

ЭКСПРЕССИЯ ИНГИБИТОРНЫХ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ PD-1 И TIM-3 Т-ЛИМФОЦИТАМИ В РАННЕМ ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Баторов Е. В., Сергеевичева В. В., Аристова Т. А., Сизикова С. А., Ушакова Г. Ю., Гилевич А. В., Шевела Е. Я., Останин А. А., Черных Е. Р.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», 630099, Новосибирск, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Высокодозная химиотерапия (ВХТ) с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) является стандартом лечения больных множественной миеломой (ММ). Таргетная терапия, направленная против ингибиторных сигнальных молекул, представляется перспективным методом лечения ММ в посттрансплантационном периоде.

Цель — изучение динамики восстановления Т-клеток, экспрессирующих ингибиторные сигнальные молекулы PD-1 и TIM-3, у больных ММ в условиях лимфопении после ВХТ с ауто-ТГСК, а также оценка их функциональных свойств.

Методы. В исследование включено 40 больных ММ, перенесших ВХТ с ауто-ТГСК. Количество PD-1- и TIM-3-позитивных CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток и их функциональную активность по внутриклеточной экспрессии Ki-67, продукции гранзима В и интерферона-γ оценивали методом проточной цитометрии.

Результаты. Выявлено более высокое относительное содержание PD-1⁺ и TIM-3⁺ клеток в субпопуляциях CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов в образцах костного мозга больных по сравнению с периферической кровью. CD8⁺PD-1⁺ и CD4⁺PD-1⁺ Т-клетки больных ММ обладали выраженным цитотоксическим и цитокин-продуцирующим потенциалами. Функциональная активность CD8⁺TIM-3⁺ и CD4⁺TIM-3⁺ Т-клеток была снижена по сравнению с TIM-3-негативными субпопуляциями. Низкая функциональная активность также была выявлена в популяциях CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов, ко-экспрессирующих PD-1 и TIM-3. Относительное количество Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и TIM-3, увеличивалось на день выхода из лейкопении после ауто-ТГСК, также были увеличены пролиферативная активность PD-1⁺ и TIM-3⁺ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и цитотоксический потенциал PD-1⁺ и TIM-3⁺ CD8⁺ Т-клеток по сравнению с показателями до ауто-ТГСК.

Заключение. PD-1-позитивные Т-клетки у больных ММ являются активированными либо «ранними дисфункциональными» субпопуляциями лимфоцитов, тогда как CD8⁺TIM-3⁺ и CD4⁺TIM-3⁺ Т-клетки, а также субпопуляции, ко-экспрессирующие PD-1 и TIM-3, характеризуются признаками Т-клеточного истощения. Для идентификации состояния Т-клеточного истощения у больных ММ необходима оценка субпопуляций Т-клеток, ко-экспрессирующих PD-1, TIM-3 и другие ингибиторные сигнальные молекулы, и/или исследование их функциональных свойств. В раннем посттрансплантационном периоде доля Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и TIM-3, возрастает за счет усиления их пролиферативного потенциала.

Ключевые слова: множественная миелома, трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, ингибиторные сигнальные молекулы, PD-1, TIM-3, Т-клеточное истощение, гомеостатическая пролиферация

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: грант Российского научного фонда (проект № 18-75-00050), бюджетные средства НИИФКИ (темы № 1021032423630-5, 1021062512013-6).

Для цитирования: Баторов Е.В., Сергеевичева В.В., Аристова Т.А., Сизикова С.А., Ушакова Г.Ю., Гилевич А.В., Шевела Е.Я., Останин А.А., Черных Е.Р. Экспрессия ингибиторных сигнальных молекул PD-1 и TIM-3 Т-лимфоцитами в раннем посттрансплантационном периоде у больных множественной миеломой. Гематология и трансфузиология. 2021; 66(4): 499–511. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2021-66-4-499-511>

EXPRESSION OF PD-1 AND TIM-3 INHIBITORY CHECKPOINT MOLECULES BY T-LYMPHOCYTES IN EARLY POST-TRANSPLANT PERIOD IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS

Batorov E. V.^{*}, Sergeevicheva V. V., Aristova T. A., Sizikova S. A., Ushakova G. Y., Gilevich A. V., Shevela E. A., Ostanin A. A., Chernykh E. R.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, 630099, Novosibirsk, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. High-dose chemotherapy (HDC) with autologous hematopoietic stem cell transplantation (auto-HSCT) is the standard of treatment for multiple myeloma (MM) patients. The post-transplant period appears to be promising for targeted anti-checkpoint therapy in MM.

Aim — to study the dynamics and functional properties of T-cells expressing inhibitory checkpoint molecules PD-1 and TIM-3 in patients with MM under conditions of lymphopenia after HDC with auto-HSCT.

Methods. The study included 40 patients with MM who underwent HDC with auto-HSCT. The counts of PD-1- and TIM-3-positive CD8⁺ and CD4⁺ T-cells and their functional activity on the intracellular expression of Ki-67, production of granzyme B, and interferon- γ were assessed by flow cytometry.

Results. Relative counts of patient PD-1⁺ and TIM-3⁺ subsets of CD8⁺ and CD4⁺ T-cells obtained from bone marrow samples were higher compared to peripheral blood. CD8⁺PD-1⁺ and CD4⁺PD-1⁺ T-cells of MM patients had a pronounced cytotoxic and cytokine-producing potential. The functional activity of CD8⁺TIM-3⁺ and CD4⁺ TIM-3⁺ T-cells was significantly reduced compared with TIM-3-negative subsets. Low functional activity was also detected in populations of CD8⁺ and CD4⁺ T-lymphocytes, co-expressing PD-1 and TIM-3. The frequencies of T-cells expressing PD-1 and TIM-3 increased significantly on the engraftment day after auto-HSCT. The proliferative activity of PD-1⁺ and TIM-3⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T-cells and the cytotoxic potential of PD-1⁺ and TIM-3⁺ CD8⁺ T-cells were also significantly increased compared to the data prior auto-HSCT.

Conclusions. PD-1-positive T-cells in MM patients are related to activated or “early dysfunctional” but not exhausted subsets, while T-cells exhaustion is more analogous with CD8⁺TIM-3⁺ and CD4⁺TIM-3⁺ T-cells, as well as with subsets co-expressing PD-1 and TIM-3. To identify the state of T-cells exhaustion, it is necessary to evaluate T-cells subsets co-expressing PD-1, TIM-3, and other ICMs, and/or to study their functional properties. In the early post-transplant period, the proportion of T-cells expressing PD-1 and TIM-3 increases due to an increase in their proliferative potential.

Keywords: multiple myeloma, autologous hematopoietic stem cell transplantation, inhibitory checkpoint molecules, PD-1, TIM-3, T-cell exhaustion, homeostatic proliferation

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Financial disclosure: the Russian Science Foundation grant No. 18-75-00050, budget of Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (themes No. 1021032423630-5, 1021062512013-6).

For citation: Batorov E.V., Sergeevicheva V.V., Aristova T.A., Sizikova S.A., Ushakova G.Y., Gilevich A.V., Shevela E.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Expression of PD-1 and TIM-3 inhibitory checkpoint molecules by T-lymphocytes in early post-transplant period in multiple myeloma patients. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2021; 66(4): 499–511 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2021-66-4-499-511>

Введение

Множественная миелома (ММ) представляет собой В-клеточную опухоль с дифференцировкой малигнизированных клеток-предшественников до плазматических клеток. Заболеваемость ММ составляет 1% от всех случаев опухолевых заболеваний [1]. Благодаря широкому использованию ингибиторов протеасом и иммуномодулирующих препаратов, а также высокодозной химиотерапии (ВХТ) с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК), медиана общей выживаемости больных увеличилась до 5–7 лет, однако прогрессия болезни считается неизбежной [1, 2]. Развитие ММ ассоциировано с генетическими изменениями на уровне клеток, приводящими к нарушениям взаимодействий между опухолью, микроокружением и иммунной системой. Одним из проявлений такого взаимодействия является развитие Т-клеточного истощения (T-cell exhaustion), которое фенотипически характеризуется стабильной экспрессией ингибиторных сигнальных «чек-поинт» молекул (ИСМ), таких как PD-1, LAG-3, TIM-3, а функционально приводит к уменьшению секреции провоспалительных цитокинов (интерлейкина-2, интерферона- γ (ИФН- γ) фактора некроза опухоли альфа), выраженному снижению цитотоксической функции и пролиферативного потенциала [3], что препятствует развитию полноценного противоопухолевого иммунного ответа. В то же время экспрессия одной или нескольких ИСМ не является показателем Т-клеточного истощения. ИСМ экспрессируются активированными Т-клетками с сохранной пролиферативной и цитотоксической функциями в норме и при патологии [4, 5].

