

- in immunocompromized patients: structure and problems of antibiotic resistance. Results of a multi-center cooperative study. *Hematology and Transfusiology. Russian Journal (Gematologiya i transfusiologiya)*. 2007; 52(1): 11–8. (in Russian)
17. Panina M.V., Klyasova G.A., Novichkova G.A., Myakova N.V., Litvinov D.V., Baidildina D.D., et al. Etiological structure of bacteremias in children with oncohematological diseases and bone marrow failure syndromes in a “University type” multiprofile hospital. *Pediatric Haematology, Oncology and Immunopathology. Russian Journal (Voprosy Gematologii, Onkologii i Immunopatologii v Pediatrii)*. 2014; 13(3): 49–56. (in Russian)
18. Khrulnova S.A., Fedorova A.V., Klyasova G.A. Virulence genes in *Enterococcus* spp. strains, isolated from blood cultures of patients with hematological malignancies in Russia. *Immunopathology, Allergology, Infectology. Russian Journal*. 2016; 1: 78–82. doi:10.14427/jipai.2016.1.78. (in Russian)
19. Brilliantova A.N., Klyasova G.A., Mironova A.V., Tishkov V.I., Novichkova G.A., Bobrykina V.O., et al. Spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in two haematological centres in Russia. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2010; 35(2): 177–81. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.10.006.
20. Pagano L., Caira M., Candoni A., Offidani M., Fianchi L., Martino B., et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica*. 2006; 91(8): 1068–75.
21. Klyasova G.A., Blokhina E.V., Gracheva A.N., Kravchenko S.K., Parovichnikova E.N., Okhmat V.A., et al. Factors influencing recovery in patients with hemoblastoses and candidemia. *Therapeutic archive. Russian Journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2015; 87(7): 77–87. (in Russian)
22. Nucci M., Garnica M., Gloria A.B., Leheguez D.S., Dias V.C., Palma L.C., et al. Invasive fungal diseases in haematopoietic cell transplant recipients and in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplasia in Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013; 19(8): 745–51. doi: 10.1111/1469-0691.12002.
23. Klyasova G.A., Okhmat V.A., Vasilyeva V.A., Popova M.O., Kaporskaya T.S., Sveshnikova U.V., et al. Invasive mycoses in patients with acute leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients. Results of prospective observational multicenter study in Russia (RIFI). *Hematology and Transfusiology. Russian Journal (Gematologiya i transfusiologiya)*. 2016; 61(1, Suppl. 1): 19. (in Russian)
- Поступила 17.01.17
Принята к печати 10.02.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616-006.448-085.361.4-13.3-037

Баторов Е.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В., Сергеевичева В.В., Сизикова С.А.,
Ушакова Г.Ю., Гилевич А.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

ДИНАМИКА ВОССТАНОВЛЕНИЯ CD4⁺FOXP3⁺ Т-КЛЕТОК ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

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

Работа посвящена изучению особенностей восстановления CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток периферической крови после высокодозной химиотерапии (ВХТ) с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) у больных множественной миеломой (ММ) и оценке прогностической значимости CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток в течение посттрансплантационного периода. Содержание циркулирующих CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток было исследовано у 59 больных ММ, которым проводили ВХТ с ауто-ТГСК. Количество CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток оценивали методом проточной цитометрии до ВХТ с ауто-ТГСК на момент выхода из лейкопении через 6 и 12 мес. Количество CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток полностью восстанавливалось и значительно превышало исходную концентрацию ко дню выхода из лейкопении. В последующем (в течение года) их относительное содержание постепенно снижалось до нормы. Анализ взаимосвязи CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток с исходами ауто-ТГСК показал, что больные с рецидивом ММ в течение первых 12 мес после ауто-ТГСК различались значимо более высоким относительным содержанием CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток на момент выхода из лейкопении. Проведение анализа характеристических кривых (receiver operating characteristic – ROC) выявило высокую прогностическую значимость оценки CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток как предиктора раннего развития рецидива заболевания после ВХТ с ауто-ТГСК. Таким образом, количество циркулирующих CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток после ауто-ТГСК восстанавливается быстро и полностью. Развитие раннего рецидива заболевания после ВХТ с ауто-ТГСК ассоциировано с более высоким содержанием CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток ко времени выхода из лейкопении. Повышенное содержание этих клеток позволяет прогнозировать развитие рецидива ММ в раннем посттрансплантационном периоде.

