОХЧО (n=22) и ЧО (n=25). Кроме того, было проанализировано содержание циркулирующих МС у пациентов, находящихся в прогрессии ММ на момент исследования вследствие рецидива или рефрактерности к проводимой терапии (n=11). В этой группе II стадия регистрировалась у 3-х пациентов и III стадия – у 8-и больных. Пять из 11 пациентов в качестве второй линии терапии получили леналидомид. У четырёх пациентов данной группы не был получен ответ на очередную программу терапии и в ближайшие два месяца была констатирована смерть на фоне неконтролируемой прогрессии заболевания. Оценка ответа проводилась по критериям IMWG (международной рабочей группы по ММ).

Пациенты в группах с ПО/ОХЧО и ЧО не различались по содержанию субпопуляций МС (табл. 4). В обеих анализируемых подгруппах отмечалось достоверное повышенное содержание доли М-МС и тенденция к увеличению Г-МС на фоне отсутствия значимых изменений в содержании Р-МС. Тем не менее, в группе с ПО/ОХЧО абсолютное количество М-МС было повышенным, тогда как в группе с ЧО содержание этих клеток было сходным с таковым у доноров. Поскольку у больных с впервые диагностированной ММ и в общей группе пролеченных пациентов уровень М-МС был повышен, мы ожидали увидеть дальнейшее возрастание МС у пациентов с прогрессией/рецидивом ММ после проведенной терапии. Однако, увеличение М-МС в группе с прогрессией (табл. 4) не достигало статистической значимости и было достоверно менее выраженным, чем у пациентов, ответивших на терапию. В частности, относительное содержание М-МС у больных с прогрессией было достоверно ниже, чем в группе с ПО/ОХЧО ($pU=0,034$), а абсолютное количество М-МС – ниже, чем в группах пациентов с ПО/ОХЧО и ЧО (для всех случаев $pU<0,05$). С другой стороны, отличительным признаком рецидива/прогрессии являлось выраженное и достоверное снижение относительного и абсолютного количества Р-МС как в сравнении с донорами,

так и с группами пациентов, ответивших на терапию. Характерно, что снижение Р-МС сочеталось с достоверным возрастанием Г-МС, абсолютное содержание которых в группе с рецидивом достигало наибольших значений.

Таблица 4 - содержание субпопуляций МС в периферической крови больных ММ с различным типом ответа на противоопухолевую индукционную терапию

Субпопуляция МС	Доноры (n=23-25) 1	ПО/ОХЧО (n=21-22) 2	ЧО (n=25) 3	Прогрессия (n=11) 4	pU
М-МС (%)	1,32 (1,18-1,99)	2,85 (1,49-7,50) p ₁₋₂ 0,006	2,10 (1,52-5,05) p ₁₋₃ 0,026	1,70 (1,2-1,8) p ₁₋₄ 0,16	p ₂₋₃ 0,28 p ₂₋₄ 0,034 p ₃₋₄ 0,31
Г-МС (%)	0,02 (0,007-0,09)	0,04 (0,025-0,16) p ₁₋₂ 0,08	0,03 (0,02-0,08) p ₁₋₃ 0,22	0,06 (0,02-0,14) p ₁₋₄ 0,053	p ₂₋₃ 0,91 p ₂₋₄ 0,59 p ₃₋₄ 0,34
Р-МС (%)	1,18 (0,46-1,25)	0,88 (0,67-0,98) p ₁₋₂ 0,39	0,92 (0,43-1,52) p ₁₋₃ 0,96	0,23 (0,14-0,63) p ₁₋₄ 0,008	p ₂₋₃ 0,72 p ₂₋₄ 0,002 p ₃₋₄ 0,038
МНК ($\times 10^9$ /л)	2,04 (1,7-2,3)	1,87 (1,43-2,52) p ₁₋₂ 0,006	1,98 (1,61-2,45) p ₁₋₃ 0,015	1,53 (1,17-1,83) p ₁₋₄ 0,0001	p ₂₋₃ 0,39 p ₂₋₄ 0,09 p ₃₋₄ 0,02
М-МС ($\times 10^6$ /мл)	37,5 (35,0-51,4)	67,2 (33,9-123,0) p ₁₋₂ 0,02	40,1 (22,9-98,9) p ₁₋₃ 0,40	20,3 (18,3-50,6) p ₁₋₄ 0,17	p ₂₋₃ 0,21 p ₂₋₄ 0,014 p ₃₋₄ 0,05
Г-МС ($\times 10^6$ /мл)	0,25 (0,14-0,72)	1,14 (0,53-3,73) p ₁₋₂ 0,037	0,55 (0,32-1,46) p ₁₋₃ 0,34	1,29 (0,59-3,16) p ₁₋₄ 0,08	p ₂₋₃ 0,17 p ₂₋₄ 0,90 p ₃₋₄ 0,15
Р-МС ($\times 10^6$ /мл)	12,4 (5,93-25,83)	18,4 (12,9-23,5) p ₁₋₂ 0,32	19,5 (8,5-30,0) p ₁₋₃ 0,48	3,7 (1,1-10,5) p ₁₋₄ 0,006	p ₂₋₃ 0,89 p ₂₋₄ 0,0004 p ₃₋₄ 0,011

Примечание: Данные об относительном (%) и абсолютном количестве ($\times 10^9$ /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 показателей между указанными группами.

Учитывая гетерогенность анализируемых пациентов в зависимости от стадии и режимов ИТ, что в свою очередь могло бы также влиять на

содержание циркулирующих МС у пациентов в ремиссии и прогрессии ММ, мы провели многофакторный дисперсионный анализ (табл. 5). 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. Кроме того, уровень этих клеток детерминировался комбинацией факторов стадии и режимов проводимой терапии, а также стадии и ответа на терапию.

Таблица 5 - многофакторный анализ клинических факторов и относительного содержания МС в ПК 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

Суммируя полученные данные, можно заключить, что в целом по группе пациенты с ММ в фазе ремиссии после проведения ИТ характеризуются количественными изменениями всех трёх субпопуляций МС, в частности, достоверно повышенным содержанием М-МС (относительным и абсолютным) и Г-МС (относительным) и снижением абсолютного количества Р-МС. Изменения в содержании МС ассоциированы со стадией заболевания, что в наибольшей степени характерно для Г-МС и Р-МС. Так, если увеличение доли М-МС выявляется как у пациентов со II, так и III стадиями, то достоверное возрастание относительного и абсолютного содержания Г-МС и снижение

абсолютного количества Р-МС регистрируется только у пациентов с III стадией.

Количественные изменения в компартменте МС у больных ММ в фазе ремиссии не являются исключительно следствием индукционной противоопухолевой терапии, поскольку изменения схожей направленности регистрируются у пациентов, не получавших лечения. Так, у пациентов с впервые выявленной ММ регистрируется статистически значимое увеличение М-МС (относительного и абсолютного количества) и Г-МС (абсолютного количества) и снижение Р-МС (относительного количества).

Вместе с тем, различия в режимах терапии сказываются на характере изменений содержания МС, в частности, применение леналидомид-содержащих программ терапии сопровождаются снижением М-МС и Г-МС, уровень которых после лечения уже значимо не отличается от нормативных значений, тогда как при использовании бортезомиб-содержащих режимов абсолютное и относительное содержание М-МС и доля Г-МС (тенденция) сохраняются повышенными. С другой стороны, оба режима терапии ведут к повышению доли Р-МС. Так, в отличие от впервые выявленных больных (со сниженной долей Р-МС), пациенты после ИТ характеризуются более высоким содержанием Р-МС (достоверно для бортезомиба и в виде тенденции - для леналидомида). При этом уровень Р-МС уже статистически значимо не отличается от такового у доноров.

При анализе сопряженности МС с ответом на терапию мы не выявили существенных различий в содержании МС у пациентов с ПО/ОХЧО и ЧО. Тем не менее, повышенное абсолютное количество М-МС и Г-МС сохраняется только в группе с ПО/ОХЧО.

Результаты многофакторного анализа показали, что среди различных клинических факторов, способных влиять на содержание периферических МС у больных ММ в фазе ремиссии наиболее значимым является стадия заболевания либо ее сочетание с режимом терапии/ответом. Данный фактор оказывает сильный и достоверный эффект на содержание Р-МС, в то время как

его влияние в отношении Г-МС и М-МС менее выражено и не достигает статистической значимости. При этом, несмотря на то, что комбинация стадии заболевания с ответом на терапию оказывает более выраженное влияние на содержание М-МС, чем просто стадия заболевания, эффект не достигает статистической значимости.

Больные с прогрессией заболевания или развитием рецидива после ИТ в отличие от пациентов, ответивших на терапию и находящихся в фазе ремиссии, характеризуются наиболее выраженным снижением относительного и абсолютного содержания Р-МС и наиболее высоким уровнем Г-МС. При этом содержание М-МС в данной группе значимо не отличается от такового у доноров, что позволяет предполагать дифференцировку МС преимущественно в направлении Г-МС.

3.2. Экспрессия супрессорных молекул в субпопуляциях МС при ММ

Известно, что ингибирующий эффект МС на иммунные клетки опосредуется различными путями. Среди них важная роль отводится деплеции L-аргинина (вследствие экспрессии аргиназы-1 (Arg1), истощению L-триптофана (вследствие экспрессии индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) и экспрессии ингибиторных «чек-пойнт» молекул (PD-L1). Поскольку оценка указанных молекул позволяет охарактеризовать супрессорный потенциал МС, на следующем этапе мы исследовали содержание клеток, экспрессирующих ингибиторные молекулы Arg-1, IDO и PD-L1 в субпопуляциях МС.

Как видно из данных таблицы 6, в группе здоровых доноров более 90% Г-МС экспрессировали Arg-1. Наряду с этим почти треть Г-МС экспрессировали IDO и PD-L1, также влияющие на супрессорный потенциал Г-МС. В популяциях М-МС и Р-МС наиболее высокая экспрессия была выявлена для PD-L1 (Me 20,5 и 20,2% соответственно), тогда как доля клеток, экспрессирующих Arg-1 и IDO была меньше.

В общей группе больных ММ, достигших ремиссии после ИТ, статистически достоверные изменения в экспрессии исследуемых супрессорных молекул регистрировались исключительно в отношении

агиназы, что проявлялось снижением содержания Arg-1+ клеток в популяции М-МС в сравнении с донорами (pU=0,045) (табл. 6).

Таблица 6- 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 об экспрессии молекул представлены как процент позитивных клеток среди Г-МС, М-МС и Р-МС периферической крови доноров и пациентов с ММ в виде медианы и диапазона интерквартильных значений (IQR). pU – значимость различий показателей между указанными группами.

При исследовании сопряженности между экспрессией ингибиторных молекул со стадией заболевания (табл. 7) уменьшение доли Arg-1+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+клеток проявлялось только у пациентов с III стадией и в виде тренда (pU=0,10). Доля Arg-1+клеток в популяции Р-МС не отличалась от таковой у доноров. Относительное содержание IDO+ и PD-L1+ клеток в субпопуляциях МС у больных ММ в фазе ремиссии и доноров не различалось. Таким образом, из всех анализируемых супрессорных молекул, единственным маркером, ассоциированным с тяжестью заболевания, являлось снижение доли Arg-1+ клеток в популяции М-МС.

Таблица 7 - экспрессия ингибиторных молекул в МС у пациентов с множественной миеломой в зависимости от клинической стадии заболевания

Субпопуляция МС	Маркер	Доноры (n=5-10) 1	Больные ММ II ст. (n=5-7) 2	Больные ММ III ст. (n=5-13) 3	pU
Г-МС	Arg-1	95,6 (89,3-97,2)	94,3 (90,8-97,1) p ₁₋₂ 0,67	88,5 (76,4-93,2) p ₁₋₃ 0,10	p ₂₋₃ 0,08
	IDO	20,5 (0,28-41,7)	21,7 (13,6-46,2) p ₁₋₂ 0,72	31,2 (5,7-47,1) p ₁₋₃ 1,0	p ₂₋₃ 0,56
	PD-L1	35,4 (11,9-39,4)	13,1 (1,9-39,6) p ₁₋₂ 1,0	22,6 (4,4-37,5) p ₁₋₃ 0,92	p ₂₋₃ 0,89
Р-МС	Arg-1	7,5 (5,6-17,6)	13,8 (6,9-22,5) p ₁₋₂ 0,39	8,4 (3,3-44,0) p ₁₋₃ 1,0	p ₂₋₃ 0,50
	IDO	4,1 (0,29-11,5)	1,2 (0,54-6,0) p ₁₋₂ 0,82	4,8 (3,3-7,6) p ₁₋₃ 1,0	p ₂₋₃ 0,08
	PD-L1	20,2 (8,7-37,7)	21,4 (15,1-31,9) p ₁₋₂ 0,55	8,6 (7,3-40,1) p ₁₋₃ 0,62	p ₂₋₃ 0,33
М-МС	Arg-1	9,6 (7,3-29,6)	4,4 (0,3-19,2) p ₁₋₂ 0,12	0,53 (0,20-22,3) p ₁₋₃ 0,045	p ₂₋₃ 0,87
	IDO	8,0 (2,9-41,9)	6,3 (1,6-16,4) p ₁₋₂ 0,88	23,9 (12,5-39,7) p ₁₋₃ 0,08	p ₂₋₃ 1,0
	PD-L1	20,5 (8,1-39,7)	14,2 (1,0-37,3) p ₁₋₂ 0,74	23,1 (14,3-59,9) p ₁₋₃ 0,18	p ₂₋₃ 0,36

Примечание: данные об экспрессии молекул представлены как процент позитивных клеток среди Г-МС, М-МС и Р-МС периферической крови доноров и пациентов с ММ в виде медианы и диапазона интерквартильных значений (IQR). pU – значимость различий показателей между указанными группами.

При анализе экспрессии супрессорных молекул в зависимости от режима ИТ выяснилось, что снижение экспрессии Arg-1 в М-МС наблюдалось только в группе пациентов, получивших леналидомид в качестве 2-ой или последующих линий ИТ. Так, относительное количество Arg-1-экспрессирующих М-МС в этой группе было в 35 раз ниже (Me 0,27 %) по сравнению со здоровыми донорами (pU=0,016). У пациентов, получивших ИТ, включающую бортезомиб, снижения Arg-1+ М-МС не наблюдалось. В то же время особенностью этой группы было более чем 2-кратно повышенное количество PD-L1+ клеток в субпопуляции М-МС по сравнению с донорами (pU=0,03).

При сравнении групп пациентов с различными режимами терапии больные, получившие леналидомид отличались достоверно меньшим количеством PD-L1 в популяции М-МС ($pU=0,013$), а также тенденцией к более низкому содержанию Arg-1+ М-МС ($pU=0,11$), PD-L1- и IDO-экспрессирующих Р-МС ($pU=0,09$ и $pU=0,08$, соответственно), а также IDO-экспрессирующих Г-МС ($pU=0,08$) по сравнению с оппозитной группой пациентов, получивших только 1 линию ИТ с бортезомибом (табл. 8).