Увеличение количества Т-клеток, экспрессирующих ИСМ — PD-1, TIM-3, LAG-3 и др., выявлено при классической лимфоме Ходжкина (ЛХ), некоторых неходжкинских лимфомах (НХЛ) и ММ [6–8]. Использование препаратов моноклональных антител, блокирующих ИСМ, приводит к увеличению выживаемости при резистентном течении ЛХ [9, 10]. Результаты таргетной анти-PD-1 терапии при рецидивирующих/резистентных НХЛ и ММ в настоящее время очень скромны [11, 12].

ВХТ с ауто-ТГСК остается стандартом лечения больных ММ, не имеющих противопоказаний. Проведение ВХТ приводит к деплеции опухолевого клона и к длительной лимфопении; последняя индуцирует периферическую экспансию зрелых лимфоцитов, реинфузированных в составе аутологичного продукта афереза совместно с гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК). Таргетная терапия, направленная против ИСМ, представляется перспективным методом усиления противоопухолевого иммунного ответа в посттрансплантационном периоде [13]. Динамика восстановления Т-клеток, экспрессирующих ИСМ, после

ауто-ТГСК, в том числе при ММ, недостаточно изучена, а имеющиеся данные противоречивы. Увеличение экспрессии PD-1 описано в последние два года в моделях трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, выполненных на мышах [14, 15], у больных после ауто-ТГСК [14], у больных гемобластомами после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток [16] и больных системной склеродермией после ауто-ТГСК [17]. У больных ММ не было ранее выявлено различий в содержании ИСМ до и после ВХТ с ауто-ТГСК [18].

Цель настоящей работы — изучить динамику восстановления Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и TIM-3, у больных ММ в условиях длительной лимфопении после ВХТ с ауто-ТГСК, а также оценить их функциональные свойства.

Материал и методы

В исследование включены 40 больных ММ, которым в период с марта 2018 г. по январь 2020 г. были проведены ВХТ и ауто-ТГСК на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (табл. 1).

Режим мобилизации включал инфузию циклофосфида ($2\text{--}4\text{ г/м}^2$) с последующим введением гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (5 мкг/кг/день) в течение 4–5 дней до достижения в периферической крови (ПК) концентрации $10^4\text{ CD34}^+\text{CD45}^+$ клеток/мл. Процедуру афереза выполняли на сепараторах клеток крови ASTEC 204 (Fresenius, Германия) и Spectra LRS 07 (COBE) до получения $\geq 2,0 \times 10^6\text{ CD34}^+\text{CD45}^+$ клеток/кг (1–2 процедуры афереза). Медиана реинфузированных $\text{CD34}^+\text{CD45}^+$ ГСК составляла $4,55 \times 10^6/\text{кг}$ ($3,30\text{--}5,80 \times 10^6/\text{кг}$). ВХТ перед ауто-ТГСК проводили через 2–6 мес. после сепарации ГСК, в этом промежутке всем больным проводили поддерживающую терапию бортезомибом, при рецидиве ММ использовали программы с леналидомидом (VRD, RD, RCD, монотерапия леналидомидом) и другие комбинации цитостатических препаратов (DCEP, BBD). Режим кондиционирования — мелфалан $140\text{--}200\text{ мг/м}^2$, дозу рассчитывали с учетом сопутствующих заболеваний. Всем больным после ауто-ТГСК проводили поддерживающую терапию бортезомибом или леналидомидом.

Взятия образцов крови, костного мозга (КМ) и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия больного. Содержание субпопуляций Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и TIM-3, оценивали в ПК и КМ больных перед началом кондиционирования ($n = 25$), после ауто-ТГСК в день выхода из лейкопении (лейкоциты $> 1 \times 10^9/\text{л}$, в среднем на 14-й день, $n = 28$, только ПК) и через 6 мес. ($n = 21$, ПК и КМ).

Таблица 1. Характеристика больных ММ
Table 1. Multiple myeloma (MM) patient characteristics

Показатель/Characteristic	Значение/Value
Возраст, годы; медиана (мин-макс)/Age, years; median (min-max)	53 (37–64)
Женщины/мужчины/Females/Males	20/20
Стадия по Durie-Salmon/Durie-Salmon stage	
II	15
III	22
Нет данных/Not available	3
Вариант/Type	
IgG	24
IgA	6
Бенс-Джонса/Bence Jones	4
Нет данных/Not available	6
Статус заболевания/Disease status	
полная ремиссия/complete remission	13
частичный ответ, очень хороший частичный ответ/partial remission, very good partial response	27
Количество режимов противоопухолевой терапии перед ВХТ с ауто-ТГСК ¹ /Anti-tumor therapy regimens before HDC with auto-HSCT ¹	
1 режим/1 regimen	9
– PAD	3
– VCD	6
2 режима/2 regimens	20
– VCD + PAD	18
– PAD/VCD + RD	2
≥ 3 режимов/≥ 3 regimens	11
– VCD + PAD + (V)RD/RCD/Lenal	8
– PAD ± VCD + DCEP + RD	2
– PAD + VCD + DCEP + BBD	1
Время от начала первого курса химиотерапии, мес.; Me (МКИ)/Time from the 1st chemotherapy to the analysis, months; median (Me) (IQR)	13,7 (11,1–16,5)
Время от окончания последнего курса химиотерапии, мес.; Me (МКИ)/Time from the last chemotherapy, months; Me (IQR)	2,8 (0,8–5,9)

Примечание.¹ — без учета курсов поддерживающей терапии бортезомибом и инфузии циклофосфида перед мобилизацией ГСК, МКИ — межквартильный интервал, BBD — бендамустин, бортезомиб и дексаметазон; DCEP — дексаметазон, циклофосфамид, этопозид, цисплатин; PAD — бортезомиб, доксорубин и дексаметазон; RD — леналидомид и дексаметазон; VCD — бортезомиб, циклофосфамид и дексаметазон; VRD — бортезомиб, леналидомид и дексаметазон.

Note.¹ — calculated without taking into account the maintenance treatment with bortezomib and cyclophosphamide infusions before the mobilization of hematopoietic stem cells, IQR — interquartile range, BBD — bendamustine, bortezomib and dexamethasone; DCEP — dexamethasone, cyclophosphamide, etoposide, cisplatin; PAD — bortezomib, doxorubicin and dexamethasone; RD — lenalidomide and dexamethasone; VCD — bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone; VRD — bortezomib, lenalidomide and dexamethasone

Лизис эритроцитов проводили раствором VersaLyse («Beckman Coulter», Франция) в соответствии с инструкцией. Методом проточной цитометрии оценивали относительное содержание CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺TIM-3⁺, CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺, CD4⁺PD-1⁺, CD4⁺TIM-3⁺, CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁺ Т-клеток ПК и КМ, используя анти-CD8 (FITC), анти-CD4 (FITC, PerCP), анти-PD-1 (APC), анти-TIM-3 (PE, PerCP/Cy 5.5) моноклональные антитела («BD Biosciences», США). У 15 больных в отдельных пробах оценили внутриклеточную экспрессию маркера пролиферации Ki-67 (BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-Ki-67 Set, «BD Biosciences») среди PD-1-и TIM-3-позитивных и негативных Т-клеток. С целью более щадящей обработки [19] использовали набор растворов для фиксаци