Ключевые слова: множественная миелома; трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток; CD4⁺FOXP3⁺ Т-клетки; рецидив.

Для цитирования: Баторов Е.В., Тихонова М.А., Крючкова И.В., Сергеевичева В.В., Сизикова С.А., Ушакова Г.Ю., Гилевич А.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Динамика восстановления CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток у больных множественной миеломой. *Гематология и трансфузиология*. 2017; 62(1): 15-19. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2017-62-1-15-19>

Batorov E.V., Tikhonova M.A., Kryuchkova I.V., Sergeevicheva V.V., Sizikova S.A.,
Ushakova G.Yu., Gilevich A.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

RECOVERY OF CD4⁺FOXP3⁺ T CELLS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA AFTER AUTOLOGOUS HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

We have investigated the dynamics of post-transplant recovery of CD4⁺FOXP3⁺ T cells in patients with multiple myeloma (MM). The relationship between CD4⁺FOXP3⁺ T cell counts and clinical outcomes of MM patients after high-dose chemotherapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation (AH SCT) also has been evaluated. Fifty-nine patients were included in the study. The content of circulating CD4⁺FOXP3⁺ T cells has been assessed with the use of flow cytometry before AH SCT, at the day of engraftment, and 6 and 12 months later. After AH SCT the relative count of CD4⁺FOXP3⁺ T cells in MM patients restored rapidly, it became higher than initial level at the day of engraftment and then subsequently decreased for a 1 year to values in healthy donors. A

relative count of CD4⁺FOXP3⁺ T cells at the time of engraftment increased in patients with relapsed disease during 12 months after AHSCT. Receiver operating characteristic (ROC) analysis showed that evaluation of CD4⁺FOXP3⁺ T cells at the day of engraftment allowed to predict the early relapse of MM after AHSCT.

Key words: multiple myeloma; autologous hematopoietic stem cell transplantation; CD4⁺FOXP3⁺ T cells; relapse.

For citation: Batorov E.V., Tikhonova M.A., Kryuchkova I.V., Sergeevicheva V.V., Sizikova S.A., Ushakova G.Yu., Gilevich A.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Recovery of CD4⁺FOXP3⁺ T cells in patients with multiple myeloma after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Hematology and Transfusiology. Russian Journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2017; 62(1): 15-19. (in Russian). doi: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2017-62-1-15-19>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 24 November 2016

Accepted 10 February 2017

Множественная миелома (ММ) представляет собой опухолевое заболевание, возникающее в результате пролиферации в костном мозге клона предшественников В-лимфоцитов, которые сохраняют способность к дифференцировке до плазматических клеток и в большинстве случаев продуцируют патологический моноклональный иммуноглобулин. Заболеваемость ММ составляет 1% от всех случаев онкологических заболеваний, до 10–15% опухолей системы крови [1]. Благодаря развитию и внедрению фармакологических препаратов (бортезомиб, леналидомид) и высокодозной химиотерапии (ВХТ) с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) медиана общей выживаемости больных увеличилась до 5–7 лет, однако рецидив и прогрессия заболевания неизбежны [2].