Таблица 8 - оценка экспрессии супрессорных молекул в МС у пациентов с ММ в зависимости от количества линий и режимов ИТ

Субпопуляция МС (%)	Маркер	Здоровые доноры (n=5-10) 1	Больные ММ бортезомиб +ХТ (n=4-11) 2	Больные ММ +леналидомид (n=5-6) 3	pU
Г-МС	Arg-1	95,6 (89,3-97,2)	90,8 (77,7-93,9)	92,7 (91,0-94,3)	$p_{1-2} 0,43$ $p_{1-3} 0,61$ $p_{2-3} 0,87$
	IDO	20,5 (0,28-41,7)	29,1 (16,4-47,1)	6,2 (1,7-10,8)	$p_{1-2} 0,82$ $p_{1-3} 0,35$ $p_{2-3} 0,08$
	PD-L1	35,4 (11,9-39,4)	9,1 (3,4-37,0)	32,3 (20,0-51,7)	$p_{1-2} 0,89$ $p_{1-3} 0,74$ $p_{2-3} 0,82$
Р-МС	Arg-1	7,5 (5,6-17,6)	8,4 (6,3-34,4)	21,8 (13,8-29,8)	$p_{1-2} 0,29$ $p_{1-3} 0,28$ $p_{2-3} 0,83$
	IDO	4,1 (0,29 -1,5)	4,8 (1,7-10,3)	0,38 (0,09-0,67)	$p_{1-2} 0,37$ $p_{1-3} 0,44$ $p_{2-3} 0,08$
	PD-L1	20,2 (8,1-39,7)	18,3 (8,3-42,8)	7,0 (0,78-8,7)	$p_{1-2} 0,36$ $p_{1-3} 0,16$ $p_{2-3} 0,09$
М-МС	Arg-1	9,6 (7,3-29,6)	11,7 (0,35-22,9)	0,27 (0,2-0,43)	$p_{1-2} 0,73$ $p_{1-3} 0,016$ $p_{2-3} 0,11$
	IDO	8,0 (2,9-41,9)	17,5 (10,2-23,9)		$p_{1-2} 0,17$ $p_{2-3} 1,0$
	PD-L1	20,5 (8,1-9,7)	45,6 (17,4-62,8)	12,0 (1,0 - 17,4)	$p_{1-2} 0,03$ $p_{1-3} 0,29$ $p_{2-3} 0,013$

Примечание: данные об экспрессии молекул представлены как процент позитивных клеток среди Г-МС, М-МС и Р-МС периферической крови доноров и пациентов с ММ в виде медианы и диапазона интерквартильных значений (IQR). pU – значимость различий показателей между указанными группами.

Поскольку снижение экспрессии Arg-1 в циркулирующих М-МС было выявлено у пациентов, ответивших на терапию, и эта группа включала больных с ПО/ОХЧО и ЧО, представлялось важным выяснить, есть ли связь между экспрессией супрессорных молекул в МС и глубиной достигнутого ответа. Снижение экспрессии Arg-1 в М-МС в виде тенденции по сравнению с донорами ($pU=0,14$) регистрировалось только у пациентов с ПО/ОХЧО, т.е. с более глубоким ответом. Доля Arg-1+, IDO+ и PD-L1+ клеток в субпопуляциях МС у больных с ПО/ОХЧО и ЧО значимо не различалось. Единственной особенностью, которая проявлялась на уровне тренда, было более высокое содержание PD-L1+ Р-МС у пациентов с ПО/ОХЧО, чем у больных с ЧО ($pU=0,09$).

В отличие от ремиссии прогрессия ММ ассоциировалась с возрастанием экспрессии Arg-1, что проявлялось повышенным содержанием Arg-1+ клеток в субпопуляциях М-МС и Р-МС по сравнению с со здоровыми донорами ($pU=0,05$ и $pU=0,026$, соответственно). Количество Arg-1-экспрессирующих М-МС у пациентов с прогрессией ММ было также значимо выше (Me 18,9%) по сравнению с пациентами с ПО/ОХЧО (Me 0,35%; $pU=0,02$) (табл. 9).

Другой особенностью у пациентов с прогрессией ММ являлась повышенная экспрессия PD-L1 в М-МС, что проявлялось практически 3-кратным возрастанием доли PD-L1+ клеток в сравнении с донорами ($pU=0,009$). В результате более половины клеток в популяции М-МС пациентов этой группы экспрессировали PD-L1. Доля PD-L1+ М-МС у этих пациентов была также достоверно выше, чем у пациентов с ЧО ($pU=0,042$) и на уровне тренда – по сравнению с пациентами с ПО/ОХЧО ($pU=0,16$) (табл. 9).

Таблица 9 -экспрессия супрессорных молекул в МС у больных ММ в зависимости от ответа на ИТ

Субпопуляция МС	маркер	Здоровые доноры (n=5-10) 1	Больные ММ с ПО/ОХЧО (n=2-8) 2	Больные ММ с ЧО (n=5-13) 3	Больные ММ с прогрессией (n=8-9) 4	pU
Г-МС	Arg1	95,6 (89,3-97,2)	90,8 (85,9-94,3) p ₁₋₂ 0,55	91,8 (76,4-95,2) p ₁₋₃ 0,29	94,6 (87,3-98,0) p ₁₋₄ 0,86	p ₂₋₃ 1,0 p ₂₋₄ 0,31 p ₃₋₄ 0,29
	IDO	20,5 (0,28-41,7)	13,6 (10,8-16,4) p ₁₋₂ 0,74	31,2 (27,0-47,1) p ₁₋₃ 0,62	29,8 (12,5 - 45,7) p ₁₋₄ 0,87	p ₂₋₃ 0,25 p ₂₋₄ 0,30 p ₃₋₄ 0,66
	PD-L1	35,4 (11,9-39,4)	21,4 (3,6 - 46,7) p ₁₋₂ 0,71	21,9 (3,8 - 34,7) p ₁₋₃ 0,96	18,0 (7,6 - 24,8) p ₁₋₄ 0,64	p ₂₋₃ 0,79 p ₂₋₄ 0,64 p ₃₋₄ 0,62
Р-МС	Arg1	7,5 (5,6-17,6)	13,8 (6,9-51,9) p ₁₋₂ 0,40	8,4 (3,3-34,4) p ₁₋₃ 0,70	23,9 (16,1-47,2) p ₁₋₄ 0,026	p ₂₋₃ 0,43 p ₂₋₄ 0,30 p ₃₋₄ 0,15
	IDO	4,1 (0,29-11,5)	5,5 (0,7-10,3) p ₁₋₂ 0,27	2,0 (1,7-7,6) p ₁₋₃ 0,75	12,1 (2,8 - 38,2) p ₁₋₄ 0,65	p ₂₋₃ 1,0 p ₂₋₄ 0,61 p ₃₋₄ 0,46
	PD-L1	20,2 (8,7-37,7)	34,9 (20,9 -48,5) p ₁₋₂ 0,35	8,5 (7,0-21,4) p ₁₋₃ 0,62	39,7 (21,7 - 54,3) p ₁₋₄ 0,20	p ₂₋₃ 0,09 p ₂₋₄ 0,76 p ₃₋₄ 0,06
М-МС	Arg1	9,6 (7,3-29,6)	0,35 (0,19-9,9) p ₁₋₂ 0,14	4,4 (0,44-23,5) p ₁₋₃ 0,94	18,9 (6,0-41,2) p ₁₋₄ 0,05	p ₂₋₃ 0,21 p ₂₋₄ 0,02 p ₃₋₄ 0,25
	IDO	8,0 (2,9 - 41,9)	11,7 (0,8-22,5) p ₁₋₂ 1,0	12,5 (10,2-23,9) p ₁₋₃ 0,25	11,2 (2,5 - 40,3) p ₁₋₄ 0,36	p ₂₋₃ 0,44 p ₂₋₄ 0,60 p ₃₋₄ 0,77
	PD-L1	20,5 (8,1-39,7)	14,3 (9,8-56,5) p ₁₋₂ 0,95	23,1 (14,2-53,9) p ₁₋₃ 0,24	56,2 (46,6 - 67,5) p ₁₋₄ 0,009	p ₂₋₃ 0,60 p ₂₋₄ 0,16 p ₃₋₄ 0,042

Примечание: данные об экспрессии молекул представлены как процент позитивных клеток среди Г-МС, М-МС и Р-МС периферической крови доноров и пациентов с ММ в виде медианы и диапазона интерквартильных значений (IQR). pU – значимость различий показателей между указанными группами.

С помощью многофакторного дисперсионного анализа мы попытались установить наиболее значимые факторы, ассоциированные с супрессорным

потенциалом МС при ММ. Режим терапии являлся значимым фактором для количества PD-L1+М-МС, а также на уровне тренда – для Arg-1+ М-МС. Сочетание факторов стадии ММ и ответа на проводимую терапию оказывало эффект взаимодействия на экспрессию Arg-1 в Р-МС на уровне тренда (табл. 10).

Таблица 10 - многофакторный анализ клинических параметров и количества циркулирующих Arg1-позитивных М-МС и Р-МС и PD-L1-позитивных М-МС у больных ММ в фазе ремиссии

Фактор	Arg-1+ М-МС		Arg-1+ Р-МС		PD-L1+ М-МС	
	F	p	F	p	F	p
Стадия ММ	0,09	0,77	1,66	0,24	0,29	0,60
Ответ	0,12	0,73	0,74	0,42	0,12	0,73
Тип ИТ	2,76	0,12	0,0005	0,98	5,20	0,046
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

Полученные результаты позволяют заключить, что пациенты с ММ в фазе ремиссии характеризуются сниженной экспрессией Arg-1 в субпопуляции М-МС, что проявляется уменьшением доли Arg-1+М-МС и наиболее выражено в группах пациентов с III стадией ММ; больных, получивших ИТ леналидомидом, а также более глубоким ответом (ПО/ОХЧО). Режим терапии ассоциирован не только с изменением доли МС, несущих Arg-1, но и экспрессией молекул PD-L1 и IDO. Так, наряду с меньшим содержанием Arg-1+ М-МС больные после терапии леналидомидом характеризуются более низким содержанием PD-L1+ клеток в популяции М-МС, а также выраженной тенденцией к более низкому уровню PD-L1- и IDO-экспрессирующих Р-МС, а также IDO-экспрессирующих Г-МС в сравнении с аналогичными показателями у пациентов после терапии бортезомибом. По данным многофакторного анализа экспрессии Arg-1 в М-МС у пациентов в фазе ремиссии ассоциируется

в первую очередь с режимом терапии, в частности применением леналидомида, хотя влияние этого фактора проявляется на уровне тренда. В то же время режим терапии являлся значимым фактором, детерминирующим количество PD-L1+ клеток в популяции М-МС, а сочетание факторов стадии ММ и ответа на проводимую терапию на уровне тренда влияет на экспрессию Arg-1 в Р-МС. Рефрактерность к терапии или возникновение рецидива после достигнутого ответа ассоциированы с двукратным возрастанием экспрессии Arg-1 в М-МС. Более того, у пациентов этой группы увеличение количества Arg-1+ клеток регистрируется не только в субпопуляции М-МС, но и Р-МС и сочетается с увеличением доли PD-L1-экспрессирующих М-МС.

3.3. Влияние Г-КСФ на содержание и супрессорный потенциал МС у больных ММ на этапе мобилизации ГСК

Консолидация ремиссии высокими дозами цитостатических препаратов с ауто-ТГСК на данный момент остаётся стандартом программного лечения ММ и существенно повышает безрецидивную выживаемость больных. Одним из этапов ауто-ТГСК является мобилизация ГСК с помощью химиотерапии циклофосфамидом и Г-КСФ. Введение Г-КСФ приводит к выраженной стимуляции миелопоэза, увеличению количества МНК и, согласно имеющимся в литературе данным, может вызывать значительное повышение отдельных субпопуляций МС в ПК [137], и, соответственно, в продукте лейкофереза.

В связи с этим на следующем этапе нашего исследования мы изучили динамику содержания МС в периферической крови при проведении Г-КСФ-индуцированной мобилизации. Поскольку исследование МС на этапе мобилизации ГСК было проведено среди пациентов, являющихся кандидатами для проведения ауто-ТГСК с целью консолидации ремиссии ММ, то количественные параметры МС были исследованы только у больных, достигнувших ЧО и ПО/ ОХЧО.

Введение Г-КСФ в комбинации с циклофосфамидом на этапе мобилизации ГСК приводило к значимому возрастанию количества всех трёх анализируемых

субпопуляций МС. Наиболее выраженное увеличение относительного (более чем в 100 раз) и абсолютного числа наблюдалось в субпопуляции Г-МС (табл. 11). Относительное количество циркулирующих М-МС после введения Г-КСФ возрастало трёхкратно. При этом доля М-МС в ПК прямо коррелировала с количеством М-МС в продукте афереза ($R=0,571$, $p=0,021$). Другие МС в сепарате не определяли в связи с их чувствительностью к криоконсервированию.

Таблица 11 - содержание МС в ПК больных ММ до и после проведения процедуры мобилизации ГСК

Параметр	До Г-КСФ (n=33)	После Г-КСФ (n=33)	pU
М-МС (%)	3,32 (1,92-5,48)	10,0 (4,30-18,91)	0,0007
Г-МС (%)	0,03 (0,02-0,06)	4,59 (0,41-12,2)	0,00003
Р-МС (%)	0,8 (0,43-1,17)	1,28 (0,79-2,11)	0,012
МНК ($\times 10^9/\text{л}$)	1,98 (1,59-2,47)	3,20 (2,05-4,88)	<0,00001
М-МС ($\times 10^6/\text{мл}$)	64,1 (32,8-117,0)	219,0 (94,0-641,0)	0,0003
Г-МС ($\times 10^6/\text{мл}$)	0,7 (0,4-1,7)	8,9 (1,8-42,3)	0,0001
Р-МС ($\times 10^6/\text{мл}$)	19,0 (10,0-25,7)	40,8 (27,1-72,8)	0,001

Примечание. Данные об относительном (%) и абсолютном количестве ($10^6/\text{мл}$) Г-МС, М-МС и Р-МС среди МНК ПК пациентов с ММ представлены в виде медианы и диапазона интерквартильных значений (IQR). pU – значимость различий показателей до и после проведения процедуры мобилизации.

При оценке изменения экспрессии супрессорных молекул в МС в динамике мобилизации ГСК (табл. 12), было выявлено, что увеличение относительного количества М-МС в ПК после введения Г-КСФ сопровождалось увеличением в них доли Arg-1+ клеток более чем в 20 раз ($pU=0,015$). Экспрессия других молекул в М-МС значимо не менялась. Содержание ингибиторных молекул в Р-МС возрастало, но не достигало статистической значимости. В Г-МС, наоборот, выявлялось снижение экспрессии всех анализируемых молекул (статистически незначимое), что может быть связано с накоплением в циркуляции незрелых гранулоцитов с

таким же фенотипом, как и Г-МС (табл 12А). Тем не менее, содержание циркулирующих клеток с фенотипом Г-МС и М-МС, экспрессирующих Arg-1 и PD-L1, после Г-КСФ значимо возрастало ($pU=0,0013$ и $pU=0,0002$ соответственно для Arg+клеток и $pU=0,008$ и $pU=0,01$, соответственно, для PD-L1+ клеток). Для экспрессии IDO таких изменений не было выявлено (табл 12Б).