саци/пермеабиллизации Transcription Factor Buffer Set («BD Biosciences») в соответствии с инструкцией. У 13 больных в субпопуляции CD8⁺ Т-лимфоцитов исследовали внутриклеточную продукцию гранзима В среди PD-1 и TIM-3 позитивных и негативных клеток, используя анти-гранзим В моноклональные антитела (PE, «BD Biosciences»). Для исследования внутриклеточной продукции ИФН-γ выделяли мононуклеарные клетки (МНК) ПК стандартным методом центрифугирования цельной гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола-верографина (ρ = 1,078). У 11 больных в CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитах оценили внутриклеточную продукцию ИФН-γ среди PD-1 и TIM-3 позитивных и негативных клеток, используя анти-ИФН-γ моно-

клональные антитела (PE, «BD Biosciences»), после 5-часовой активации 10^6 МНК в культуральной среде RPMI-1640 («БиоЛот», Санкт-Петербург) с форболмирикатом ацетатом («Sigma», Германия; конечная концентрация 10 нг/мл суспензии клеток), иономицином («Sigma»; конечная концентрация 10 мкг/мл суспензии клеток) при температуре 37 °C в CO₂-инкубаторе (5 % CO₂); после первого часа активации в суспензию клеток одновременно добавляли ингибиторы транспорта белков BD GolgiStop™, содержащий моноэзин, и BD GolgiPlug™, содержащий брэфелдин А (оба — «BD Biosciences»), в соответствии с инструкцией. Исследование каждого внутриклеточного маркера проводили в отдельных пробах, по отдельности для субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Фиксацию и пермеабиллизацию МНК для оценки внутриклеточной экспрессии Ki-67 и продукции гранзима В и ИФН-γ проводили после инкубации клеток с моноклональными антителами против поверхностных антигенов; использовали набор растворов для фиксации/пермеабиллизации Transcription Factor Buffer Set («BD Biosciences»).

Исследование проводили по общепринятой методике с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния и флуоресценции по каналам FL-1 (FITC), FL-2 (PE), FL-3 (PerCP, PerCP/Cy 5.5, PE-Cy 5), FL-4 (APC) («BD FACSCalibur», «CellQuest Software», США). Анализ проводили после накопления не менее 30 000 событий в регионе CD8⁺ Т-клеток.

Абсолютное содержание исследуемых субпопуляций клеток рассчитывали как:

$$\text{субпопуляция Т-клеток, \% от лимфоцитов} \times \text{абсолютное содержание лимфоцитов,} \times 10^9 / \text{л} / 100$$

Абсолютное количество лимфоцитов рассчитывали из результатов общего анализа крови с лейкоцитарной формулой. Общий анализ крови оценивали на автоматическом гематологическом анализаторе Hema-Screen 18 («Hospitex Diagnostics», Италия).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США) и GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., США). Для оценки значимости различий между двумя независимыми группами использовали *U*-критерий Манна — Уитни. Для оценки значимости различий зависимых выборок использовали критерий Вилкоксона для парных выборок. Данные представлены в виде медианы (*Me*) и интерквартильного интервала (МКИ), если не указано другого. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$ (двустороннем).

Результаты

Проведена сравнительная оценка содержания CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, экспрессировавших PD-1 и TIM-3, в циркуляции и КМ до ауто-ТГСК, на момент выхо-

да из лейкопении (только ПК) и через 6 мес. после ауто-ТГСК. Относительное количество большинства субпопуляций циркулировавших Т-клеток, экспрессировавших PD-1 и TIM-3, было значимо меньше соответствующих значений в КМ как до ВХТ, так и через 6 мес. после ауто-ТГСК. Не выявлено различий между содержанием в ПК и КМ только для TIM-3⁺ субпопуляции CD8⁺ Т-клеток (на обеих точках) и для PD-1⁺ CD4⁺ Т-клеток через 6 мес. после ауто-ТГСК (табл. 2). Выявлено транзитное увеличение содержания PD-1 и TIM-3-позитивных субпопуляций в циркулирующих Т-клетках в раннем посттрансплантационном периоде. Процентное содержание большинства исследуемых субпопуляций Т-клеток (кроме PD-1⁺ CD8⁺ Т-клеток) на день выхода из лейкопении (в среднем, 14-е сутки после ауто-ТГСК) было значимо больше как исходных показателей, так и их значений через 6 мес. наблюдения. Содержание TIM-3⁺ CD4⁺ Т-клеток и PD-1⁺ и TIM-3⁺ субпопуляций CD8⁺ Т-клеток через 6 мес. после ауто-ТГСК не отличалось от соответствующих показателей перед ВХТ, а содержание PD-1⁺ и PD-1⁺ TIM-3⁺ субпопуляций CD4⁺ Т-клеток оставалось более высоким (табл. 2).

С учетом меньшего абсолютного количества лимфоцитов у больных на день выхода из лейкопении и последующего их восстановления, абсолютные значения CD4⁺PD-1⁺, CD4⁺TIM-3⁺, CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁺ и CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ Т-клеток ПК в течение периода наблюдения после ауто-ТГСК значимо не отличались от предтрансплантационных значений. Абсолютные показатели CD8⁺PD-1⁺ и CD8⁺TIM-3⁺ Т-клеток были значимо снижены на день выхода из лейкопении по сравнению со значениями до ауто-ТГСК, однако через 6 мес. наблюдения достигали исходных значений (табл. 3).

Учитывая высокое относительное содержание циркулирующих Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и TIM-3 в раннем посттрансплантационном периоде, проведена оценка внутриклеточной экспрессии маркера пролиферации Ki-67. Перед ауто-ТГСК относительное количество пролиферирующих Ki-67⁺ клеток было значимо больше среди PD-1-позитивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток по сравнению с PD-1-негативными клетками (рис. 1, А, Г). TIM-3⁺ Т-клетки не отличались по содержанию Ki-67 от TIM-3⁻ клеток (рис. 1, Б, Д). В раннем посттрансплантационном периоде — на день выхода из лейкопении после ауто-ТГСК — отмечено выраженное увеличение пролиферативной активности всех исследуемых субпопуляций клеток по сравнению с предтрансплантационными показателями (рис. 1, А–Е), причем доля Ki-67-позитивных клеток среди PD-1⁺ Т-лимфоцитов оставалась значимо больше по сравнению с PD-1⁻ лимфоцитами (рис. 1, А, Г). Через 6 мес. после ауто-ТГСК относительное количество Ki-67-позитивных клеток среди всех исследуемых субпопуляций не отличалось

Таблица 2. Содержание субпопуляций PD-1-и TIM-3-позитивных Т-клеток ПК и КМ у больных ММ до и после ВХТ с ауто-ТГСК
Table 2. Counts of PD-1-and TIM-3 positive T-cell subsets in peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) of MM patients before and after HDC with auto-HSCT

Субпопуляции клеток Cell subsets	Перед ВХТ Before HDC		День выхода из лейкопении Engraftment day	+6 мес. после ауто-ТГСК +6 months after auto-HSCT	
	ПК/РВ (n = 25)	КМ/ВМ (n = 18)	ПК/РВ (n = 28)	ПК/РВ (n = 20)	КМ/ВМ (n = 20)
CD4 ⁺ Т-клетки, % ¹ /CD4 ⁺ T-cells, % ¹	40,9 (34,8–52,4)	21,6 (17,6–33,4) [§]	31,2 (26,2–41,7)*	25,2 (21,0–31,5)**	15,8 (8,5–22,2)* [§]
PD-1 ⁺ , % от CD4 ⁺ Т-клеток PD-1 ⁺ , % of CD4 ⁺ T-cells	17,6 (10,8–25,4)	30,8 (17,4–40,9) [§]	36,3 (27,8–45,5)*	25,5 (18,6–28,9)**	27,4 (17,5–34,2)
TIM-3 ⁺ , % от CD4 ⁺ Т-клеток TIM-3 ⁺ % of CD4 ⁺ T-cells	2,8 (1,8–5,7)	10,6 (6,1–14,8) [§]	9,5 (5,9–15,2)*	4,2 (2,8–10,4) [#]	14,5 (5,3–24,9) [§]
PD-1 ⁺ TIM-3 ⁺ , % от CD4 ⁺ Т-клеток PD-1 ⁺ TIM-3 ⁺ , % of CD4 ⁺ T-cells	0,5 (0,3–0,9)	3,3 (2,1–5,8) [§]	2,8 (1,3–4,6)*	0,7 (0,5–1,1)**	2,6 (1,3–4,7) [§]
CD8 ⁺ Т-клетки, % ¹ CD8 ⁺ T-cells, % ¹	20,5 (11,8–30,3)	17,8 (10,8–28,9)	16,6 (11,0–22,9)	35,5 (21,9–39,7)**	21,4 (17,0–30,4)
PD-1 ⁺ , % от CD8 ⁺ Т-клеток PD-1 ⁺ , % of CD8 ⁺ T-cells	21,6 (10,6–25,8)	35,5 (24,0–39,2) [§]	18,7 (14,0–28,2)	15,1 (11,9–20,4)	24,7 (17,7–35,1)* [§]
TIM-3 ⁺ , % от CD8 ⁺ Т-клеток TIM-3 ⁺ , % of CD8 ⁺ T-cells	25,0 (15,8–41,0)	25,4 (16,6–35,5)	37,1 (22,1–57,7)*	18,4 (10,6–32,2) [#]	19,1 (10,7–26,6)
PD-1 ⁺ TIM-3 ⁺ , % от CD8 ⁺ Т-клеток PD-1 ⁺ TIM-3 ⁺ , % of CD8 ⁺ T-cells	1,0 (0,8–1,8)	4,9 (2,1–6,4) [§]	5,4 (2,5–7,3)*	1,0 (0,6–1,9) [#]	2,3 (1,8–7,7) [§]