В основе неконтролируемого роста клона В-клеток при ММ лежат количественные и структурные генетические изменения. Развитие болезни ассоциировано со сложными и малоизученными взаимодействиями между опухолевыми клетками, стромальным микроокружением костного мозга и иммунокомпетентными клетками [3]. Избегание малигнизированными В-клетками иммунного надзора при лимфопролиферативных заболеваниях опосредуется многообразными механизмами, среди которых существенную роль отводят регуляторным Т-клеткам (Трег), способным подавлять активность субпопуляций эффекторных лимфоцитов [4–6]. Однако данные исследований, посвященных изменению содержания и функциональной активности Трег при ММ, остаются противоречивыми. Описано как снижение [7], так и увеличение [8, 9] содержания Трег при ММ, а также отсутствие количественных изменений [10] по сравнению со здоровыми лицами. Отдельные исследователи находили связь между повышением количества Трег и развитием рецидива [9, 11], в других работах подобных ассоциаций не выявлено [8, 10].

Для корреспонденции:

Баторов Егор Васильевич, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», 630099, г. Новосибирск, Россия. E-mail: Ebatorov@mail.ru.

For correspondence:

Batorov Egor V., MD, PhD, researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, 630090, Russian Federation. E-mail: Ebatorov@mail.ru.

Information about authors:

Batorov E.V., <http://orcid.org/0000-0003-2902-9336>, Scopus Author ID 35768879800; Tikhonova M.A., <http://orcid.org/0000-0002-2366-1667>, Scopus Author ID 35508779900; Kryuchkova I.V., <http://orcid.org/0000-0001-9981-0617>, Scopus Author ID 6506011822; Sergeevicheva V.V., <http://orcid.org/0000-0002-0792-1951>, Scopus Author ID 54881246800; Sizikova S.A., <http://orcid.org/0000-0001-7109-3839>, Scopus Author ID 6506084173; Ushakova G.Yu., <http://orcid.org/0000-0003-1822-6326>, Scopus Author ID 65628086500; Gilevich A.V., <http://orcid.org/0000-0002-0792-3110>, Scopus Author ID 6602933794; Ostanin A.A., <http://orcid.org/0000-0001-6895-938X>; Chernykh E.R., <http://orcid.org/0000-0003-2346-6279>, ResearcherID: K-1052-2014.

Роль Трег как модулятора противоопухолевого иммунного ответа, по-видимому, значительно возрастает после ауто-ТГСК. ВХТ истощает опухолевый клон и приводит к длительной лимфопении и связанной с ней периферической экспансии лимфоцитов. При этом большинство авторов сходятся на том, что, в отличие от основного пула Т-лимфоцитов, на восстановление которого требуется около 1 года, процентное и абсолютное содержание Трег может достигать относительно высоких значений в ближайшие месяцы после трансплантации [12–14].

Восстановление Трег после ауто-ТГСК описано для ММ, однако данные о связи с течением заболевания после трансплантации зачастую прямо противоположны. Показано как постепенное снижение повышенного содержания Трег у больных ММ в ремиссии после трансплантации [8], так и их увеличение до значений здоровых доноров при исходно сниженном относительном количестве [13]. Настоящая работа была посвящена изучению динамики восстановления CD4⁺FOXP3⁺ Трег у больных ММ в условиях длительной лимфопении после ВХТ с ауто-ТГСК и взаимосвязи между количеством Трег и течением посттрансплантационного периода.

Материал и методы

В исследование были включены 59 больных ММ (29 мужчин и 30 женщин), которым в период с 2009 по 2016 г. проводили ВХТ с ауто-ТГСК на базе клиники иммунопатологии НИИФКИ. Согласно классификации Durie–Salmon (1975) [15], у 3 больных выявлена I стадия ММ, у 22 – II стадия, у 34 – III стадия болезни. По статусу заболевания перед ауто-ТГСК полная ремиссия наблюдалась у 21 больного, частичная ремиссия – у 31, резистентное течение или прогрессия – у 7. Медиана возраста составляла 49 лет (32–64 года), медиана наблюдения 21 мес (3,5–57,5 мес). В качестве группы сравнения было обследовано 38 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту.