Таблица 12 – экспрессия ингибиторных молекул в МС у больных ММ до и после Г-КСФ-индуцированной мобилизации ГСК:

А - содержание МС, экспрессирующих ингибиторные молекулы среди субпопуляций

Субпопуляция МС (%)	Маркер	До введения Г-КСФ (n=3-14)	После введения Г-КСФ (n=3-14)	pU
Г-МС	Arg-1	87,3 (77,7-93,9)	77,4 (56,3-91,1)	0,31
	IDO	10,8 (1,7-65,3)	6,3(0,1-24,5)	0,55
	PD-L1	22,6 (7,0-37,5)	10,3 (1,0-36,1)	0,30
Р-МС	Arg-1	21,8 (8,4-44,0)	31,0 (18,0-44,0)	0,63
	IDO	0,67 (0,09-1,7)	6,48 (0,2-10,4)	0,38
	PD-L1	9,8 (8,5-43,23)	17,6 (7,5-22,5)	0,95
М-МС	Arg-1	0,35 (0,16 -2,36)	12,1 (1,5-14,3)	0,004
	IDO	10,2 (0,8 - 59,8)	10,8 (1,5 - 44,2)	0,86
	PD-L1	20,5 (14,2-74,9)	23,8 (12,3-33,0)	0,68

Примечание: данные об экспрессии молекул представлены как процент позитивных клеток среди Г-МС, М-МС и Р-МС в ПК пациентов с ММ в виде медианы и диапазона интерквартильных значений (IQR). pU – значимость различий показателей между указанными группами.

Б - содержание МС с супрессорным фенотипом среди МНК

Клеточный фенотип МС	До ГКСФ (n=3-14)	После ГКСФ (n=3-14)	pw
Г-МС Arg+	0,02 (0,015-0,027)	2,37 (0,32-23,1)	0,0013
Р-МС Arg+	0,13 (0,05-0,18)	0,31 (0,05-0,44)	0,28
М-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
Р-МС IDO+	0,021 (0,004-0,038)	0,11 (0,00-0,13)	0,93
М-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
Р-МС PD-L1+	0,22 (0,008-0,43)	0,24 (0,04-0,42)	0,94
М-МС PD-L1+	0,43 (0,09-0,75)	1,19 (0,56-7,18)	0,01

Примечание: указанные субпопуляции клеток рассчитаны как процент клеток среди всех МНК периферической крови больных ММ. Данные представлены в виде медианы и диапазона интерквартильных значений (IQR). Рw– значимость различий показателей в парных выборках до и после введения Г-КСФ.

Таким образом, можно заключить, что Г-КСФ-индуцированная мобилизация ГСК сопровождается увеличением доли всех анализируемых субпопуляций МС и возрастанием до нормативных значений экспрессии Arg-1 в М-МС, что в совокупности с увеличением абсолютного содержания МС приводит к экспансии в циркуляции Г-МС и М-МС, экспрессирующих Arg-1+ и PD-L1. Поскольку эти клетки в дальнейшем входят в состав продукта сепарации, можно предположить, что экспансия МС, характеризующихся сохранным иммуносупрессивным потенциалом, на этапе мобилизации ГСК может влиять на восстановление гемопоэза, иммунную реконституцию и, в конечном счёте, на исходы ауто-ТГСК у пациентов с ММ.

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

Следующий этап был посвящён исследованию содержания субпопуляций МС в ПК пациентов в динамике ауто-ТГСК с кондиционированием высокими дозами мелфалана и оценке супрессорного потенциала этих клеток.

3.4.1. Количественная характеристика субпопуляций МС в динамике ауто-ТГСК у больных ММ

Следует отметить, что 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.3), что в раннем посттрансплантационном периоде, соответствующем приживлению трансплантата и выходу из лейкопении (12-16 день после ауто-ТГСК), относительное количество циркулирующих М-МС и Г-МС возрастало почти в 2 раза ($pU=0,038$ и $pU=0,003$, соответственно). Абсолютное количество Г-МС также существенно увеличивалось ($pU=0,005$), несмотря на сниженное количество МНК по сравнению с предтрансплантационным периодом ($pU<0,0001$). При этом анализ корреляционных связей не выявил сопряженности между содержанием М-МС в продукте афереза и в ПК после ауто-ТГСК ($R_s=0,277$; $p=0,16$ $n=27$). Этот факт позволяет предположить, что восстановление МС в раннем периоде не связано с экспансией содержащихся в продукте лейкоффераза МС, т.е. клетки-предшественники миелопоэза продукта афереза, трансплантируемые вместе с ГСК, не играют ключевой роли в формировании общего пула М-МС после ауто-ТГСК. Через 6 месяцев наблюдения после проведенной ауто-ТГСК доля циркулирующих М-МС и Г-МС значимо снижалась ($pU=0,007$ и $pU=0,024$, соответственно;) до предтрансплантационных значений и сохранялась на этом же уровне через 12 месяцев после ауто-ТГСК. Динамика абсолютного содержания М-МС и Г-МС в посттрансплантационном периоде наблюдения была схожа, однако значимые изменения были выявлены только для Г-МС. Через 6 мес после трансплантации у пациентов на фоне восстановления абсолютного количества МНК абсолютное количество Г-МС снижалось ($pU=0,02$) и в последующие 6 мес оставалось без значимых изменений.

Относительное и абсолютное количество Р-МС на момент приживления трансплантата после ауто-ТГСК, наоборот, снижалось в сравнении с аналогичными показателями перед началом кондиционирования. Причём уменьшение абсолютного количества Р-МС достигало статистической значимости ($p=0,004$). В последующем, доля циркулирующих Р-МС оставалась на том же уровне, тогда как абсолютное содержание Р-МС на фоне возрастания абсолютного количества МНК к 12 месяцам после ауто-ТГСК возрастало по сравнению с моментом восстановления лейкоцитов. Таким образом, по сравнению с предтрансплантационным периодом в момент выхода из лейкопении отмечается возрастание относительного количества М-МС, а также относительного и абсолютного содержания Г-МС, количество которых через 6 месяцев снижается до предтрансплантационных показателей и остаётся без изменений и на точке, соответствующей 12 мес наблюдения. Абсолютное содержание Р-МС в раннем посттрансплантационном периоде, напротив, снижается, а к 6-12 мес восстанавливается до уровня предтрансплантационных значений. Процентное содержание Р-МС при этом не претерпевает значимых изменений в динамике посттрансплантационного периода (рис. 3).

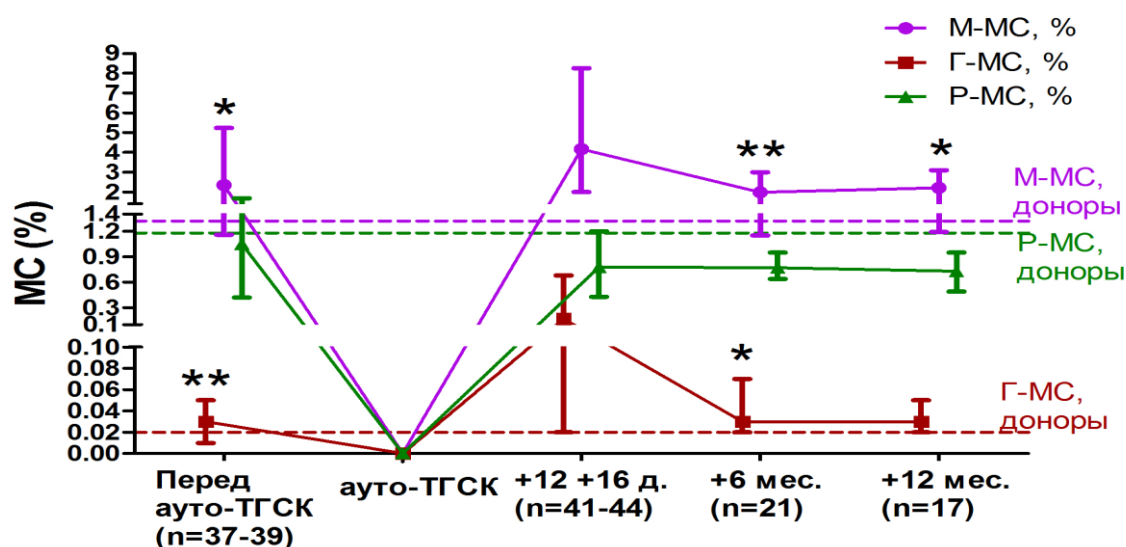


Рисунок 3. Относительное содержание циркулирующих МС в динамике ауто-ТГСК у пациентов с ММ

Примечание: ** - $p < 0,05$ – значимость различий между указанными группами.

3.4.2. Экспрессия Arg-1, PD-L1 и IDO субпопуляциями МС у больных ММ в динамике ауто-ТГСК

Как было отмечено ранее, М-МС и Р-МС у больных ММ перед мобилизацией (в фазе ремиссии) характеризовались сниженной экспрессией Arg-1, уровень которой существенно возрастал после введения Г-КСФ. Однако к моменту проведения ауто-ТГСК экспрессия Arg-1 в М-МС и Р-МС вновь снижалась (по сравнению с показателями после мобилизации ГСК $pU=0,066$ и $pU=0,17$, соответственно), приближаясь к значениям, зафиксированным до проведения мобилизации ГСК и был ниже донорских значений. В раннем периоде после ауто-ТГСК (через 12-16 дней после инфузии ГСК) доля Arg-1-позитивных М-МС существенно возросла ($pU=0,026$; рис 4). При исследовании на сроках 6 и 12 месяцев наблюдения количество Arg-1-позитивных М-МС оставалось значимо выше по сравнению со значениями до мобилизации ГСК (Ме 12,3% и 22,1% против 2,6 %, $pU=0,046$ и $pU=0,025$, соответственно). Причем несмотря на снижение общей доли циркулирующих М-МС, количество Arg+ М-МС через 12 мес наблюдения (Ме 0,38; IQR 0,22-1,68) было значимо выше, практически 10-кратно превышая предтрансплантационный уровень (Ме 0,03; IQR 0,01-0,1 %, $pU=0,0015$) (рис. 4), и достигало донорских значений ($pU=0,24$).

Количество Arg-1-позитивных клеток среди Г-МС на этапе выхода из лейкопении возросло в меньшей степени, хотя и статистически достоверно ($p=0,007$ рис 4А). В дальнейшем, при наблюдении через 6-12 мес - доля Arg-1+ Г-МС незначительно снижалось, однако уже не отличалась от уровня доноров. Относительное содержание Arg-1+Р-МС на этапе выхода из лейкопении также транзиторно возросло и затем постепенно снижалось через 6 и 12 мес до значений перед трансплантацией. Изменения в содержании Arg-1+Р-МС в посттрансплантационном периоде не достигали статистической значимости. Тем не менее, уровень этих клеток на момент выхода из лейкопении был достоверно выше, чем у доноров ($p=0,03$).

Относительное содержание PD-L1-позитивных клеток в субпопуляции М-МС на момент выхода из лейкопении существенно возрастало ($pU=0,029$), превышая не только предтрансплантационный уровень, но и значения у доноров ($p=0,014$). При этом М-МС в раннем периоде являлась субпопуляцией с наиболее высокой экспрессией PD-L1 (рис 4 Б). В последующем, экспрессия PD-L1 в М-МС умеренно снижалась ($pU=0,076$), на 12 мес наблюдения не отличалась от уровня перед трансплантацией и соответствовала уровню донорских значений. В субпопуляции Г-МС относительное содержание PD-L1-позитивных клеток на этапе выхода из лейкопении (через 12-16 дней после ауто-ТГСК), напротив, снижалось и было достоверно ниже, чем у доноров ($p=0,003$), однако к 12 мес уровень этих клеток достоверно возрастал, достигал уровня предтрансплантационных значений и не отличался от такового у доноров. Для Р-МС изменения в экспрессии PD-L1 в динамике посттрансплантационного периода были слабо выражены и не достигали статистической значимости. На этапе 12 мес наблюдения все три субпопуляции МС были сопоставимы по экспрессии PD-L1 с соответствующими уровнями перед трансплантацией.

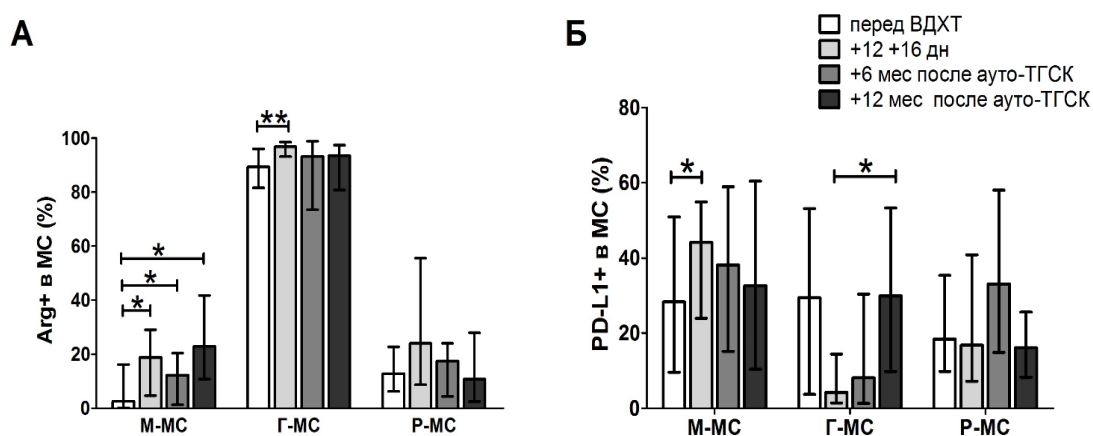


Рисунок 4. Содержание субпопуляций МС, экспрессирующих Arg-1 и PD-L1 в динамике ауто-ТГСК

Примечание: относительное содержание субпопуляций МС, экспрессирующих Arg-1 (А) и PD-L1 (Б) в динамике ауто-ТГСК у пациентов с ММ представлено в виде медиан и интерквартильных диапазонов перед

началом кондиционирования (перед ВДХТ n=8-15); в раннем посттрансплантационном периоде (+12+16 день, n=21-35) через 6 месяцев (+ 6 мес после ауто-ТГСК, n=9-13) и 12 мес (+12 мес после ауто-ТГСК, n=10) * - $p < 0,05$ – значимость различий между указанными группами.

Экспрессия IDO в MC после проведения ауто-ТГСК была также подвержена транзиторным изменениям (табл.13). При этом значимое возрастание IDO-позитивных клеток на этапе выхода из лейкопении наблюдалось только в субпопуляции P-MC (по сравнению с уровнем до трансплантации $pU=0,025$). Доля IDO+P-MC на этом этапе достоверно превышала соответствующий показатель у доноров. К 12 мес содержание IDO+P-MC было существенно ниже, чем в раннем посттрансплантационном периоде и не отличалось от такового у доноров. Аналогичным образом, относительное содержание IDO+Г-MC к 12 мес наблюдения было достоверно ниже, чем таковое на момент выхода из лейкопении. В целом экспрессия IDO в MC через 12 мес значимо не отличалась от аналогичных показателей до начала кондиционирования.

Таблица 13 - экспрессия IDO в субпопуляциях MC у пациентов с MM в динамике ауто-ТГСК.