Примечания. ¹ — относительное содержание CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток представлено в виде процента от лимфоцитов; * — значимые различия по U-критерию Манна — Уитни между данными «перед кондиционированием — после ауто-ТГСК»; # — между данными «в день выхода из лейкопении — +6 мес. после ауто-ТГСК»; § — значимые различия по критерию Вилкоксона между парными данными ПК и КМ.

Note. ¹ — relative counts of CD4⁺ и CD8⁺ T cells are presented as the percentages of lymphocytes; p values are assessed with Mann — Whitney U-test between independent groups; significant differences between data “before conditioning — after auto-HSCT” and “at the engraftment day — +6 months following auto-HSCT” are marked with * and #, respectively. P values are assessed with sign test between paired PB and BM samples; significant differences are marked with §.

Таблица 3. Абсолютное содержание субпопуляций PD-1-и TIM-3-позитивных Т-клеток ПК у больных ММ до и после ВХТ с ауто-ТГСК
Table 3. Absolute counts of PD-1-and TIM-3 positive T cell subsets in PB of MM patients before and after HDC with auto-HSCT

Субпопуляция клеток Cell subsets	Перед ВХТ Before HDC (n = 25)	День выхода из лейкопении Engraftment day (n = 28)	+6 мес. после ауто-ТГСК +6 months after auto-HSCT (n = 20)
Лимфоциты, ×10 ⁹ /л/Lymphocytes, ×10 ⁹ /L	1,23 (1,08–1,57)	0,61 (0,39–0,99)*	1,17 (0,99–1,64) [#]
CD4 ⁺ PD-1 ⁺ , ×10 ⁹ /л/×10 ⁹ /L	0,077 (0,060–0,122)	0,050 (0,038–0,107)	0,073 (0,046–0,108)
CD4 ⁺ TIM-3 ⁺ , ×10 ⁹ /л/×10 ⁹ /L	0,016 (0,011–0,031)	0,016 (0,010–0,025)	0,015 (0,009–0,031)
CD4 ⁺ PD-1 ⁺ TIM-3 ⁺ , ×10 ⁹ /л/×10 ⁹ /L	0,003 (0,002–0,006)	0,004 (0,002–0,007)	0,003 (0,001–0,004)
CD8 ⁺ PD-1 ⁺ , ×10 ⁹ /л/×10 ⁹ /L	0,041 (0,028–0,064)	0,019 (0,008–0,035)*	0,051 (0,032–0,109) [#]
CD8 ⁺ TIM-3 ⁺ , ×10 ⁹ /л/×10 ⁹ /L	0,059 (0,035–0,109)	0,033 (0,017–0,065)*	0,068 (0,044–0,078) [#]
CD8 ⁺ PD-1 ⁺ TIM-3 ⁺ , ×10 ⁹ /л/×10 ⁹ /L	0,003 (0,002–0,005)	0,005 (0,002–0,008)	0,003 (0,002–0,005)

Примечания. * — значимые различия по U-критерию Манна — Уитни между данными «перед кондиционированием — после ауто-ТГСК»; # — между данными «в день выхода из лейкопении — +6 мес. после ауто-ТГСК».

Note. P values are assessed with Mann — Whitney U-test between independent groups; significant differences between data “before conditioning — after auto-HSCT” and “at the engraftment day — +6 months following auto-HSCT” are marked with * and #, respectively.

от значений перед кондиционированием (рис. 1, А–Е), при этом доля активно пролиферирующих CD4⁺PD-1⁺, CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺TIM-3⁺, CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ Т-клеток была значимо меньше соответствующих показателей на день выхода из лейкопении (рис. 1, А, Г–Е). На рисунке 1 представлено относительное количество Ki-67⁺ клеток среди PD-1-позитивных и негативных CD4⁺ (А) и CD8⁺ (Г) Т-клеток, среди TIM-3-позитивных и нега-

тивных CD4⁺ (Б) и CD8⁺ (Д) Т-клеток, а также в субпопуляциях CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁺ (В) и CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ (Е) Т-клеток в ПК больных ММ перед кондиционированием (n = 9) и после ауто-ТГСК: на день выхода из лейкопении (n = 10) и через 6 мес. (n = 5). Т-клеткам, находящимся в состоянии истощения, не свойственна высокая пролиферативная активность. Для изучения других функциональных свойств

Т-клеток, экспрессирующих ингибиторные ИСМ PD-1 и TIM-3 в раннем посттрансплантационном периоде, проведена оценка их цитотоксического и цитокин-продуцирующего потенциала перед кондиционированием и на день выхода из лейкопении после ауто-ТГСК. Перед ВХТ CD8⁺PD-1⁺ Т-клетки не отличались по содержанию гранзима В от PD-1⁻ субпопуляции (рис. 2, А); относительное количество гранзим В-продуцирующих клеток было значимо меньше среди CD8⁺TIM-3⁺ Т-клеток по сравнению с CD8⁺TIM-3⁻ субпопуляцией (рис. 2, Б). На день выхода из лейкопении после ауто-ТГСК продукция гранзима В CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺TIM-3⁺ и CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ Т-клетками была значимо больше по сравнению с показателями перед ауто-ТГСК (рис. 2, А–В); не выявлено различий в содержании гранзима В между PD-1-и TIM-3-позитивными и негативными популяциями CD8⁺ Т-клеток (рис. 2, А, Б). На рисунке 2 представлено относительное количество гранзим В⁺ клеток среди PD-1-позитивных и негативных (А) и среди TIM-3-позитивных и негативных (Б) CD8⁺ Т-клеток, а также в субпопуляции CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ (В) Т-клеток в ПК больных ММ перед кондиционированием ($n = 10$) и на день выхода из лейкопении ($n = 8$) после ауто-ТГСК.

Перед ауто-ТГСК относительное количество ИФН- γ -продуцирующих клеток было значимо больше среди CD4⁺PD-1⁺ Т-клеток по сравнению с CD4⁺PD-1⁻ клетками (рис. 3, А); CD8⁺PD-1⁺ Т-клетки не отличались по содержанию ИФН- γ от PD-1⁻ клеток (рис. 3, Г). Продукция ИФН- γ была значимо меньше в CD8⁺TIM-3⁺ и CD4⁺TIM-3⁺ клетках по сравнению с Т-клетками, не экспрессирующими TIM-3 (рис. 3, Б, Д). На день выхода из лейкопении после ауто-ТГСК не выявлено значимых изменений продукции ИФН- γ среди всех исследуемых субпопуляций клеток по сравнению с предтрансплантационными показателями (рис. 3, А–Е); при этом доля ИФН- γ -позитивных клеток среди CD8⁺TIM-3⁺ Т-лимфоцитов оставалась значимо большей по сравнению с TIM-3-негативными Т-лимфоцитами (рис. 3, Д). На рисунке 3 представлено относительное количество ИФН- γ ⁺ клеток среди PD-1-позитивных и негативных CD4⁺ (А) и CD8⁺ (Г) Т-клеток, среди TIM-3-позитивных и негативных CD4⁺ (Б) и CD8⁺ (Д) Т-клеток, а также в субпопуляциях CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁺ (В) и CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ (Е) Т-клеток в ПК больных ММ перед кондиционированием ($n = 9$) и на день выхода из лейкопении ($n = 6$) после ауто-ТГСК.