Режим мобилизации включал использование высоких доз циклофосфида (4 г/м²; n = 47) либо курс химиотерапии (CAV, n = 4; DCEP, n = 7; EDAP, n = 1) и препарат Г-КСФ (5–10 мкг/кг в день), режим кондиционирования – мелфалан 140–200 мг/м². Процедуру афереза проводили на сепараторах клеток крови ASTEC 204 (Fresenius) и Spectra LRS 07 (COBE) после достижения в периферической крови концентрации 1×10^6 CD34⁺CD45⁺ клеток/мл и продолжали до получения не менее $2,0 \times 10^6$ CD34⁺CD45⁺ клеток/кг. Медиана CD34⁺CD45⁺ гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) составляла $4,48 \times 10^6$ /кг (2,49–16,9 $\times 10^6$ /кг).

Забор крови и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия больного. Исследование CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток проводили у больных до ауто-ТГСК (перед началом кондиционирования, n = 31), после ауто-ТГСК в день выхода из лейкопении (лейкоциты более 1×10^9 /л, в среднем на 14-й день, n = 40), через 6 мес (n = 22) и 12 мес (n = 14). Число больных на контрольных точках варьировало в связи с невозможностью в ряде случаев получить образцы крови. В исследование не были включены данные больных, которым после ауто-ТГСК проводили ХТ или повторную ауто-ТГСК. Монотерапия бортезомибом после ауто-ТГСК (n = 23) к исключению из исследования не приводила.

Клинический рецидив ММ регистрировали при увеличении М-протеина сыворотки не менее 1 г/дл (если исходно не менее 0,5 г/дл) и/или появлении одного или нескольких критериев: новые очаги остеодеструкции или плазмочитомы или увеличение в размере существующих на не менее 50%, гиперкальциемия более 2,65 ммоль/л, снижение показателей гемоглобина более 20 г/л или концентрации

гемоглобина менее 100 г/л; креатинин сыворотки не менее 177 ммоль/л.

Для исследования выделяли мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови стандартным методом центрифугирования цельной гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола-верографина ($\rho = 1,078$). Относительное содержание $CD4^+FOXP3^+$ Т-клеток периферической крови оценивали методом проточной цитометрии, используя анти-CD4 (FITC, или PerCP, или APC, "BD Biosciences", США), анти-FOXP3 (PE "BD Biosciences") моноклональные антитела. Фиксацию и пермеабиллизацию МНК для оценки внутриклеточной экспрессии FOXP3 проводили после инкубации клеток с моноклональными антителами к поверхностным антигенам; использовали растворы параформальдегида 1% ("Sigma-Aldrich", Германия) и Tween-20 0,2% ("Ferak", Германия) по стандартной методике или коммерческий набор растворов для фиксации/пермеабиллизации Transcription Factor Buffer Set в соответствии с инструкцией производителя ("BD Biosciences", США). 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), FL-4 (APC) ("BD FACSCalibur", "CellQuest Software", США). В тексте относительное содержание $CD4^+FOXP3^+$ Т-клеток представлено в виде процента от количества лимфоцитов.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft). Для оценки значимости различий между группами больных использовали *U*-критерий Манна-Уитни. Для оценки диагностической значимости использовали анализ характеристической кривой (ROC, receiver operating characteristic) с расчетом площади под кривой. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Для изучения динамики восстановления $CD4^+FOXP3^+$ Т-клеток у больных ММ был проведен сравнительный анализ относительного и абсолютного количества этих клеток до ауто-ТГСК, на момент выхода из лейкопении, через 6 и 12 мес после ауто-ТГСК. Изменения количества исследуемой популяции Т-лимфоцитов оценивали по содержанию FOXP3-положительных клеток среди $CD4^+$ Т-клеток независимо от экспрессии молекулы CD25, поскольку данный транскрипционный фактор был обнаружен не только в субпопуляции $CD4^+CD25^{hi}$ Трег, но и среди $CD4^+CD25^-$ Т-лимфоцитов (рис. 1).