Субпопуляция MC (%)	Доноры	До ауто-ТГСК (n=6-8)	После ауто-ТГСК			pU
			Через 12-16 дней (n=21-22)	Через 6 мес n=9-11	Через 12 мес n=9-10	
	1	2	3	4	5	
М-MC	8,0 (2,9-41,9)	7,1 (2,5-17) $p_{1-2} 0,82$	11,4 (5,2-30,2) $p_{1-3} 1,0$	3,1 (1,0-7,9) $p_{1-4} 0,46$	12,7 (0,9-41,3) $p_{1-5} 0,85$	$p_{2-3} 0,53$ $p_{2-4} 0,40$ $p_{2-5} 0,84$ $p_{3-4} 0,016$ $p_{3-5} 0,5$
Г-MC	20,5 (0,28-41,7)	54,7 (18,7-93) $p_{1-2} 0,72$	52,3 (10,2-82,4) $p_{1-3} 0,72$	34,3 (0,0-69,0) $p_{1-4} 0,95$	11,4 (4,0-19,4) $p_{1-5} 0,06$	$p_{2-3} 0,26$ $p_{2-4} 0,56$ $p_{2-5} 0,57$ $p_{3-4} 0,81$ $p_{3-5} 0,03$
P-MC	4,1 (0,29-11,5)	2,2 (0,8-26,5) $p_{1-2} 0,71$	10,5 (1,8-38,7) $p_{1-3} 0,07$	1,7 (0,1-5,1) $p_{1-4} 0,82$	1,1 (0,5-7,0) $p_{1-5} 0,39$	$p_{2-3} 0,025$ $p_{2-4} 0,47$ $p_{2-5} 0,87$

						p ₃₋₄ 0,016 p ₃₋₅ 0,04
--	--	--	--	--	--	---

Примечание: данные представлены как процент IDO - позитивных клеток в субпопуляциях МС периферической крови пациентов с ММ в виде медианы и диапазона интерквартильных значений (IQR). pU – значимость различий показателей между указанными группами.

Таким образом, при проведении ауто-ТГСК с кондиционированием высокими дозами мелфалана у пациентов с ММ на этапе выхода из лейкопении по сравнению с предтрансплантационным этапом отмечается усиление экспрессии ингибиторных молекул, которое проявляется в возрастании доли Arg-1+клеток во всех субпопуляциях МС, относительного содержания PD-L1+клеток - в субпопуляции М-МС и IDO+клеток - в субпопуляции Р-МС. Характерно, что возрастание экспрессии Arg-1 в субпопуляции Г-МС сочетается со снижением экспрессии PD-L1. В позднем периоде, на этапах 6-мес и 12-месячного наблюдения более высокий уровень экспрессии Arg-1 в М-МС сохраняется, а доля PD-L1+М-МС, IDO-позитивных Г-МС и Р-МС и Arg-1+Г-МС снижается. При этом уровни экспрессии исследуемых ингибиторных молекул в субпопуляциях МС соответствуют таковым у здоровых доноров.

Полученные в целом данные свидетельствуют о том, что содержание периферических МС у пациентов с сохранным ответом после ауто-ТГСК подвержено транзиторным изменениям. Так, в раннем посттрансплантационном периоде, в ПК регистрируется возрастание доли М-МС и Г-МС, уровень которых к 6-12 мес наблюдения возвращается к предтрансплантационным значениям. Изменения в абсолютном количестве МС в раннем посттрансплантационном периоде проявляются значимым возрастанием Г-МС и снижением Р-МС с последующим восстановлением этих клеток до исходного уровня перед трансплантацией. При этом, поскольку увеличение абсолютного количества Г-МС в раннем периоде наблюдается на фоне снижения абсолютного количества МНК, а снижение численности Г-МС и М-МС к 6 мес наблюдается на фоне возрастания абсолютного количества МНК, можно заключить, что изменения в абсолютном содержании МС не

являются исключительно следствием изменений количества циркулирующих МНК.

Вторым важным моментом является выявленное в раннем периоде усиление экспрессии в МС ингибиторных молекул. Увеличение экспрессии Arg-1 наблюдается во всех субпопуляциях МС, что проявляется достоверным возрастанием доли Arg-1-экспрессирующих М-МС, Г-МС и Р-МС. Кроме того, в субпопуляции Р-МС регистрируется увеличение экспрессии IDO, а в М-МС - PD-L1, о чем свидетельствует увеличение относительного содержания IDO+Р-МС и PD-L1+М-МС. Единственным исключением является снижение PD-L1 в субпопуляции Г-МС. Впоследствии, через 6-12 мес более высокий уровень экспрессии Arg-1 в М-МС в сравнении с предтрансплантационными значениями сохраняется, тогда как в Г-МС снижается и различия с предтрансплантационным уровнем нивелируются. Кроме того, отмечается снижение доли PD-L1+ клеток в субпопуляции М-МС и IDO-экспрессирующих клеток в субпопуляциях Г-МС и Р-МС. При этом сниженный на этапе выхода из лейкопении и 6 мес наблюдения уровень PD-L1+Г-МС к 12 мес восстанавливается до предтрансплантационных значений.

Важно отметить, что возрастание доли МС и усиление экспрессии в этих субпопуляциях ингибиторных молекул наблюдается в ранние сроки, соответствующие приживлению трансплантата, активации гемопоэза и запуску гомеостатической пролиферации, которая обеспечивает раннее восстановление Т-лимфоцитов. Следовательно, можно полагать, что М-МС и Г-МС в этот период могут быть причастны к процессу энграфтинга ГСК и регуляции гомеостатической пролиферации. Также важно подчеркнуть, что восстановление (снижение) относительного количества субпопуляций МС к 6-12 мес после их возрастания в раннем периоде (12-16 день после трансплантации) сопровождается различной динамикой экспрессии ингибиторных молекул в зависимости от их типа и субпопуляционной принадлежности МС. Так, при переходе от раннего посттрансплантационного периода к позднему в субпопуляции М-МС экспрессия Arg-1 не меняется,

уровень экспрессии PD-L1 снижается, уровень IDO сохраняется без значимых изменений. В субпопуляции Г-МС экспрессия Arg-1 снижается, исходно сниженный уровень экспрессии PD-L1 возрастает до донорских значений, а повышенный уровень IDO снижается до донорского уровня. В субпопуляции Р-МС экспрессия Arg-1 и PD-L1 не меняется, а экспрессия IDO снижается до донорского уровня.

3.5. Анализ сопряженности субпопуляций МС с длительностью лейкопении и исходами ауто-ТГСК

3.5.1. Анализ длительности лейкопении в группах пациентов с высоким и низким содержанием субпопуляций МС на этапе восстановления лейкоцитов

Быстрое и стойкое восстановление кроветворения после ауто-ТГСК является одним из прогностически благоприятных факторов, ассоциированных с успешной трансплантацией ГСК и большей общей выживаемостью больных [123]. Однако сведения о возможной роли МС в регуляции энграфтинга аутологичных ГСК после ВДХТ и восстановлении кроветворения отсутствуют. Поэтому следующим разделом работы стало исследование сопряженности между содержанием МС и эффективностью восстановления кроветворения.

Длительность выхода из лейкопении (лейкоциты в ПК выше $1 \times 10^9/\text{л}$, тромбоциты выше $50 \times 10^9/\text{л}$) у пациентов с ММ после проведения ауто-ТГСК с кондиционированием высокими дозами мелфалана варьировала от 8 до 18 дней (Me 12 дней, IQR 11-14 день). Содержание лейкоцитов и тромбоцитов на этом этапе приведено в таблице 14.

Таблица 14 – гематологические показатели после Ауто-ТГСК

Параметр	Me (IQR)	Диапазон значений
Нейтрофилы ($\times 10^9/\text{л}$)	1,26 (0,78-2,44)	0,22-7,95
Тромбоциты ($\times 10^9/\text{л}$)	65 (47-90)	7,2-243
Моноциты ($\times 10^9/\text{л}$)	0,12 (0,05-0,25)	0,005-1,56
Лимфоциты ($\times 10^9/\text{л}$)	0,48 (0,33-0,79)	0,02-2,68
М-МС (%)	3,4 (2,0-6,9)	0,26-19,07
М-МС ($\times 10^6/\text{мл}$)	26,8 (14,1-68,8)	4,4-350,0
Г-МС (%)	0,32 (0,03-0,90)	0,001-15,54

Г-МС ($\times 10^6/\text{мл}$)	2,9 (0,43-7,47)	0,02-148,4
Р-МС (%)	0,63 (0,39-1,19)	0,09-2,55
Р-МС ($\times 10^6/\text{мл}$)	5,5 (3,7-10,5)	0,55-34,29

Поскольку количество трансплантированных CD34+ГСК является одним из важных факторов восстановления гемопоэза, первоначально мы провели корреляционный анализ содержания трансплантированных CD34+ клеток/кг с показателями восстановления кроветворения. Длительность лейкопении находилась в обратной корреляционной связи с количеством трансплантированных CD34+клеток/кг ($R=-0,305$, $p=0,008$). Среди всех анализируемых показателей достоверная зависимость с количеством трансплантированных CD34+ клеток/кг была выявлена только для абсолютного содержания тромбоцитов ($R=0,378$, $p=0,0007$). Аналогичная связь с количеством моноцитов являлось слабой ($R=0,250$, $p=0,03$). Содержание субпопуляций МС на этапе выхода из лейкопении не было связано с количеством CD34+ клеток/кг в трансплантате.

Чтобы оценить значимость МС с точки зрения восстановления гемопоэза после проведения ауто-ТГСК, мы сопоставили содержание МС с содержанием различных популяций клеток крови. Относительное содержание М-МС прямо коррелировало с содержанием моноцитов ($R=0,417$, $p=0,002$). Для Г-МС была характерна обратная сопряженность с количеством моноцитов ($R=-0,493$, $p=0,0003$). В то же время прямая связь с абсолютным содержанием нейтрофилов была слабой ($R=0,273$, $p=0,048$). Кроме того, была выявлена обратная достоверная корреляционная зависимость между долей Г-МС и содержанием лимфоцитов ($R= -0,347$, $p=0,014$). При анализе длительность лейкопении оказалось, что данный показатель ассоциировался только с содержанием М-МС. Длительность лейкопении находилась в обратной корреляционной связи с процентным и абсолютным содержанием М-МС ($R=-0,347$, $p=0,018$ и $R=-0,469$, $p=0,0008$, соответственно) (рис. 5), что указывает на ассоциацию более высокого содержания М-МС с более ранним восстановлением гемопоэза после ауто-ТГСК.

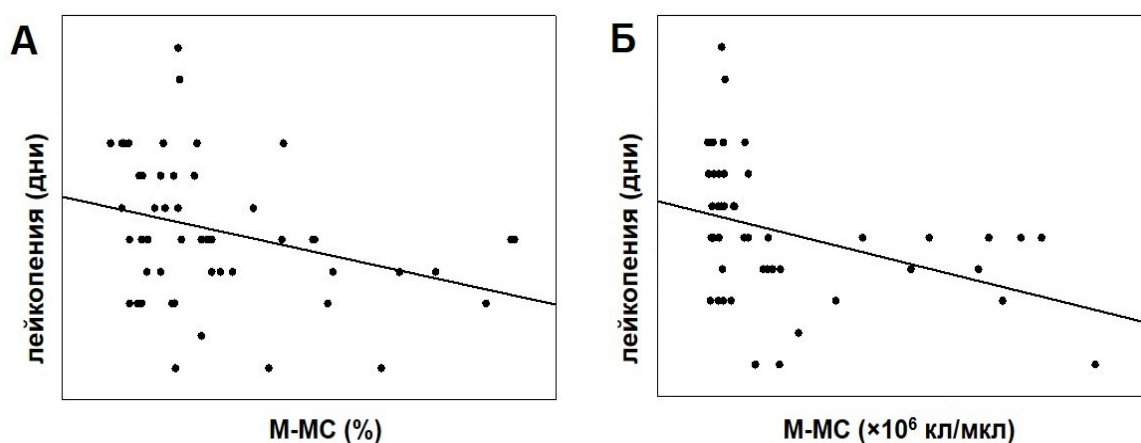


Рисунок 5. Взаимосвязь между длительностью лейкопении и относительным (А) и абсолютным (В) количеством М-МС на этапе выхода из лейкопении.

Множественный регрессионный анализ подтвердил зависимость (коэффициент детерминации R^2 0,241, F-критерий 3,45, $p=0,015$) длительности лейкопении от доли циркулирующих М-МС ($p=0,014$) и количества трансплантированных $CD34^+$ клеток/кг ($p=0,032$). При этом доля циркулирующих Г-МС и Р-МС согласно регрессионному анализу, не влияли на продолжительность лейкопении ($p=0,14$ и $p=0,66$, соответственно). Для абсолютного количества М-МС была выявлена схожая закономерность ($p=0,048$).

На заключительном этапе с помощью многофакторного дисперсионного анализа мы попытались установить наиболее значимые факторы, ассоциированные с меньшей продолжительностью лейкопении (табл.15). Значимыми факторами для длительности лейкопении являлись количество трансплантированных $CD34^+$ клеток/кг и содержание М-МС. При этом такие клинические параметры как глубина ответа и наличие или отсутствие минимальной остаточной болезни перед ауто-ТГСК, а также стадия ММ не влияли на длительность восстановления кроветворения.

Таблица 15 - многофакторный анализ влияния клинических параметров на длительность лейкопении после ауто-ТГСК у пациентов с ММ.

Фактор	F	p
CD34+ клеток/кг (>Me или <Me)	6,95	0,01
М-МС, % (> Me или <Me)	7,66	0,008
Ответ (ПО или ЧО)	0,33	0,57
МОБ (наличие или отсутствие)	0,15	0,70
Стадия II или III	0,00	0,96

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. Связь более раннего восстановления гемопоэза с более высоким количеством М-МС в этот момент может быть обусловлена участием М-МС в формировании костномозговых ниш для ГСК, что обеспечивает их более быстрое приживание.

3.5.2 Анализ сопряженности МС на этапе восстановления лейкоцитов ауто-ТГСК с безрецидивной выживаемостью

Учитывая обнаруженную связь между содержанием МС и эффективностью восстановления лейкоцитов, на заключительном этапе исследования был проведён анализ сопряженности содержания МС на этапе восстановления кроветворения после ауто-ТГСК и безрецидивной выживаемостью пациентов с ремиссией ММ после ауто-ТГСК. Для этого сравнили показатели выживаемости в группах пациентов с высоким и низким содержанием различных субпопуляций МС на этапе выхода из лейкопении. Чтобы найти оптимальные пороги разделения для относительного и абсолютного количества каждой субпопуляции МС, которые могли бы наиболее эффективно дифференцировать различия в выживаемости, предварительно был проведён ROC- анализ. С этой целью всех пациентов разделили на группы с наличием и отсутствием рецидива (табл. 16). Обращает на себя внимание тот факт, что оптимальные пороговые значения для всех

субпопуляций МС оказались ниже медианных значений. Далее, используя выбранные пороговые значения для каждой субпопуляции МС, был проведен анализ безрецидивной выживаемости по методу Каплана-Майера с использованием log-rank-теста.

В анализ безрецидивной выживаемости было включено 55 пациентов, десять из которых ещё не достигли 12-месячной контрольной точки наблюдения, у 9 пациентов был зарегистрирован рецидив ММ в первые 12 мес после трансплантации, у двух пациентов рецидив по критериям IMWG наступил на второй год (через 18 и 20 мес.), у четырех пациентов – более чем через 36 мес после ауто-ТГСК. Медиана наблюдения после ауто-ТГСК составила 26 мес (IQR 14–44 мес).