Обсуждение

Теоретическим обоснованием использования моноклональных антител против ИСМ или их лигандов является увеличение экспрессии этих молекул на эффекторных Т-клетках при онкологических заболеваниях. Передача сигнала через ИСМ — PD-1,

TIM-3, LAG-3 и др. — в норме играет регулируемую роль, ограничивая интенсивность иммунного ответа. Также экспрессия ИСМ ассоциирована с Т-клеточным истощением, состоянием дисфункции Т-клеток памяти, возникающим в условиях постоянной антигенной стимуляции. Повышенная экспрессия соответствующих лигандов ИСМ, например, PD-L1 и PD-L2 для PD-1, малигнизированными клетками и/или их микроокружением является одним из путей «ухода» опухоли из-под иммунного надзора [3]. Моноклональные антитела (анти-PD-1, анти-PD-L1, анти-CTLA-4) конкурентно блокируют взаимодействия между лигандом и рецептором, предотвращая ослабление противоопухолевого иммунного ответа. Попытки использования терапевтических моноклональных анти-PD-1 антител при различных вариантах течения и этапах терапии ММ не привели к значимым клиническим результатам, хотя отмечено большое количество иммуноопосредованных нежелательных реакций. Однако исследования в этом направлении продолжают [20]. Настоящая работа посвящена количественной характеристике и изучению функциональных свойств циркулирующих Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и TIM-3, у больных ММ после ВХТ с ауто-ТГСК.

Относительное количество большинства субпопуляций Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и TIM-3 ИСМ, было больше в образцах КМ по сравнению с ПК (не выявлено различий для CD8⁺TIM-3⁺ Т-клеток) как перед ВХТ, так и через 6 мес. после ауто-ТГСК. С учетом преимущественного поражения опухолевым процессом КМ, описанное распределение дисфункциональных Т-клеток представляется закономерным, однако ранее опубликованные данные противоречивы. С. Zelle-Rieser и соавт. [6] на небольшой выборке ($n = 7–12$) не обнаружили различий между содержанием PD-1⁺ клеток в КМ и ПК. J. Tan и соавт. [21] показали большее содержание CD8⁺PD-1⁺ субпопуляции в КМ по сравнению с ПК, в то время как содержание CD4⁺PD-1⁺ Т-клеток и TIM-3⁺ Т-клеток (включая PD-1⁺TIM-3⁺ субпопуляции) в КМ значимо не отличалось от таковых в ПК 10 больных ММ при проведении лечения.

В настоящей работе показано выраженное увеличение содержания большинства PD-1-и TIM-3-экспрессирующих субпопуляций Т-клеток (не выявлено различий для CD8⁺PD-1⁺ Т-клеток) в раннем посттрансплантационном периоде — на день выхода из лейкопении после ауто-ТГСК, — которое не зависело от относительного содержания CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Через 6 мес. доля PD-1-и TIM-3-положительных Т-клеток была значимо меньше, чем при восстановлении, либо достигала предтрансплантационных значений, либо несколько превышала их. В работах N. Marshall и соавт. [14] и F. Simonetta и соавт. [16], исследовавших уровень экспрессии PD-1 после ауто-

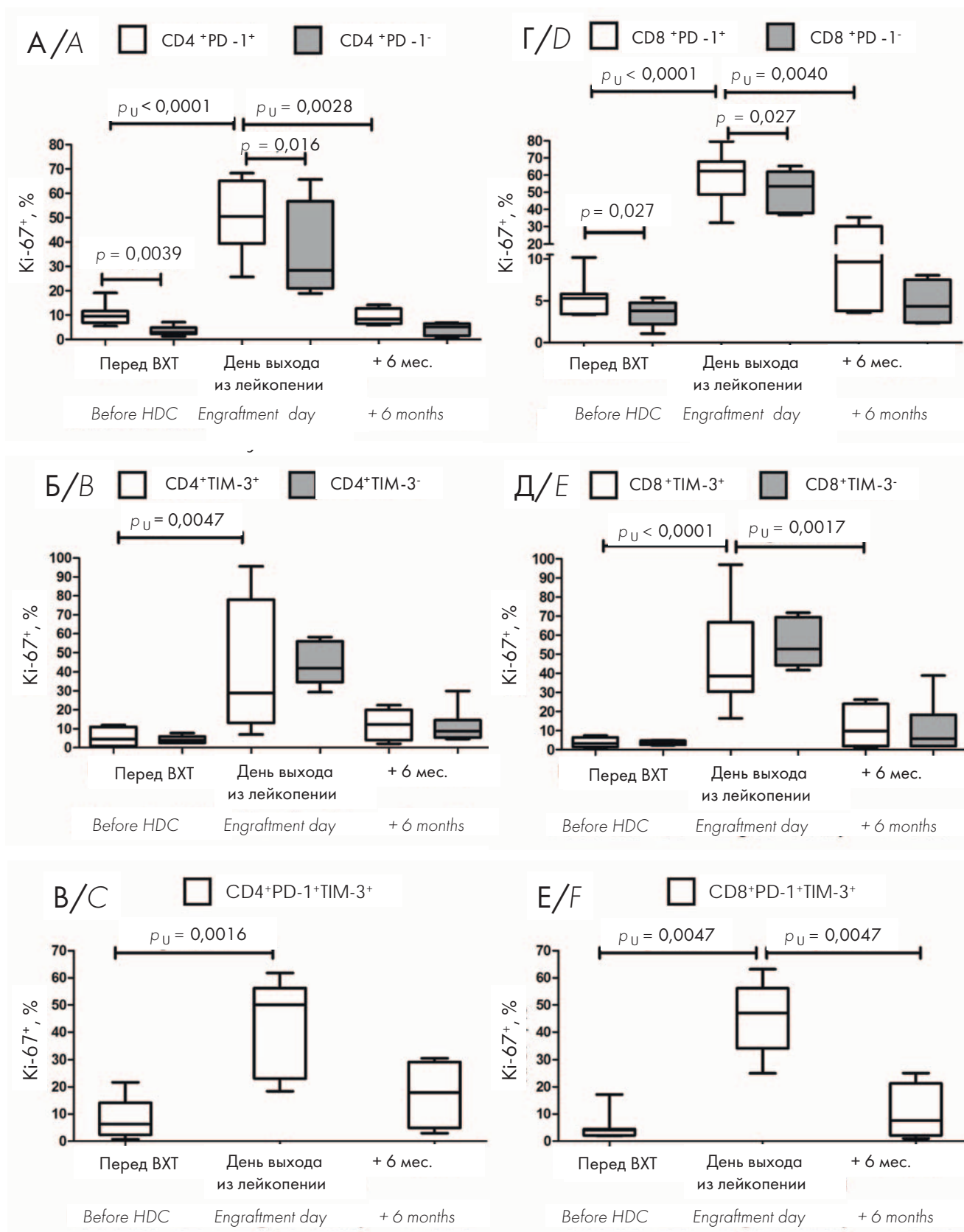


Рисунок 1. Доля Ki-67⁺ клеток в PD-1-и TIM-3-позитивных и негативных субпопуляциях Т-клеток ПК больных ММ до ВХТ и после ауто-ТГСК. Данные представлены в виде Ме, МКИ и диапазона минимальных и максимальных значений. Значимость различий между группами на различных точках оценена по U-критерию Манна – Уитни (p_U), между парными значениями на одной точке — по критерию Вилкоксона для парных выборок (p)

Figure 1. Frequency of Ki-67⁺ cells in PD-1 and TIM-3-positive and negative T-cell subsets in PB of MM patients before HDC and following auto-HSCT. Data are expressed as Me, IQR and range of minimum and maximum values. P values are assessed with Mann – Whitney U-test (p_U) between independent groups and Wilcoxon matched pairs test (p) between paired groups

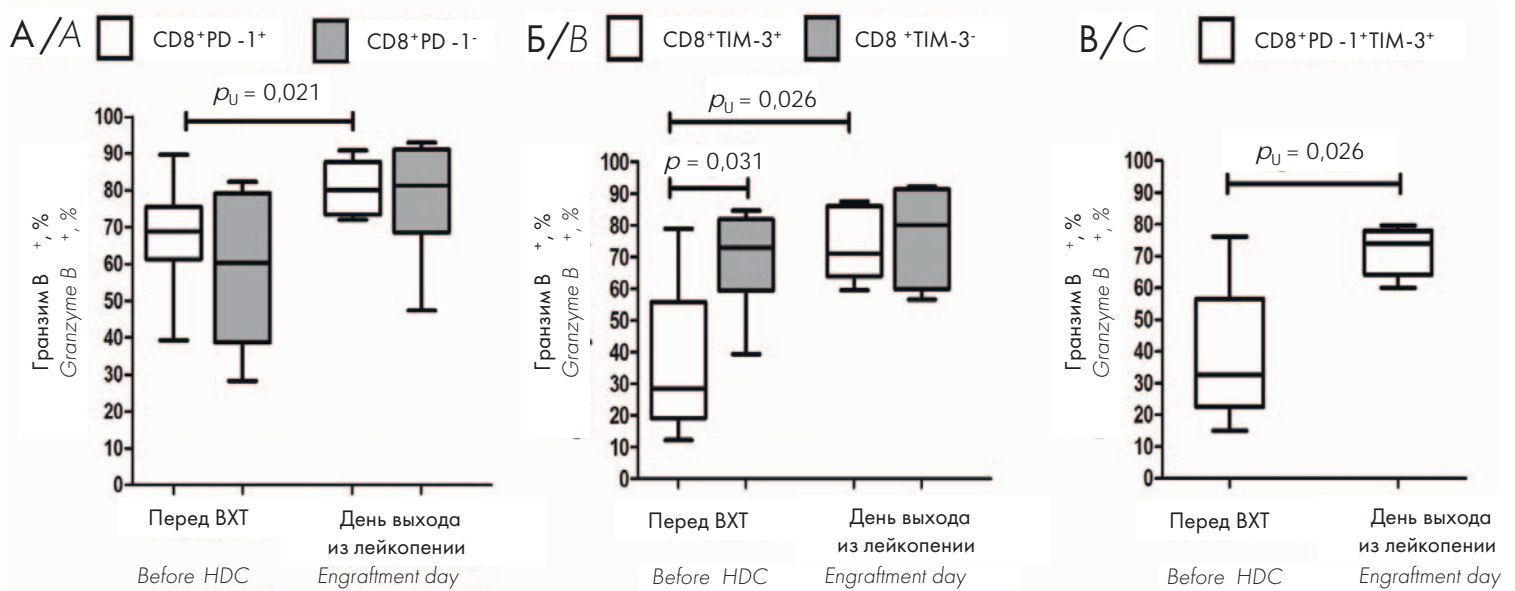


Рисунок 2. Доля гранзим В⁺ клеток в PD-1-и TIM-3-позитивных и негативных субпопуляциях CD8⁺ Т-клеток ПК больных ММ до ВХТ и после ауто-ТГСК. Данные представлены в виде Ме, МКИ и диапазона минимальных и максимальных значений. Значимость различий между группами на различных точках оценена по U-критерию Манна – Уитни (p_U), между парными значениями на одной точке – по критерию Вилкоксона для парных выборок (p)

Figure 2. Frequency of Granzyme B⁺ cells in PD-1-and TIM-3-positive and negative CD8⁺ T-cell subsets in PB of MM patients before HDC and following auto-HSCT. Data are expressed as Me, IQR and range of minimum and maximum values. P values are assessed with Mann – Whitney U-test (p_U) between independent groups and Wilcoxon matched pairs test (p) between paired groups

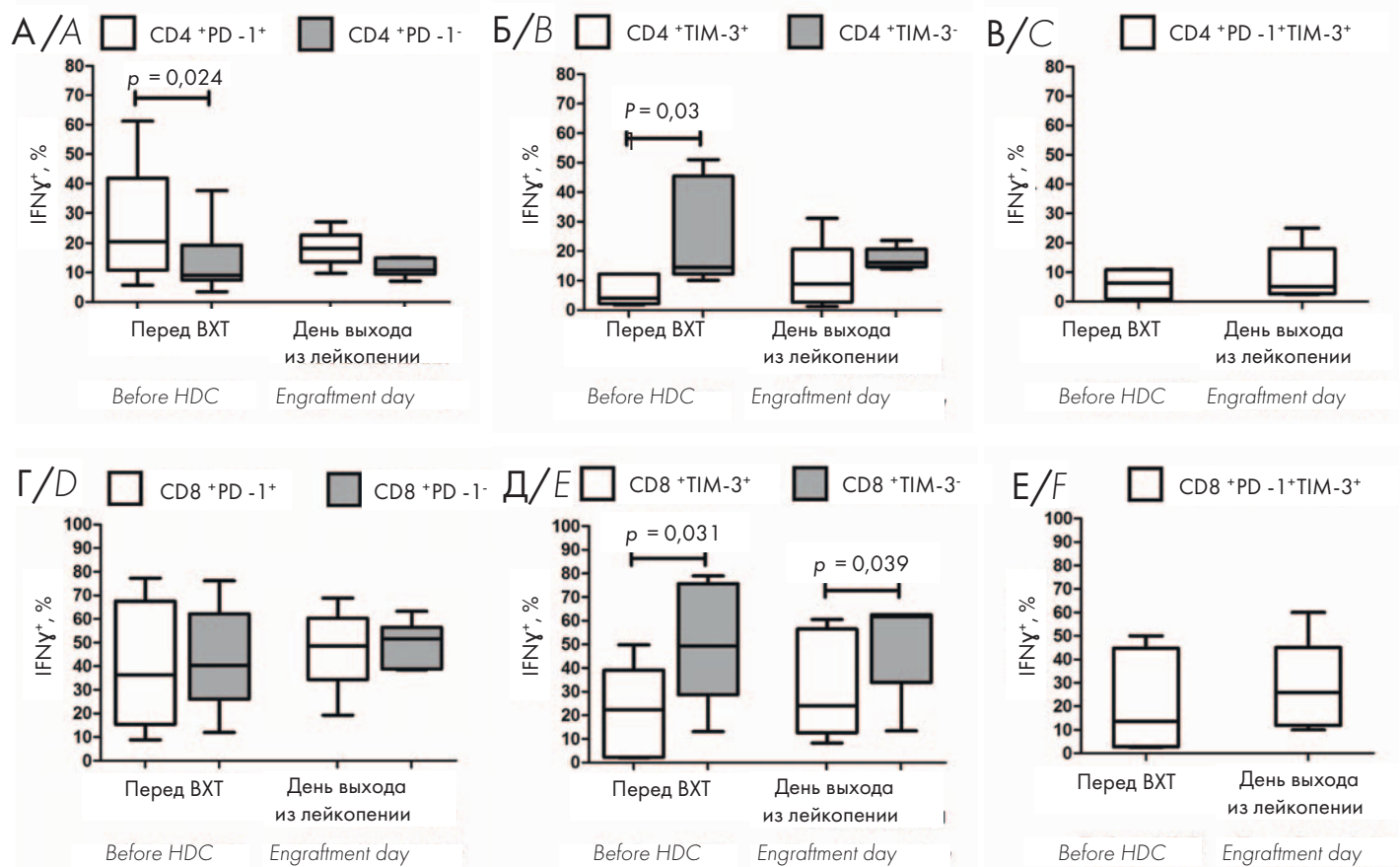


Рисунок 3. Доля ИФН-γ⁺ клеток в PD-1-и TIM-3-позитивных и негативных субпопуляциях Т-клеток ПК больных ММ до ВХТ и после ауто-ТГСК. Данные представлены в виде Ме, МКИ и диапазона минимальных и максимальных значений. Значимость различий между группами на различных точках оценена по U-критерию Манна – Уитни (p_U), между парными значениями на одной точке – по критерию Вилкоксона для парных выборок (p)

Figure 3. Frequency of IFN-γ⁺ cells in PD-1-and TIM-3-positive and negative T-cell subsets in PB of MM before HDC and following auto-HSCT. Data are expressed as Me, IQR and range of minimum and maximum values. P values are assessed with Mann – Whitney U-test (p_U) between independent groups and Wilcoxon matched pairs test (p) between paired groups

ТГСК и трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, соответственно, также было показано неожиданное увеличение экспрессии PD-1 и относительного содержания PD-1⁺ Т-клеток после выхода из лейкопении. Ранее D. J. Chung и соавт. [18] описали сохранение экспрессии ИСМ, в том числе PD-1 и TIM-3, Т-клетками ПК больных ММ через 3 мес. после ауто-ТГСК на предтрансплантационном уровне, что также согласуется с нашими данными о восстановлении на 6 мес. после ауто-ТГСК.