Таблица 16 – ROC - анализ содержания субпопуляций МС на этапе восстановления количества лейкоцитов после ауто-ТГСК

Субпопуляция МС	Порог МС	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	AUC	95% ДИ	ОП	p
М-МС	1,47 %	44,4	94,4	0,503	0,216-0,790	8,0	0,98
	16 кл/мкл	55,6	75,5	0,507	0,233-0,780	2,1	0,95
Г-МС	0,11 %	75,0	62,9	0,611	0,31-0,841	2,02	0,33
	1,6 кл/мкл	75,0	60,6	0,606	0,398-0,815	1,90	0,36
Р-МС	0,50 %	75,0	80,0	0,696	0,471-0,922	3,75	0,086
	7,96 кл/мкл	62,5	48,48	0,523	0,311-0,735	1,21	0,84

Примечание: порог - относительное содержание (%) указанных субпопуляций МС, ниже которых ROC-анализ прогнозирует развитие рецидива ММ с указанными чувствительностью и специфичностью; AUC – площадь под кривой; ОП– отношение правдоподобия, 95% /ДИ 95% доверительный интервал

При анализе безрецидивной выживаемости в группе больных, прошедших 12 месячный срок наблюдения (рис 6А), пациенты с более высоким уровнем МС на момент выхода из лейкопении характеризовались меньшей частотой ранних рецидивов. Так, отсутствие рецидива в группе с

содержанием Г-МС $>0,11\%$ регистрировалось чаще, чем у пациентов с уровнем Г-МС $\leq 0,11\%$ (91,3 % по сравнению с 68,4 %; $p \log\text{-rank}=0,059$). Аналогичным образом, доля пациентов с сохраняющимся ответом (отсутствием рецидива) в группе с содержанием Р-МС $> 0,50\%$ была выше, чем у пациентов с уровнем Р-МС $\leq 0,50\%$ (93,1% по сравнению с 53,8 %; $p \log\text{-rank}=0,003$). Для популяций М- МС была установлена схожая ассоциация. Пациенты с более высоким содержанием М-МС ($>1,47\%$) характеризовались более высокой безрецидивной выживаемостью. В группе пациентов с содержанием М-МС ниже порогового отсечения ($\leq 1,47\%$) достигнута медиана выживаемости (10,5 мес).

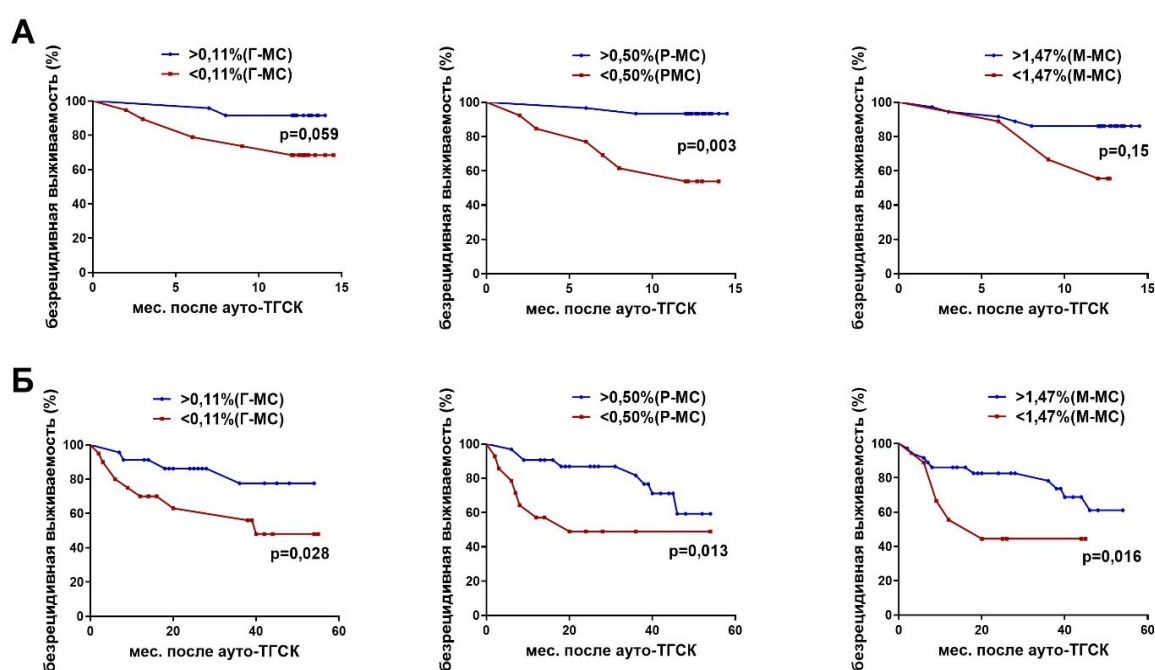


Рисунок 6. Анализ безрецидивной выживаемости в зависимости от пороговых значений отдельных субпопуляций МС. А – период 0-15 мес, Б 16-60 мес

Выявленные закономерности в целом сохранялись при анализе безрецидивной выживаемости в общей группе (рис 6Б), срок наблюдения в которой составлял от 2 до 60 мес. Различия в частоте безрецидивных случаев между пациентами с уровнем Г-МС $>0,11\%$ и Г-МС $\leq 0,11\%$ достигали статистической значимости (73,7 по сравнению 45,7%, $p \log\text{-rank}=0,028$). В

группе пациентов с содержанием Г-МС ниже порогового отсечения была достигнута медиана выживаемости (38,9 мес.). Различия в частоте пациентов без рецидива ММ в зависимости от содержания М-МС выше и ниже порогового значения продолжали сохраняться на уровне статистической значимости (93,1 по сравнению с 53,8 %, $p \log\text{-rank}=0,028$). При этом в группе пациентов с $P\text{-МС} \leq 0,50\%$ была также достигнута медиана выживаемости (12,3 мес). Более низкая безрецидивная выживаемость у пациентов с содержанием $M\text{-МС} \leq 1,47\%$ по сравнению с группой пациентов с $M\text{-МС} > 1,47\%$ проявлялась на уровне тренда (42,9 по сравнению с 58,4%, $p \log\text{-rank}=0,15$).

Проведённый регрессионный анализ Кокса (табл. 17) показал, что более продвинутая стадия ММ, глубина ответа перед проведением ауто-ТГСК и относительное количество циркулирующих Р-МС на этапе выхода из лейкопении ($\leq 0,50\%$) после ауто-ТГСК были независимыми достоверными факторами риска, ассоциированными с меньшей безрецидивной выживаемостью.

Таблица 17 - многофакторный анализ ранних посттрансплантационных рецидивов у больных ММ в зависимости от клинических и лабораторных данных.

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
Длит-ть 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 (пол/отр)	-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/ $\leq 1,47\%$)	1,16 (0,62)	4,26	0,059	1,39 (0,89)	4,79	0,12
Г-МС (>0,11/ $\leq 0,11\%$)	1,13 (0,58)	4,58	0,049	1,33 (0,71)	3,28	0,06
Р-МС (>0,50 / $\leq 0,50\%$)	1,29 (0,54)	5,11	0,017	1,38 (0,64)	3,06	0,03

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

Таким образом, по данным многофакторного анализа Кокса, в нашем исследовании независимыми достоверными факторами риска, ассоциированными с меньшей безрецидивной выживаемостью, были глубина ответа перед проведением ауто-ТГСК и сниженное относительное количество циркулирующих Р-МС на этапе выхода из лейкопении ($\leq 0,50\%$) после трансплантации ГСК.

Анализ зависимости между содержанием субпопуляций МС и показателями крови на этапе восстановления кроветворения после ауто-ТГСК у пациентов с ММ показал, что количество МС не было связано с количеством CD34+ клеток/кг в трансплантате. Содержание моноцитов прямо коррелировало с относительным содержанием М-МС ($R=0,417$, $p=0,002$) и обратно - с содержанием Г-МС ($R=-0,493$, $p=0,0003$). Доля Г-МС также обратно коррелировала с содержанием лимфоцитов ($R=-0,347$, $p=0,014$). При анализе сопряженности между уровнем МС и длительностью лейкопении обратная корреляционная связь выявлена для относительного и абсолютного содержания М-МС ($R=-0,347$, $p=0,018$ и $R=-0,469$, $p=0,0008$, соответственно). Множественный регрессионный анализ показал зависимость длительности лимфопении от доли циркулирующих М-МС ($p=0,014$) и количества трансплантированных CD34+ клеток/кг ($p=0,032$). Согласно данным многофакторного дисперсионного анализа значимыми факторами для продолжительности лейкопении являлись количество трансплантированных CD34+ клеток/кг и содержание М-МС. При этом такие клинические параметры как глубина ответа и наличие МОБ перед проведением ауто-ТГСК, а также стадия ММ не влияли на длительность восстановления кроветворения. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о сопряженности более высокого содержания М-МС с меньшей длительностью лейкопении после ауто-ТГСК и указывают на позитивную роль М-МС в восстановлении кроветворения в раннем посттрансплантационном периоде у пациентов с ММ.

Другим важным заключением является выявленный факт о сопряженности более высокого содержания МС на момент приживления трансплантата с меньшей частотой рецидивов и, соответственно, более высокими показателями безрецидивной выживаемости. Более того, согласно данным регрессионного анализа Кокса относительное количество циркулирующих Р-МС $\leq 0.50\%$ является независимым и достоверным фактором риска, ассоциированным с меньшей безрецидивной выживаемостью, наряду с такими факторами как более продвинутая стадия ММ и глубина ответа перед проведением ауто-ТГСК.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы попытались оценить клиническую и прогностическую значимость МС, исследуя количественное содержание различных субпопуляций этих клеток и их функциональную активность (экспрессию ассоциированных с супрессией молекул Arg1, IDO и PD-L1) в зависимости от клинического варианта течения заболевания и этапа терапии.

Полученные результаты выявили разнонаправленный характер изменений отдельных субпопуляций МС у больных в фазе ремиссии ММ. Так, возрастание количества М-МС и Г-МС сопровождалось снижением Р-МС. Изменения всех трех субпопуляций проявлялись более выражено у больных с III стадией, тогда как при II стадии достигали статистической значимости только для М-МС. Эти данные указывают на сопряженность МС с тяжестью заболевания, что и было подтверждено данными многофакторного анализа в отношении Р-МС. Сравнение показателей МС у больных с впервые выявленной ММ и ремиссией после индукционной терапии позволило также оценить влияние терапевтических препаратов на содержание МС. Судя по полученным данным, терапия бортезомибом приводила к возрастанию Р-МС (до нормативных значений) при отсутствии изменений в количестве М-МС и Г-МС, тогда как применение леналидомида (на фоне резистентности к бортезому) сопровождалось нормализацией не только Р-МС, но и М-МС (за

счет снижения их количества). При анализе показателей МС у больных с прогрессией (рецидивом или резистентностью к терапии) отмечалось наиболее выраженное снижение уровня Р-МС, которое сочеталось с преимущественным увеличением Г-МС в отсутствие достоверного возрастания М-МС, что по-видимому, связано с более интенсивной терапией у этих пациентов и отражает особенности дифференцировки Р-МС в более зрелые формы.

В работах последних лет, посвящённых исследованиям МС при ММ, описано увеличение содержания Г-МС при впервые диагностированной ММ, а также при прогрессии заболевания [121; 25; 112; 111; 124]. Однако Favaloro с соавторами впервые продемонстрировали повышенное содержание этих клеток и у пациентов в фазе ремиссии [26]. Публикации о повышенном количестве М-МС при ММ встречаются реже [121; 110; 83]. Несколько публикаций указывают на то, что увеличение количества Г-МС и М-МС ассоциируется с тяжестью ММ [124; 83]. При этом в литературе практически отсутствуют данные о содержании Р-МС. Повышенное количество М-МС наряду с Г-МС и сниженное количество менее зрелых Р-МС при более продвинутой III стадии ММ может быть связано с более высокой опухолевой нагрузкой, сопровождающейся возрастанием концентрации различных цитокинов, в том числе важных с точки зрения генерации МС - IL-6, IL-10, TGFβ [125; 126]. Так как все МС происходят из общего миелоидного предшественника, то более выраженная продукция клетками опухоли или опухолевого микроокружения этих факторов может стимулировать патологическую активацию и дифференцировку МС в более зрелые формы (Г-МС и М-МС) на продвинутых стадиях ММ.

Также нами показано, что снижение Р-МС максимально выражено у пациентов с прогрессией ММ и нивелируется на фоне лечения бортезомибом или леналидомидом у пациентов, достигших ремиссии. Похожий эффект индукционной терапии на восстановление абсолютного количества Р-МС описан в работе Lee S.-E. et al [13]. В исследованиях *in vitro* было показано, что леналидомид в культуре МНК ингибирует генерацию МС за счёт

одновременной активации транскрипционного фактора IFR8, направляющего дифференцировку миелоидных предшественников в сторону моноцитов, и блокирования CCL5/CCR5-оси, вовлечённой при ММ в индукцию МС [30].

Вторым важным заключением нашего исследования стало то, что повышенное содержание М-МС у больных ММ после индукционной терапии было сопряжено с ослаблением супрессорного потенциала этих клеток за счёт снижения экспрессии Arg-1, в частности, выраженным и статистически значимым уменьшением доли Arg-1-экспрессирующих клеток в субпопуляции М-МС и тенденцией к снижению Arg-1+Г-МС. Похожие данные были получены Romano A. et al., продемонстрировавших снижение экспрессии Arg-1 в Г-МС у пациентов с ММ, получивших леналидомид, что может быть связано с иммуномодулирующим эффектом леналидомида [121]. В свою очередь, прогрессия заболевания, согласно полученным нами данным, характеризовалась повышенной долей Arg-1+ клеток в субпопуляциях Р-МС и Arg-1+ и PD-L1+ клеток среди М-МС на фоне сниженного количества Р-МС и М-МС, что может иметь важное значение с точки зрения опухолевой иммуносупрессии и прогрессии. Наши данные частично согласуются с опубликованными ранее работами. Так, например, повышенная Arg-1 у пациентов с рефрактерно-рецидивирующей ММ обнаружена в Г-МС ПК и КМ [121; 112]. При этом повышенная экспрессия PD-L1 при рефрактерно-рецидивирующем течении ММ продемонстрирована для М-МС КМ [116].

Согласно проведённому нами многофакторному анализу наиболее значимым фактором, контролирующим количество CD14+HLA-DR^{low}/–PD-L1+клеток, является режим терапии. PD-L1/PD-1-сигнальный путь играет важную роль при ММ, подавляя противоопухолевый Т-клеточный ответ, и рассматривается в качестве одной из мишеней для иммунотерапии ММ [116]. Экспрессия PD-L1 по данным литературы выявлялась как на иммунокомпетентных клетках, так и на клетках ММ [127]. Роль PD-L1/PD-1-оси в реализации иммуносупрессорных свойств в отношении Т-клеток описана

для МС при различных патологиях, причём этот механизм в большей степени характерен именно для М-МС [14; 128].