Учитывая высокое относительное содержание циркулирующих Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и TIM-3 в раннем посттрансплантационном периоде, была проведена оценка внутриклеточной экспрессии маркера пролиферации Ki-67 в исследуемых субпопуляциях до и после ауто-ТГСК. Выявлено значительное увеличение доли активно пролиферирующих PD-1- и TIM-3-положительных Т-клеток на день выхода из лейкопении по сравнению с показателями до ВХТ, при этом процент Ki-67-позитивных клеток среди PD-1⁺ Т-лимфоцитов был значимо больше по сравнению с PD-1⁻ Т-лимфоцитами как перед кондиционированием, так и на день выхода из лейкопении. Через 6 мес. после ауто-ТГСК интенсивность пролиферации уменьшалась до исходных значений.

Т-клетки в состоянии истощения помимо сниженного пролиферативного потенциала характеризуются уменьшением цитотоксической и цитокин-продуцирующей активности. Для оценки этих свойств PD-1- и TIM-3-экспрессирующих Т-клеток исследована продукция гранзима В и ИФН- γ до и после ауто-ТГСК. Показано, что значительная часть CD8⁺PD-1⁺ и CD4⁺PD-1⁺ Т-клеток больных ММ перед кондиционированием обладала выраженным цитотоксическим и цитокин-продуцирующим потенциалом, не отличаясь от PD-1-негативного компартмента, либо превосходя его. В данном случае экспрессию PD-1, вероятно, нужно рассматривать в качестве маркера активированных, либо «ранних дисфункциональных», но не терминально истощенных Т-клеток. F. M. Schnorfeil и соавт. [5] ранее описали сохранную функциональную активность PD-1⁺ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток при остром миелоидном лейкозе, сделав заключение об отсутствии значимой клинической роли Т-клеточного истощения в развитии болезни. Сохранение либо даже усиление цитотоксических, ИФН- γ -продуцирующих и пролиферативных свойств PD-1-экспрессирующими Т-клетками на ранних этапах Т-клеточной дисфункции/истощения было недавно описано при меланоме [22, 23], немелкоклеточном раке легкого [24] и гепатоцеллюлярной карциноме [25].

Функциональная активность CD8⁺TIM-3⁺ и CD4⁺TIM-3⁺ Т-клеток, напротив, была значимо снижена по сравнению с TIM-3-негативными Т-клетками. Можно предположить, что, несмотря

на описанную в экспериментах *in vitro* возможность экспрессии на активированных Т-клетках [4, 26], молекула TIM-3 более ассоциирована с состоянием Т-клеточного истощения, чем PD-1. Ранее Z. Li и соавт. [27] описали более выраженные нарушения продукции CD8⁺TIM-3⁺PD-1⁻ Т-клетками цитокинов, гранзима В и перфорина по сравнению с CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁻ клетками у больных злокачественной шванномой. Подобных данных для гематологических заболеваний ранее опубликовано не было, и регулирующая роль этого рецептора при ММ требует дальнейшего изучения.

Низкие уровни Ki-67-экспрессирующих гранзим В- и ИФН- γ -продуцирующих клеток в субпопуляциях TIM-3⁺PD-1⁺ Т-клеток согласуются с данными литературы о совместной экспрессии двух и более ИСМ как маркера Т-клеточного истощения [3, 22–25, 28].

Относительное количество гранзим В-продуцирующих клеток среди CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺TIM-3⁺ и CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ Т-клеток было значимо увеличено после ауто-ТГСК на день выхода из лейкопении по сравнению с показателями до ВХТ, при этом цитотоксический потенциал CD8⁺TIM-3⁺ клеток достигал значений TIM-3-негативного пула. Доля ИФН- γ -продуцирующих клеток среди всех исследованных PD-1⁺ и TIM-3⁺ субпопуляций Т-клеток после ауто-ТГСК соответствовала уровню до ВХТ.

Интерес представляет описанное в настоящей работе значительное увеличение активно делящихся PD-1- и TIM-3-экспрессирующих Т-клеток в условиях лимфопении после ВХТ с ауто-ТГСК, которое могло быть инициировано гомеостатической пролиферацией зрелых лимфоцитов. В настоящее время отсутствуют данные о влиянии гомеостатических цитокинов интерлейкинов-2, -7 и -15 на экспрессию ИСМ и/или экспансию и свойства дисфункциональных/истощенных Т-клеток. Состояние Т-клеточного истощения возникает вследствие длительной антигенной стимуляции через Т-клеточный рецептор (ТКР), в то время как гомеостатическая пролиферация — цитокин-опосредованный ТКР-независимый процесс [29]. Учитывая растущий интерес к таргетной терапии, направленной на блокаду ингибиторных чек-пойнт рецепторов и их лигандов, при ММ, необходимы дальнейшие исследования экспансии Т-клеток в условиях лимфопении, как фактора, способного изменять количественные и функциональные характеристики клеток-мишеней.

Исходя из полученных данных, можно заключить, что выявленное более высокое содержание циркулирующих PD-1-позитивных Т-клеток у больных ММ ассоциировано с субпопуляциями, не находящимися в состоянии терминального Т-клеточного истощения и сохранившими свои функциональные свойства. Относительное количество функционально актив-

ных клеток было более низким среди CD8⁺TIM-3⁺ и CD4⁺TIM-3⁺ Т-клеток, а также в субпопуляциях, ко-экспрессирующих PD-1 и TIM-3. Для идентификации состояния Т-клеточного истощения необходима оценка субпопуляций Т-клеток, ко-экспрессирующих PD-1, TIM-3 и другие ИСМ, и/или исследование их функциональных свойств. Относительное количест-

во Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и TIM-3, значительно увеличивается после ВХТ с ауто-ТГСК. В раннем посттрансплантационном периоде также значительно увеличиваются пролиферативная активность PD-1⁺ и TIM-3⁺ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и цитотоксический потенциал PD-1⁺ и TIM-3⁺ CD8⁺ Т-клеток по сравнению с показателями до ауто-ТГСК.