Еще одним результатом нашего исследования явилась характеристика МС и их супрессорного потенциала на фоне мобилизации ГСК. Выяснилось, что введение Г-КСФ вызывало экспансию в периферической крови всех типов МС, в том числе Г-МС и М-МС, экспрессирующих супрессорные молекулы Arg-1 и PD-L1. Предыдущие исследования также продемонстрировали возрастание всех субпопуляций МС на фоне введения Г-КСФ [16; 129]. Поскольку маркеры для идентификации Г-МС и нейтрофилов перекрываются, не исключено, что пул клеток Г-МС включал и незрелые нейтрофилы, несмотря на то, что мы использовали низкий градиент плотности для выделения МНК. На это указывает также полученные нами данные о несколько меньшем содержании Arg-1-, PD-L1- и IDO-экспрессирующих клеток только в пуле Г-МС. С другой стороны, учитывая чувствительность гранулоцитарных клеток к криоконсервированию [19], основными представителями МС в продукте афереза, сохраняющими в дальнейшем свою активность, по-видимому, являются М-МС.

Наиболее важными итогами исследования на наш взгляд стала характеристика МС в динамике ауто-ТГСК. Анализ этих клеток и их супрессорного потенциала перед ауто-ТГСК, на момент выхода из лейкопении, а также через 6 и 12 месяцев наблюдения показал, что после проведения режима кондиционирования с мелфаланом и инфузии ГСК на момент выхода из лейкопении регистрировалось транзиторное повышение количества циркулирующих МС (М-МС и Г-МС) с последующим снижением их количества до предтрансплантационных показателей к 12 месяцу. При этом, именно высокое содержание М-МС на этапе выхода из лейкопении ассоциировалось с меньшей продолжительностью критической лейкопении. Среди клинически значимых факторов, влияющих на сроки приживления трансплантата после ауто-ТГСК наиболее важная роль отводится содержанию CD34+ клеток в аутотрансплантате и предшествующей химиотерапии

(количество курсов и миелотоксичность используемых препаратов). Также имеют значение режим кондиционирования и возраст пациента [130; 131; 123; 132]. Обнаруженная нами ассоциация между содержанием М-МС и временем выхода из лейкопении является еще одним биомаркером, ассоциированным с эффективностью восстановления гемопоэза. Позитивная роль М-МС в этом случае может быть связана с участием М-МС в формировании/восстановлении ниши ГСК в костном мозге пациентов после ВДХТ.

Кроме того, нами было показано, что более высокое относительное содержание МС (М-МС $>1,47\%$, Г-МС $>0,11\%$ и Р-МС $>0,50\%$) на этапе выхода из лейкопении ассоциировано с большей длительностью безрецидивной выживаемости. В свою очередь, относительное количество циркулирующих Р-МС ($\leq 0,50\%$) в этот период является независимым достоверным фактором риска, ассоциированным с меньшей длительностью безрецидивной выживаемости.

Полученные результаты расходятся с данными LeeS.-E. и соавт., которые не выявили какой-либо прогностической значимости МС после трансплантации, однако обнаружили сопряженность между повышенным количеством М-МС на предтрансплантационном этапе и плохим прогнозом аутологичной трансплантации [13]. Такие расхождения могут быть связаны с разным режимом проведения индукционной терапии, а также возможными различиями в клинико-лабораторных характеристиках пациентов. Относительно низкого содержания Р-МС в качестве предиктора меньшей безрецидивной выживаемости, - важно отметить, что важнейшим прогностическим фактором течения ММ (согласно клиническим исследованиям) является ответ на противоопухолевую терапию и достижение ПО после завершения индукционного этапа терапии [133; 134]. Действительно, в нашем исследовании глубина ответа (отсутствие ПО) перед проведением ауто-ТГСК являлась достоверными факторами риска, ассоциированными с более высокой частотой ранних рецидивов ММ. В то же время

прогностическая значимость Р-МС на этапе ранней реконституции продемонстрирована впервые.

Таким образом, полученные результаты показывают отчётливую ассоциацию МС с фазой заболевания и свидетельствуют о клинической и прогностической значимости этих клеток на разных этапах терапии ММ. Особое значение, МС приобретают в раннем посттрансплантационном периоде. При этом судя по полученным данным, более высокое содержание МС на этапе энграфтинга и запуска гомеостатической пролиферации играет позитивную роль в исходах ауто-ТГСК.

В настоящем исследовании мы не оценивали прямую супрессорную активность МС в отношении аутологичных Т-клеток для выяснения взаимосвязи между временем наступления рецидива у пациентов с ММ после ауто-ТГСК и супрессорным потенциалом МС, что является одним из ограничений исследования. Кроме того, если предположить, что МС участвуют в формировании ниши ГСК в костном мозге, то безусловный интерес представляло бы исследование эффектов МС на дифференцировку ГСК.

Тем не менее, анализ экспрессии ингибиторных молекул в субпопуляциях МС показал, что возрастание М-МС при выходе из лейкопении сопровождается усилением в них экспрессии Arg-1 и PD-L1, что можно интерпретировать как усилением супрессорного потенциала М-МС и Р-МС. Эти данные расходятся с результатами исследований LeeS.-Е и соавт., которые показали, что М-МС и Р-МС в посттрансплантационном периоде не обладали супрессорным действием в отношении аутологичных Т-клеток и НКТ-клеток. Согласно общепринятым представлениям о роли МС, присутствие клеток с иммуносупрессорным потенциалом, может иметь важное значение с точки зрения прогноза и времени наступления рецидива. Так, например, PD-L1/PD-1- сигнальный путь может быть вовлечен в индукцию генерации Treg [135]. Однако экспрессия PD-L1 в МС к 12 мес наблюдения по нашим данным не превышает аналогичные показатели в группе доноров. Учитывая данные HoechstB. et al. [136] о том, что М-МС индуцируют Treg через Arg1-независимые механизмы, вопрос о том,

насколько критично обнаруженное нами изменение экспрессии Arg-1 в М-МС после трансплантации, требует дальнейшего изучения. В субпопуляции Г-МС умеренное возрастание экспрессии Arg-1 в этот период сочетается со снижением экспрессии PD-L1, что, по-видимому, связано с присутствием среди клеток с фенотипом Г-МС незрелых форм гранулоцитов, не являющихся МС.

Полученные в целом результаты позволяют сформулировать новую гипотезу, согласно которой МС способны играть позитивную роль на этапе выхода из лейкопении с точки зрения долгосрочной перспективы сохранности противоопухолевого ответа у пациентов с ММ. Данный период в условиях лейкопении характеризуется запуском гомеостатической пролиферации содержащихся в продукте афереза Т-клеток, что сопровождается сужением репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR). В связи с этим можно полагать, что ограничение гомеостатической пролиферации будет способствовать в последующем более эффективной реконституции Т-клеточного компартмента, предотвращая неконтролируемую экспансию быстро пролиферирующих клонов зрелых Т-клеток и обеспечивая формированию широкого репертуара TCR за счёт вновь образуемых наивных Т-клеток, тем самым снижая в дальнейшем риск рецидива опухоли и оппортунистических инфекций. Однако для подтверждения данной гипотезы необходимы дальнейшие исследования влияния МС на гомеостатическую пролиферацию и экспансию Т-лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа посвящена клинико-иммунологическому анализу содержания МС в ПК и экспрессии этими клетками ингибиторных молекул (Arg1, IDO, PD-L1) у больных ММ в динамике ауто-ТГСК и нацелена на изучение клинической и прогностической значимости МС на различных этапах терапии. 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 и условно здоровых доноров показало, что изменения в содержании МС у больных в ремиссии проявляются возрастанием относительного и абсолютного количества М-МС и увеличением доли Г-МС в сочетании со снижением абсолютного количества Р-МС, т.е. касаются всех трёх анализируемых субпопуляций МС. Также выяснилось, что уровень циркулирующих МС на этом этапе сопряжён с рядом клинических факторов – стадией ММ, режимом ИТ и глубиной ответа на терапию. В частности, наибольшие изменения регистрируются в следующих группах пациентов: а) с более продвинутой III стадией, б) получивших терапию бортезомибом и в) с полным или очень хорошим частичным ответом. При этом стадия заболевания является наиболее значимым фактором, достоверно влияющим на содержание Р-МС (F-критерий 5,28; $p=0,023$). Изменения в экспрессии ингибиторных молекул МС в фазе ремиссии проявляются снижением экспрессии Arg-1, в частности, выраженным и статистически значимым уменьшением доли Arg-1-экспрессирующих клеток в субпопуляции М-МС и тенденцией к снижению Arg-1+ Г-МС. Эти изменения наиболее выражены в группах пациентов, а) с III стадией ММ, б) более глубоким ответом на терапию и в) режимом терапии, включающим леналидомид. Так, если в группе пациентов, получивших ИТ бортезомибом, экспрессия Arg-1 в М-МС не меняется, а экспрессия PD-L1 даже возрастает, то в группе с терапией леналидомидом пациенты отличаются сниженным относительным содержанием Arg-1+ М-МС и достоверно меньшим содержанием PD-L1+ М-МС (в сравнении с оппозитной группой). Причём режим терапии является фактором, достоверно влияющим на содержание PD-L1+ М-МС (F-критерий 5,2; $p=0,046$) и на уровне тренда - Arg-1+ М-МС (F-критерий 2,76; $p=0,12$).

При сравнении пациентов в различных фазах заболевания выяснилось, что снижение МС ранних стадий дифференцировки и возрастание более дифференцированных форм МС (М-МС и Г-МС) регистрируется уже у

больных с впервые выявленной ММ. В фазе ремиссии наблюдается возрастание исходно сниженного содержания Р-МС (независимо от режима ИТ) и снижение повышенного содержания М-МС после терапии леналидомидом до нормативных значений. В то же время у больных с прогрессией заболевания, т.е. не ответивших на терапию или рецидивировавших после достижения ремиссии, содержание Р-МС вновь снижается. Причём, отличительным признаком прогрессии является то, что снижение Р-МС сочетается с преимущественным увеличением Г-МС в отсутствие достоверного возрастания М-МС. Кроме того, отличительной особенностью прогрессии является усиление экспрессии супрессорных молекул в М-МС (Arg-1 и PD-L1) и Р-МС (только Arg-1) по сравнению с контрольными значениями у доноров.

Таким образом, снижение содержания Р-МС и возрастание М-МС и Г-МС являются характерными изменениями в компартменте МС при ММ, которые регистрируются уже у больных впервые выявленной ММ, ослабевают при достижении ремиссии и вновь усиливаются при прогрессировании ММ. Количественные изменения в компартменте МС в ремиссии сочетаются со снижением экспрессии Arg-1 в М-МС, наиболее выраженном при терапии леналидомидом и сочетаются с меньшей, чем при лечении бортезомидом, экспрессией PD-L1 в М-МС. При этом стадия заболевания является значимым фактором, детерминирующим содержание Р-МС, а режим терапии – доминирующим фактором, влияющим на экспрессию PD-L1 в М-МС. Отличительным признаком прогрессии ММ является наиболее выраженное снижение доли Р-МС и увеличение доли Г-МС в отсутствие достоверного увеличения М-МС, а также повышенная экспрессия Arg-1 в М-МС и Р-МС и PD-L1 в М-МС.

Поскольку КСФ играют важную роль в генерации МС и используются для мобилизации ГСК, мы предположили, что продукт афереза при трансплантации ГСК может содержать повышенное количество МС с изменённой функцией. Соответственно, отдельный этап был посвящён

изучению влияния Г-КСФ на количественные и функциональные (экспрессия ингибиторных молекул) показатели МС ПК. В результате было показано, что 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.

Изучение МС в динамике ауто-ТГСК включало 4-кратное обследование больных – перед ауто-ТГСК, на момент выхода из лейкопении, а также через 6 и 12 месяцев наблюдения. Анализ этих данных показал, что, несмотря на существенное возрастание МС на этапе мобилизации ГСК, к началу кондиционирования абсолютное и относительное количество всех субпопуляций МС снижается до исходных значений, характерных для пациентов с ММ в фазе ремиссии (до введения Г-КСФ). Одновременно с этим отмечается снижение экспрессии Arg-1 в МС. Тем не менее, указанные параметры не достигают нормативных значений и в сравнении с донорами относительное содержание М-МС и Г-МС остаётся повышенным, а экспрессия Arg-1 сниженной.

В раннем посттрансплантационном периоде (на момент приживления трансплантата, соответствующий 12-16 дням после введения ГСК) наблюдается транзиторное возрастание доли М-МС, увеличение относительного и абсолютного содержания Г-МС и уменьшение абсолютного количества Р-МС, уровень которых к 6-12 месяцам наблюдения возвращается к таковому до трансплантации. Экспансия М-МС и Г-МС в сочетании со снижением Р-МС отражает, по-видимому, ускоренное созревание ранних предшественников в М-МС и Г-МС и не связана с пролиферацией трансплантируемых М-МС и Г-МС в составе продукта афереза, поскольку Г-МС разрушаются после криоконсервации, а содержание М-МС в продукте афереза 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 и снижением такового (за счёт выраженного уменьшения экспрессии PD-L1) в субпопуляции клеток с фенотипом Г-МС, представленных на данном этапе, скорее всего, незрелыми формами гранулоцитов и не являющихся МС. Важно отметить, что к 6-12 мес. наблюдения повышенный по сравнению с предтрансплантационным уровень Arg-1 в субпопуляции М-МС сохранялся, соответствуя нормативному диапазону. В то же время показатели экспрессии PD-L1 в М-МС, а также Arg-1 и IDO в Р-МС, превышающие уровень таковых у доноров, к 6-12 мес. наблюдения снижались до нормативных значений.

Анализ сопряженности МС с параметрами восстановления кроветворения и безрецидивной выживаемости показал, что процентное и абсолютное содержание М-МС обратно коррелирует с длительностью лейкопении. При этом доля циркулирующих М-МС по данным многофакторного дисперсионного анализа является фактором, достоверно влияющим на длительность лейкопении (F-критерий 7,66; $p = 0,008$), и не уступающим по значимости такому фактору, как количество трансплантированных CD34+ клеток/кг (F-критерий 6,95; $p=0,01$).

Кроме того, выяснилось, что уровни М-МС $>1,47\%$, Г-МС $>0,11\%$ и Р-МС $> 0,50\%$ на этапе выхода из лейкопении ассоциированы с более высокими показателями безрецидивной выживаемости. При этом относительное количество циркулирующих Р-МС на этапе выхода из лейкопении ($\leq 0,50\%$) по

данным регрессионного анализа Кокса является независимым достоверным 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 энграфтинга 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+ М-МС снижается, тогда как при отсутствии ответа или рецидиве наблюдается возрастание Arg-1+ и PD-L1+ клеток в М-МС и Arg-1+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+ клеток во всех субпопуляциях МС, PD-L1+М-МС и IDO+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.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Исследование МС целесообразно проводить всем пациентам - кандидатам на ауто-ТГСК до проведения кондиционирования высокими дозами цитостатиков и на этапе восстановления лейкоцитов.

2. Поскольку сниженное относительное содержание Р-МС $\leq 0,50\%$ является еще одним фактором достоверно ассоциированным с уменьшением сроков безрецидивной выживаемости (наряду с III-ей стадией ММ и отсутствием полного ответа на момент ауто-ТГСК), то пациентам, имеющим данные факторы риска, необходима более интенсивная поддерживающая терапия с более частым контролем ответа (не реже 1 раза в 2 мес) и обязательным изменением программы лечения при минимальных признаках прогрессии. Также для этих пациентов целесообразно проведение tandemной ауто-ТГСК.

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
ДБККЛ	Диффузная В-крупноклеточная лимфома
ГСК	Гемопозитические стволовые клетки
Алло-ТГСК	Аллогенная трансплантация гемопозитических стволовых клеток
Ауто-ТГСК	Аутологичная трансплантация гемопозитических 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 опухоли
МНК	Мононуклеарные клетки
COX2	Циклооксигеназа 2
МНС	Главный комплекс гистосовместимости
NK-клетки	Натуральные киллерные клетки
PD-L1	Лиганд к рецептору программированной клеточной смерти-1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ge Y. Mechanisms Underlying the Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Clinical Diseases: Good or Bad / D. Cheng, Q. Jia, H. Xiong, J. Zhang // Immune Netw. 2021. - Vol.21 - P.1-22
2. Salminen A. The role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in the inflammaging process/ Kaarniranta K., Kauppinen A. // Ageing Res. Rev. 2018 – Vol.48 – P.1–10
3. Condamine T. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells / Mastio J., Gabrilovich D.I. // J. Leukoc. Biol. 2015 – Vol.98 – P.913–922.
4. Bronte V. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards / Brandau S., Chen S.H. // Nat. Commun. 2016 – Vol.7 – A. N 12750
5. Gabrilovich D.I. Myeloid-Derived Suppressor Cells // Cancer Immunol. 2017 – Vol.5 – P. 3–8.
6. Veglia F. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity | Sanseviero E., Gabrilovich D.I.// Nat. Rev. Immunol. 2021 – Vol.8 – P. 485–498.
7. Sunakawa M. Clinical Impact and Possible Immunosuppressive Function of Soluble B7-H1 (PD-L1) in Multiple Myeloma / Tamura H., Ishibashi M. // Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia. 2017 – Vol.8 – P.110 – 111.
8. Lim H.X. Understanding the Differentiation, Expansion, Recruitment and Suppressive Activities of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancers / Kim T.S., Poh C.L. // Int. J. Mol. Sci. 2020 – Vol.10 – P.13-18.
9. Mengos A.E. The CD14 + HLA-DR lo/neg Monocyte: An Immunosuppressive Phenotype That Restrains Responses to Cancer Immunotherapy / Gastineau D.A., Gustafson M.P. // Front. Immunol. 2019– Vol.10 – P.
10. Diaz-Montero C.M. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-

- cyclophosphamide chemotherapy / Salem M.L., Nishimura M.I. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2009– Vol. 58 – P.49–59.
11. Palumbo G.A. Monocytic Myeloid Derived Suppressor Cells in Hematological Malignancies / Parrinello N.L., Giallongo C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019 – Vol. 20 – P. 54-59
 12. Zarobkiewicz M. High M-MDSC Percentage as a Negative Prognostic Factor in Chronic Lymphocytic Leukaemia / Kowalska W., Chocholska S // *Cancers Basel.* 2020 – Vol. 12 – P. 1–20.
 13. Lee S.-E. Different role of circulating myeloid-derived suppressor cells in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation / Lim J.-Y., Kim T.W. // *J. Immunother. Cancer.* 2019 – Vol. 7 – P.40-42.
 14. Azzaoui I. T-cell defect in diffuse large B-cell lymphomas involves expansion of myeloid-derived suppressor cells / Uhel F., Rossille D. // *Blood.* 2016 – Vol. 128 – P.1081–1092.
 15. Marini O. Identification of granulocytic myeloid-derived suppressor cells (G-MDSCs) in the peripheral blood of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma patients / Lv M. Monocytic and promyelocytic myeloid-derived suppressor cells may contribute to G-CSF-induced immune tolerance in haplo-identical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / Zhao X.-S., Hu Y. // *Am. J. Hematol.* 2015 – Vol. 90 – P.9–16.
 16. Demosthenous C. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) in Graft-versus-Host Disease (GVHD) / Sakellari I., Douka V.J. // *Clin. Med.* 2021 – Vol. 10 – P. 20–50
 17. Maybury B. Augmenting Autologous Stem Cell Transplantation to Improve Outcomes in Myeloma / Cook G., Pratt G. // *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2016 –Vol.22 – P.1926–1937.
 18. De Veirman K. Myeloid-derived suppressor cells induce multiple myeloma cell survival by activating the AMPK pathway / Menu E., Maes K. // *Cancer Lett.* 2019 – Vol.442 – P. 233–241.

19. Картик Р., Сагар Л. «Множественная миелома и плазмоклеточные заболевания» / Перевод Вотякова О. М. // г. Москва Практическая медицина, 2018 г
20. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018.
21. Kumar S K. Multiple myeloma Nature Reviews Disease / Rajkumar V., Kyle R. // Primers. 2017 – Vol. 3. – Article number: 17046
22. García-Ortiz A. The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression / Rodríguez-García Y., Encinas J. // Cancers (Basel). 2021 – Vol. 9; 13 №2 – P. 217.
23. Lee S.E. Circulating immune cell phenotype can predict the outcome of lenalidomide plus low-dose dexamethasone treatment in patients with refractory/relapsed multiple myeloma. / Lim J.Y.; Ryu D.B. // Cancer Immunol. Immunother. 2016 – Vol. 65 – P.983–994.
24. Giallongo C. Granulocyte-like myeloid derived suppressor cells (G-MDSC) are increased in multiple myeloma and are driven by dysfunctional mesenchymal stem cells (MSC) / Tibullo D.; Parrinello N.L // Oncotarget, 2016 – Vol.7 – P. 85764–85775.
25. Favaloro J. Myeloid derived suppressor cells are numerically, functionally and phenotypically different in patients with multiple myeloma / Liyadipitii T.; Brown R. // Leuk. Lymphoma. 2014 – Vol.55 – P.2893–2900.
26. Tai Y.T. APRIL signaling via TACI mediates immunosuppression by T regulatory cells in multiple myeloma: Therapeutic implications / Lin, L.; Xing I //Leukemia. 2019 – Vol.33 – P.426–438.
27. Romano A. Minimal Residual Disease Assessment within the Bone Marrow of Multiple Myeloma: A Review of Caveats, Clinical Significance and Future Perspectives/ Palumbo GA, Parrinello NL // Front Oncol. 2019– Vol.20 № 9 – P.699.

28. Wang Z. Tumor-induced CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells correlate with tumor progression and outcome of therapy in multiple myeloma patients / Zhang L., Wang H. // Cancer Immunol. Immunother. 2015 – Vol.64 – P.389–399.
29. Kuwahara-Ota S. Lenalidomide and pomalidomide potently interfere with induction of myeloid-derived suppressor cells in multiple myeloma / Shimura Y.; Steinebach C. // Br. J. Haematol. 2020 – Vol.191 № 5 – P.784-795.
30. De Veirman K. Multiple myeloma induces Mcl-1 expression and survival of myeloid-derived suppressor cells / Van Ginderachter, J.A.; Lub, S // Oncotarget. 2015 – Vol.6 – P.10532–10547.
31. Zhou J. Decitabine shows potent anti-myeloma activity by depleting monocytic myeloid-derived suppressor cells in the myeloma microenvironment / Lin, H.; Hu, L. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2019 – Vol.145 –P. 329–336.
32. Бессмельцев С. С. Множественная миелома (Патогенез, клиника, диагностика, дифференциальный диагноз). Часть I // Клиническая онкогематология. 2013 №3. P.237-257.
33. Heider M. Multiple Myeloma: Molecular Pathogenesis and Disease Evolution / Nickel K, Högner M // Oncol Res T. 2021 – Vol.44 № 12 – P.672-681.
34. Hanbali A. The Evolution of Prognostic Factors in Multiple Myeloma /Hassanein M, Rasheed W // Adv Hematol. 2017 – P. 26–37.
35. Durie B.G.M. A clinical staging system for multiple myeloma correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival / Salmon S.E.// Cancer. 1975– Vol. 36 № 3 – P. 842–854.
36. Greipp P.R. International staging system for multiple myeloma // J. Clin. Oncol. 2005 –Vol. 23, No 15 – P. 3412–3420.
37. Palumbo A. Revised international staging system for multiple myeloma: a report from international myeloma working group / Avet-Loiseau H., Oliva S. // Journal of Clinical Oncology. 2015– vol. 33, no. 26 – P.2863–2869.

38. Менделеева Л.П. Множественная миелома. Клинические рекомендации / Вотякова О.М., Рехтина И.Г // Современная Онкология. 2020 – Vol.22 № 4 – P.6 –28.
39. Tamura H. Expression, Functions, and Treatment Target of PD-L1 (B7-H1) in Multiple Myeloma /Ishibashi M, Sunakawa M // J Immunol Sci. 2018 – Vol.2 № 5 P.22-25.
40. Steensma D. P. A high bone marrow plasma cell labeling index in stable plateau-phase multiple myeloma is a marker for early disease progression and death / Gertz M. A.; Greipp P. R. // Blood .2001 – vol. 97 no. 8 P. 2522–2523.
41. Madan S. Plasma Cell Labeling Index in the Evaluation of Smoldering Multiple Myeloma | Kyle R A Greipp P. // Mayo Foundation for Medical Education and Research. 2010 –Vol. 85 № 3 –P.300.
42. Wallington-Beddoe C.T. Prognostic and predictive biomarker developments in multiple myeloma / Mynott R.L. // J Hematol Oncol. 2021– Vol.14 – P.151.
43. Li F. MicroRNA-15a/16-1 cluster located at chromosome 13q14 is down-regulated but displays different expression pattern and prognostic significance in multiple myeloma / Xu Y., Deng S // Oncotarget. 2015–vol. 6, № 35 – P. 38270–38282.
44. Wang L. Serum levels of soluble programmed death ligand 1 predict treatment Trotter T. N. Myeloma cell-derived Runx2 promotes myeloma progression in bone / Li M., Pan Q //Blood 2015 vol. 125, № 23, P.3598–3608.
45. Soliman AM. Next-Generation Biomarkers in Multiple Myeloma: Understanding the Molecular Basis for Potential Use in Diagnosis and Prognosis /Das S, Teoh SL. // Int J Mol Sci. 2021 – Vol.13; 22 №14 – P.74–70.
46. Joshi, S. Angiopoietin-2: A potential novel diagnostic marker in multiple myeloma / Khan, R.; Sharma, M. // Clin. Biochem. 2011 – Vol.44 – P.590–595.
47. Fan, F. JunB is a key regulator of multiple myeloma bone marrow angiogenesis / Malvestiti, S.; Vallet, S // Leukemia. 2021– Vol.35–P 3509–3525.

48. Khan, R. Cinnamon extract exhibits potent anti-proliferative activity by modulating angiogenesis and cyclooxygenase in myeloma cells / Sharma, M.; Kumar L // J. Herb. Med. 2016 – Vol.6 – P.149–156.
49. Gu, Y. Low Absolute CD4⁺ T Cell Counts in Peripheral Blood Predict Poor Prognosis in Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma / Jin, Y.; Ding, J. // Leuk. Lymphoma. 2020–Vol. 61– P.1869–1876.
50. Sharma, A. Dysregulation in T Helper 1/T Helper 2 Cytokine Ratios in Patients with Multiple Myeloma / Khan R.; Joshi, S. // Leuk. Lymphoma. 2010 – Vol.51 – P.920–927.
51. Ogawara, H. High Th1/Th2 Ratio in Patients with Multiple Myeloma / Handa H.; Yamazaki T. // Leuk. Res. 2005 - Vol. 29 - P.135–140.
52. Zhou, L. IL-6 Programs T H-17 Cell Differentiation by Promoting Sequential Engagement of the IL-21 and IL-23 Pathways / Ivanov, I.I.; Spolski, R // Nat. Immunol. 2007 - Vol.8 – P.967–974.
53. Prabhala, R.H. Elevated IL-17 Produced by TH17 Cells Promotes Myeloma Cell Growth and Inhibits Immune Function in Multiple Myeloma / Pelluru, D.; Fulciniti, M // Blood. 2010 – Vol. 115 – P.5385–5392.
54. Zavidij O. Single-Cell RNA Sequencing Reveals Compromised Immune Microenvironment in Precursor Stages of Multiple Myeloma / Haradhvala, N.J.; Mouhieddine T.H // Nat. Cancer. 2020 - Vol.1 – P.493–506.
55. Rossi, M. Immunologic Microenvironment and Personalized Treatment in Multiple Myeloma / Botta, C.; Correale P // Expert Opin. Biol. Ther. 2013 - Vol.13, P.83–93.
56. Diaz-Tejedor A. Immune System Alterations in Multiple Myeloma: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies to Reverse Immunosuppression / Lorenzo-Mohamed M, PuigN // Cancers. 2021 – Vol.13 - P.1353.
57. Quarona V. Unraveling the Contribution of Ectoenzymes to Myeloma Life and Survival in the Bone Marrow Niche: Ectoenzymes and the Myeloma Niche. Ferri, V.; Chillemi, A // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2015 – Vol. 1335 – P.10–22.

58. Sunakawa, M. Clinical Impact and Possible Immunosuppressive Function of Soluble B7-H1 (PD-L1) in Multiple Myeloma / Tamura, H.; Ishibashi, M // Clin. Lymphoma Myeloma Leuk. 2017 - Vol.17 – P.110–111.
59. Tamura H. Marrow Stromal Cells Induce B7-H1 Expression on Myeloma Cells, Generating Aggressive Characteristics in Multiple Myeloma / Ishibashi M.; Yamashita T // Leukemia. 2013 – Vol. 27 – P.464–472.
60. Ishibashi M. Myeloma Drug Resistance Induced by Binding of Myeloma B7-H1 (PD-L1) to PD-1/ Tamura H.; Sunakawa M // Cancer Immunol. Res. 2016 – Vol.4 - P. 779–788.
61. Wang, J. Increased Activated Regulatory T Cell Subsets and Aging Treg-like Cells in Multiple Myeloma and Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance: A Case Control Study. Cao, X.; Zhao, A Cancer Cell Int. 2018 – Vol.18 – P.187.
62. Hadjiaggelidou C. T-Cells and Multiple Myeloma: Implications in Tumor Immune Biology and Treatment / Katodritou E., Regulatory // J Clin Med. 2021 - Vol. 5; 10 № 19 - P. 4588.
63. Giannopoulos, K. The Frequency of T Regulatory Cells Modulates the Survival of Multiple Myeloma Patients: Detailed Characterisation of Immune Status in Multiple Myeloma / Kaminska, W.; Hus, I. // Br. J. Cancer. 2012 – Vol.106 - P. 546–552.
64. Yang R., Misund., et al. Immunosuppressive adenosine - a novel treatment target for multiple myeloma / Elsaadi S. // Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia. 2019 - Vol. 19 - № 10 - P.137-138.
65. El-Sherbiny Y.M. The Requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the Natural Killer Cell-Mediated Killing of Myeloma Cells / Meade, J.L.; Holmes, T.D. // Cancer Res. 2007 – Vol. 67 – P. 8444–8449.
66. Zou, Z. Onset of Regulatory B Cells Occurs at Initial Stage of B-cell Dysfunction in Multiple Myeloma / Guo, T.; Cui, J. Blood - 2019 - Vol.134 - P.1780.