Литература/References

1. Kazandjian D. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin Oncol.* 2016; 43(6): 676–81. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2016.11.004.
2. Kumar S.K., Rajkumar S.V., Dispenzieri A., et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood.* 2008; 111(5): 2516–20. DOI: 10.1182/blood-2007-10-116129.
3. Wherry E.J., Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15(8): 486–99. DOI: 10.1038/nri3862.
4. Sabins N.C., Harman B.C., Barone L.R., et al. Differential expression of immune checkpoint modulators on in vitro primed CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Front Immunol.* 2016; 7: 221. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00221.
5. Schnorfeil F.M., Lichtenegger F.S., Emmerig K., et al. T cells are functionally not impaired in AML: Increased PD-1 expression is only seen at time of relapse and correlates with a shift towards the memory T cell compartment. *J Hematol Oncol.* 2015; 8: 93. DOI: 10.1186/s13045-015-0189-2.
6. Zelle-Rieser C., Thangavadivel S., Biedermann R., et al. T cells in multiple myeloma display features of exhaustion and senescence at the tumor site. *J Hematol Oncol.* 2016; 9(1): 116. DOI: 10.1186/s13045-016-0345-3.
7. Pianko M.J., Liu Y., Bagchi S., Lesokhin A.M. Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies: A review. *Stem Cell Investig.* 2017; 4: 32. DOI: 10.21037/sci.2017.03.04.
8. Görgün G., Samur M.K., Cowens K.B., et al. Lenalidomide enhances immune checkpoint blockade-induced immune response in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(20): 4607–18. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0200.
9. Armand P., Engert A., Younes A., et al. Nivolumab for relapsed/refractory classic Hodgkin lymphoma after failure of autologous hematopoietic cell transplantation: Extended follow-up of the multicohort single-arm phase II CheckMate 205 trial. *J Clin Oncol.* 2018; 36(14): 1428–39. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.0793.
10. Chen R., Zinzani P.L., Fanale M.A., et al. Phase II study of the efficacy and safety of pembrolizumab for relapsed/refractory classic Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol.* 2017; 35(19): 2125–32. DOI: 10.1200/JCO.2016.72.1316.
11. Lesokhin A.M., Ansell S.M., Armand P., et al. Nivolumab in patients with relapsed or refractory hematologic malignancy: Preliminary results of a phase Ib study. *J Clin Oncol.* 2016; 34(23): 2698–704. DOI: 10.1200/JCO.2015.65.9789.
12. Paiva B., Azpilikueta A., Puig N., et al. PD-L1/PD-1 presence in the tumor microenvironment and activity of PD-1 blockade in multiple myeloma. *Leukemia.* 2015; 29(10): 2110–3. DOI: 10.1038/leu.2015.79.
13. Benson D.M. Jr. Checkpoint inhibition in myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016; 2016(1): 528–33. DOI: 10.1182/asheducation-2016.1.528.
14. Marshall N., Hutchinson K., Marron T.U., et al. Antitumor T-cell homeostatic activation is uncoupled from homeostatic inhibition by checkpoint blockade. *Cancer Discov.* 2019; 9(11): 1520–37. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-19-0391.
15. Minnie S.A., Kuns R.D., Gartlan K.H., et al. Myeloma escape after stem cell transplantation is a consequence of T-cell exhaustion and is prevented by TIGIT blockade. *Blood.* 2018; 132(16): 1675–88. DOI: 10.1182/blood-2018-01-825240.
16. Simonetta F., Pradier A., Bosshard C., et al. Dynamics of expression of programmed cell death protein-1 (PD-1) on T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol.* 2019; 10:1034. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01034.
17. Arruda L.C.M., Lima-Júnior J.R., Clave E., et al. Homeostatic proliferation leads to telomere attrition and increased PD-1 expression after autologous hematopoietic SCT for systemic sclerosis. *Bone Marrow Transplant.* 2018; 53(10): 1319–27. DOI: 10.1038/s41409-018-0162-0.
18. Chung D.J., Pronschinske K.B., Shyer J.A., et al. T-cell exhaustion in multiple myeloma relapse after autotransplant: optimal timing of immunotherapy. *Cancer Immunol Res.* 2016; 4(1): 61–71. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0055.
19. Sun Y., Yang K., Bridal T., Ehrhardt A.G. Robust Ki67 detection in human blood by flow cytometry for clinical studies. *Bioanalysis.* 2016; 8(23): 2399–413. DOI: 10.4155/bio-2016-0194.
20. Jelinek T., Paiva B., Hajek R. Update on PD-1/PD-L1 inhibitors in multiple myeloma. *Front Immunol.* 2018; 9: 2431. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02431.
21. Tan J., Chen S., Huang J., et al. Increased exhausted CD8⁺ T cells with programmed death-1, T-cell immunoglobulin and mucin-domain-containing-3 phenotype in patients with multiple myeloma. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2018; 14(5): e266–74. DOI: 10.1111/ajco.13033.
22. Li H., van der Leun A.M., Yofe I., et al. Dysfunctional CD8 T cells form a proliferative, dynamically regulated compartment within human melanoma. *Cell.* 2020; 181(3): 747. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.017.
23. Miller B.C., Sen D.R., Al Abosy R., et al. Subsets of exhausted CD8⁺ T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol.* 2019; 20(3): 326–36. DOI: 10.1038/s41590-019-0312-6.
24. Thommen D.S., Koelzer V.H., Herzig P., et al. A transcriptionally and functionally distinct PD-1⁺ CD8⁺ T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. *Nat Med.* 2018; 24: 994–1004. DOI: 10.1038/s41591-018-0057-z.
25. Ma J., Zheng B., Goswami S., et al. PD1^{hi} CD8⁺ T cells correlate with exhausted signature and poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma. *J Immunother Cancer.* 2019; 7(1): 331. DOI: 10.1186/s40425-019-0814-7.
26. Hastings W.D., Anderson D.E., Kassam N., et al. TIM-3 is expressed on activated human CD4⁺ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur J Immunol.* 2009; 39(9): 2492–501. DOI: 10.1002/eji.200939274.
27. Li Z., Liu X., Guo R., Wang P. TIM-3 plays a more important role than PD-1 in the functional impairments of cytotoxic T cells of malignant Schwannomas. *Tumour Biol.* 2017; 39(5): 1010428317698352. DOI: 10.1177/1010428317698352.
28. Sakuishi K., Apetoh L., Sullivan J.M., et al. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med.* 2010; 207(10): 2187–94. DOI: 10.1084/jem.20100643.
29. Goldrath A.W., Luckey C.J., Park R., et al. The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(48): 16885–90. DOI: 10.1073/pnas.0407417101.

Информация об авторах

Баторов Егор Васильевич*, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
e-mail: Ebatorov@mail.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2902-9336>

Сергеевичева Вера Васильевна, кандидат медицинских наук, заведующая гематологическим отделением с блоком трансплантации костного мозга, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
e-mail: verden@bk.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1951-2260>

Аристова Татьяна Андреевна, врач-гематолог гематологического отделения с блоком трансплантации костного мозга, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
e-mail: taris06@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4885-8327>

Сизикова Светлана Анатольевна, кандидат медицинских наук, гематолог гематологического отделения с блоком трансплантации костного мозга, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
e-mail: svetlana_sizikova@mail.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7109-3839>

Ушакова Галина Юрьевна, кандидат медицинских наук, гематолог гематологического отделения с блоком трансплантации костного мозга, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
e-mail: bmt-novosibirsk@mail.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1822-6326>

Гилевич Андрей Викторович, кандидат медицинских наук, заведующий отделением реанимации и интенсивной терапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
e-mail: agilevich@bk.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0792-3110>

Шевела Екатерина Яковлевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
e-mail: shevelak@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8997-3586>

Останин Александр Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
e-mail: ostanin62@mail.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6895-938X>

Information about the authors

Egor V. Batorov*, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
e-mail: Ebatorov@mail.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2902-9336>

Vera V. Sergeevicheva, Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Haematology with Bone Marrow Transplantation Unit, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
e-mail: verden@bk.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1951-2260>

Tatiana A. Aristova, Physician, Department of Haematology with Bone Marrow Transplantation Unit, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
e-mail: taris06@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4885-8327>

Svetlana A. Sizikova, Cand. Sci. (Med.), Physician, Department of Haematology with Bone Marrow Transplantation Unit, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
e-mail: svetlana_sizikova@mail.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7109-3839>

Galina Yu. Ushakova, Cand. Sci. (Med.), Physician, Department of Haematology with Bone Marrow Transplantation Unit, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
e-mail: bmt-novosibirsk@mail.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1822-6326>

Andrey V. Gilevich, Cand. Sci. (Med.), Head of the Intensive Care Unit, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
e-mail: agilevich@bk.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0792-3110>

Ekaterina Ya. Shevela, Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
e-mail: shevelak@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8997-3586>

Alexander A. Ostanin, Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
e-mail: ostanin62@mail.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6895-938X>

Черных Елена Рэмовна, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
e-mail: ct_lab@mail.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2346-6279>

Elena R. Chernykh, Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
e-mail: ct_lab@mail.ru
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2346-6279>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила: 28.04.2020
Принята в печать: 11.10.2021

*** Corresponding author**

Received 28.04.2020
Accepted 11.10.2021