67. Zhang, L. Regulatory B-Cell Myeloma Cell Interaction Confers Immunosuppression and Promotes Their Survival in the Bone Marrow Milieu / Tai Y.T.; Ho, M. // Blood Cancer J. 2017 – Vol.7 - P.547.
68. Brimnes M.K. Impaired Functionality and Phenotypic Profile of Dendritic Cells from Patients with Multiple Myeloma /Svane I.M.; Johnsen H.E. // Clin. Exp. Immunol. 2006 - Vol.144 - P.76–84.
69. Leone P. Dendritic cells accumulate in the bone marrow of myeloma patients where they protect tumor plasma cells from CD8+ T-cell killing / Berardi S, Frassanito MA // Blood. 2015 - Vol. 17; 126 №12 - P.1443-1451.
70. Kim J. Macrophages and Mesenchymal Stromal Cells Support Survival and Proliferation of Multiple Myeloma Cells / Denu R.A.; Dollar B. // A.Br. J. Haematol. 2012 - vol.158 - P.336–346.
71. Suyan E. Tumor-Associated Macrophages as a Prognostic Parameter in Multiple Myeloma / Sucak G.T.; Akyrek N. // Ann. Hematol. 2013 - Vol.92 - P.669–677.
72. Romano A. Immunological dysregulation in multiple myeloma microenvironment / Conticello C, Cavalli M //Biomed Res Int. 2014 - P.198 -539.
73. Forster S. Molecular Impact of the Tumor Microenvironment on Multiple Myeloma Dissemination and Extramedullary Disease / Radpour R //Front Oncol. 2022 Vol. 1; № 12 - 941437.
74. Melaccio A. Pathways of Angiogenic and Inflammatory Cytokines in Multiple Myeloma: Role in Plasma Cell Clonal Expansion and Drug Resistance / Reale A, Saltarella I //J Clin Med. 2022 Vol. 1; 11 № 21 - P.491.
75. Musolino C. Inflammatory and Anti-Inflammatory Equilibrium, Proliferative and Antiproliferative Balance: The Role of Cytokines in Multiple Myeloma / Allegra, A.; Innao, V //Mediat. Inflamm. 2017 - Vol.24 - 1852517
76. Matthes T. Revisiting IL-6 antagonism in multiple myeloma / Manfroi B, Huard B. // Crit Rev Oncol Hematol. 2016 - Vol. 105 - P.1-4.
77. Худовекова А.С. Роль микроокружения костного мозга в прогрессии множественной миеломы из моноклональной гаммапатии неясного генеза /

- Руденко Я.А., Доросевич А.Е. // Онкогематология. 2021 - Vol.16 №3 - P.26 - 32.
78. Talmadge J. History of myeloid derived suppressor cells (MDSCs) in the macro- and micro-environment of tumour-bearing hosts / D. Gabrilovich // Nat Rev Cancer. 2013 - Vol. 13 № 10 - P. 739–752.
79. Botta C. Myeloid-derived suppressor cells in multiple myeloma: pre-clinical research and translational opportunities / Gullà A, Correale P // Front Oncol. 2014 - Vol. 8 №4 -P.348.
80. Gabrilovich DI. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours / Ostrand-Rosenberg S, Bronte V // Nat Rev Immunol. 2012 - Vol. 2 - P.53–68.
81. Marigo I. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBP-beta transcription factor / Bosio E, Solito S. // Immunity. 2010 – Vol. 32 – P.790–802.
82. Nagaraj S. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer / Gupta K, Pisarev V // Nat Med. 2007 – Vol.13 – P.828–35.
83. Hanson EM. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells / Clements VK, Sinha P // J Immunol. 2009 – Vol.183 № 2 – P.937–44
84. Sinha, P. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease / Clements, V.K.; Ostrand-Rosenberg S.J. // Immunol. Baltim. Md. 1950. 2005 – Vol. 174 – P.636–645.
85. Kawano M. The significance of G-CSF expression and myeloid-derived suppressor cells in the chemoresistance of uterine cervical cancer / Mabuchi S, Matsumoto Y. // Scientific reports. 2015 – Vol.5 – P.18217.
86. Liang, Y. Increased circulating GrMyeloid-derived suppressor cells correlated with tumor burden and survival in locally advanced cervical cancer patient / Lu, B.; Zhao, P // J. Cancer. 2019 – Vol. 10 – P.1341–1348.
87. Gabitass, R.F. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are

- associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13/ Annels, N.E.; Stocken, D.D.// Cancer Immunol. Immunother. CII 2011 – Vol. 60 – P. 1419–1430.
88. Vetsika, E.-K. Circulating Subpopulation of Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells as an Independent Prognostic/Predictive Factor in Untreated Non-Small Lung Cancer Patients / Koinis, F.; Gioulbasani, M. //J. Immunol. Res. 2014 - Vol. 12.
 89. Romano A. Circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical outcome in Hodgkin Lymphoma patients treated up-front with a risk-adapted strategy / Parrinello NL, Vetro C //Br J Haematol. 2015 – Vol.168 № 5 – P. 689–700.
 90. Wang Z. Elevated M-MDSCs in circulation are indicative of poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients /Jiang R, Li Q // Clin Med. 2021 – Vol.10 № 8 – P.1768.
 91. Jiménez-Cortegana C. Lower survival and increased circulating suppressor cells in patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma with deficit of vitamin d levels using R-GDP plus lenalidomide (R2-GDP): results from the R2-GDP-GOTEL trial / Sánchez-Martínez PM, Palazón-Carrión N // Cancers. 2021– Vol.13 №18 - P.4622.
 92. Zhang H. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T cell proliferation in human extranodal NK/T cell lymphoma: a novel prognostic indicator / Li ZL, Ye SB // Cancer Immunol Immunother. 2015 – Vol.64 №12 – P.1587– 99.
 93. Sun H. Increase in myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) associated with minimal residual disease (MRD) detection in adult acute myeloid leukemia / Li Y, Zhang ZF // Int J Hematol. 2015 – Vol.102 №5 – P.579–586. .
 94. Lv J. Increased levels of circulating monocytic- and early-stage myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in acute myeloid leukemia / Zhao Y, Zong H //Clin Lab. 2021 – Vol. 1 – P.67.

95. Wang H. Circulating monocytic myeloid-derived suppressor cells are elevated and associated with poor prognosis in acute myeloid leukemia / Tao Q, Wang Z // J Immunol Res. 2020 - Article ID 7363084.
96. Bai H. Cytarabine-induced TNF α promotes the expansion and suppressive functions of myeloid-derived suppressor cells in acute myeloid leukemia / Peng Y, Li Y // Scand J Immunol. 2022 - Vol.95 № 6 P.13158.
97. Zahran AM. Increase in polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells and regulatory T-cells in children with B-cell acute lymphoblastic leukemia / Shibl A, Rayan A // Sci Rep. 2021 – Vol.11 №1 – P.15039.
98. Hohtari H. Immune cell constitution in bone marrow microenvironment predicts outcome in adult ALL / Brück O, Blom S. // Leukemia. 2019 – Vol.33№7 – P.1570–1582.
99. Trabanelli S. Tumour-derived PGD2 and NKp30-B7H6 engagement drives an immunosuppressive ILC2-MDSC axis / Chevalier MF, Martinez-Usatorre A // Nat Commun. 2017 – Vol. 8№1 –P.593.
100. Christiansson L. The tyrosine kinase inhibitors imatinib and dasatinib reduce myeloid suppressor cells and release effector lymphocyte responses / Söderlund S, Mangsbo S. // Mol Cancer Ther. 2015 – Vol.14№5 – P.1181–1191.
101. Giallongo C. Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) are increased and exert immunosuppressive activity together with polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in chronic myeloid leukemia patients / Parrinello N, Tibullo D // PLoS ONE. 2014 –Vol.9 №7 –P.101848.
102. Giallongo C. Monocytic myeloid-derived suppressor cells as prognostic factor in chronic myeloid leukaemia patients treated with dasatinib / Parrinello NL, La Cava P J // Cell Mol Med. 2018 – Vol.22 №2 P.1070–80.
103. Zahran AM. Monocytic myeloid-derived suppressor cells in chronic lymphocytic leukemia patients: a single center experience / Moeen SM, Thabet AF // Leuk Lymphoma. 2020 – Vol.61№7 – P.1645–52.

104. Ferrer G. Myeloid-derived suppressor cell subtypes differentially influence T-cell function, T-helper subset differentiation, and clinical course in CLL / Jung B, Chiu PY // Leukemia. 2021 – Vol.35№11 –P.3163–3175.
105. Wang Z. Tumor-induced CD14+HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with tumor progression and outcome of therapy in multiple myeloma patients / Zhang L, Wang H. //Cancer Immunol Immunother. 2015 – Vol.64№3 - P.389–399.
106. Zhigang Yi. The yin-yang effects of immunity: From monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma / Tao Ma, Jia Liu //Front Immunol. 2022 – Vol. 13 – ID 925266
107. M. Binsfeld. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells promote angiogenesis in the context of multiple myeloma / J. Muller //OncoTarget. 2016 - Vol.7 – P.37931-37943.
108. Brimnes M. Increased level of both CD4+FOXP3+ regulatory T cells and CD14+HLA-DR⁻ /low myeloid-derived suppressor cells and decreased level of dendritic cells in patients with multiple myeloma / Vangsted L, KnudsenScand // J Immunol . 2010 – Vol. 72 № 6 - P.540-547.
109. Ramachandran I.R. Myeloid derived suppressor cells regulate growth of multiple myeloma by inhibiting T cells in bone marrow / Martner A., Pisklakova A. //J. Immunol. 2013 – Vol.190 – P. 3815.
110. G.T. Görgün. Tumor-promoting immune-suppressive myeloid-derived suppressor cells in the multiple myeloma microenvironment in humans / G. Whitehill, J.L. Anderson // Blood. 2013 - Vol.121 P.2975.
111. Бессмельцев С. С. Множественная миелома (Патогенез, клиника, диагностика, дифференциальный диагноз). Часть II // Клиническая онкогематология. 2013 Номер 4.
112. С.В.Грицаев. Отдельные аспекты аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при множественной миеломе/ А.А. Кузьева, С.С. Бессмельцев //Клиническая онкогематология. 2017 – Vol.10 № 1 – P.7–12.

113. Fleming, V. Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Bypass Tumor-Induced Immunosuppression. Hu, X.; Weber, R.; Front. Immunol. 2018 – Vol.9– P.398.
114. Görgün G. Lenalidomide Enhances Immune Checkpoint Blockade-Induced Immune Response in Multiple Myeloma / Samur M // Clin Cancer Res. 2015 - Vol.21 (20) – P.4607–4618.
115. Sivaraj D. High-dose BCNU/Melphalan conditioning regimen before autologous stem cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma. Bacon W, Long GD / Bone Marrow Transplant. 2018 - Vol.53№1 – P.34-38.
116. Vendramin A. Graft Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell Content Predicts the Risk of Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Transplantation of Granulocyte Colony-Stimulating Factor–Mobilized Peripheral Blood Stem Cells. / S. Gimondi, A.Bermema // Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2014–Vol.20 - P. 2049-2055.
117. Yang T. MDSCs might be "Achilles heel" for eradicating CSCs / Liang N, Li J // Cytokine Growth Factor Rev. 2022 - Vol.65 – P.39-50.
118. Kumar V. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment / Gabrilovich DI. Patel S //Trends Immunol. 2016 Vol.37 - №3 – P.208-220.
119. Romano A. PMN-MDSC and arginase are increased in myeloma and may contribute to resistance to therapy. Parrinello NL, La Cava P // Expert Rev Mol Diagn. 2018 – Vol. 18 №7 – P.675-683.
120. Wang J. Bone marrow stromal cell-derived exosomes as communicators in drug resistance in multiple myeloma cells /Hendrix A, Hernot S // Blood. 2014 - Vol. 24 № 4 – P.555-566.
121. Grubovic RM. Analysis of Factors that Influence Hematopoietic Recovery in Autologous Transplanted Patients with Hematopoietic Stem Cells from Peripheral Blood / Georgievski B, Cevreska L // Open Access Maced J Med Sci. 2017 - Vol.3;5№3 – P.324-331.

122. Ai L. Myeloid-derived suppressor cells endow stem-like qualities to multiple myeloma cells by inducing piRNA-823 expression and DNMT3B activation /Mu S, Sun C // Mol Cancer. 2019 – Vol. 13; 18 №1 – P.88.
123. Kröning H. Overproduction of IL-7, IL-10 and TGF-beta 1 in multiple myeloma/ Träger M, Thiel U // Acta Haematol. 1997 - Vol.2 - 116-118.
124. Dong M. Role of transforming growth factor- β in hematologic malignancies/ Blobe G.C. // Blood. 2006 – Vol.107 - P. 4589.
125. Rosenblatt J. Targeting the PD-1/PD-L1 axis in multiple myeloma: a dream or a reality/ Avigan D// Blood. 2017 – Vol.129 – P. 275–279.
126. Chikamatsu K. Immunosuppressive activity of CD14+ HLA- DR– cells in squamous cell carcinoma of the head and neck/ Sakakura K., Toyoda M.// Cancer Sci. 2012 – Vol.103 – P. 976.
127. Gyger M. Immunobiology of allogeneic peripheral blood mononuclear cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor/ Stuart R.K., Perreault C. // Bone Marrow Transplant. 2000 - Vol.261№ 26 - 1–16.
128. Ergene Ü. Factors influencing engraftment in autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation (PBSCT)/ S. Çağırhan, M. Pehlivan// Transfus. Apher. Sci. 2007 - Vol.36 - P. 23–29.
129. Hassan M.N. Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation Among Lymphoproliferative Disease Patients: Factors Influencing Engraftment/. Fauzi H.M, Husin A. // Oman Med. J. 2019 – Vol. 34.
130. Gonçalves T.L. Specific factors influence the success of autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation/ D.M. Benvegnù, G. Bonfanti// Oxid. Med. Cell. Longev. 2009 – vol. 2 – P.82.
131. Kim J.S. Complete Remission Status before Autologous Stem Cell Transplantation Is an Important Prognostic Factor in Patients with Multiple Myeloma Undergoing Upfront Single Autologous Transplantation / Kim K., Cheong J.W //Biol. Blood Marrow Transplant. 2009 –Vol.15 - P.463–470.

132. Landgren O. Modern multiple myeloma therapy: deep, sustained treatment response and good clinical outcomes/ K. Iskander// J. Intern. Med. 2017 - Vol.281 P.365–382.
133. R.A. Wilcox. B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders/ Feldman A.L., Wada D.A. // Blood. 2009 - Vol.114 - P. 2149.
134. Hoechst B. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4 (+)CD25(+)Foxp3(+) T cells Ormandy L.A., Ballmaier, M.// Gastroenterology. 2008 – Vol. 135 - P.234–243.
135. Luyckx A. G-CSF stem cell mobilization in human donors induces polymorphonuclear and mononuclear myeloid-derived suppressor cells/ Schouppe E., Rutgeerts O.// Clin Immunol. 2012 – Vol. 143 –P.83-87.