Перед ауто-ТГСК относительное и абсолютное количество $CD4^+FOXP3^+$ Т-клеток у больных ММ не отличалось от значений доноров (табл. 1). В течение первого года после ауто-ТГСК отмечены выраженные колебания относительного содержания этой субпопуляции. На день выхода из лейкопении после ауто-ТГСК содержание циркулирующих $CD4^+FOXP3^+$ Т-клеток было значимо выше исходных значений и показателей доноров. В дальнейшем относительное количество этих клеток снижалось и через 6 мес после ауто-ТГСК было значимо ниже донорских и предтрансплантационных показателей, через 12 мес значимо не различалось от значений у здоровых доноров, но оставалось ниже исходного значения (см. табл. 1).

Абсолютное содержание $CD4^+FOXP3^+$ Т-клеток в течение всего периода наблюдения в целом оставалось стабильным, значимо не отличаясь от показателей до ауто-ТГСК. Выраженная лимфопения у больных после ауто-ТГСК обуславливала значимое снижение абсолютного количества $CD4^+FOXP3^+$ Т-клеток по сравнению с показателями доноров. Через 1 год после ауто-ТГСК значения исследуемой субпопуляции Т-клеток достигали нормальных (см. табл. 1).

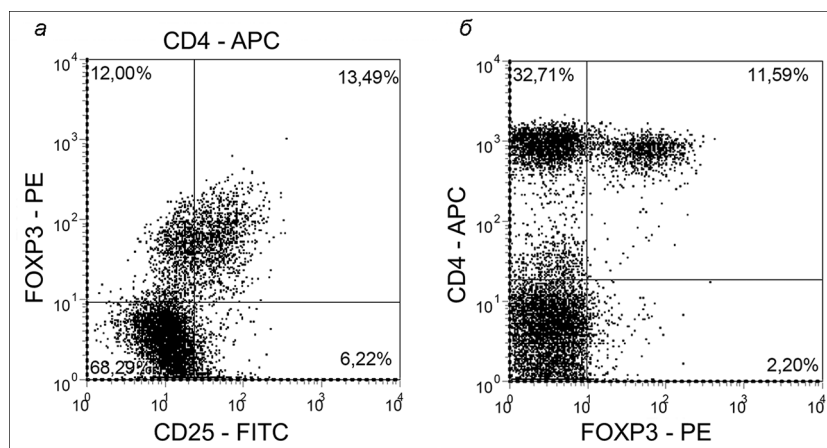


Рис. 1. Цитометрическая характеристика $CD4^+FOXP3^+$ Т-клеток.

а – относительное количество FOXP3-положительных $CD4^+$ Т-клеток среди $CD25^-$ негативных (верхний левый квадрант) и $CD25^+$ положительных (верхний правый квадрант) популяций, % от $CD4^+$ Т-клеток; б – общее относительное количество $CD4^+FOXP3^+$ Т-клеток (верхний правый квадрант) в гейте лимфоцитов. Представлены данные репрезентативного пациента.

Анализ исходов ВХТ с ауто-ТГСК в группе 36 больных, находившихся под наблюдением более 12 мес, показал, что рецидив ММ в течение первого года после ауто-ТГСК наблюдался у 7 больных. Больные с развитием рецидива не отличались от больных в ремиссии по возрасту, стадии ММ, статусу болезни на момент ВХТ с ауто-ТГСК, количеству реинфузированных $CD34^+CD45^+$ ГСК, а также относительному и абсолютному содержанию $CD4^+FOXP3^+$ Т-клеток перед ВХТ с ауто-ТГСК (табл. 2).

У больных с рецидивом ММ в течение первого года наблюдалось более высокое относительное содержание $CD4^+FOXP3^+$ Т-клеток на день выхода из лейкопении, чем у больных, сохранивших ремиссию ММ ($n = 29$): 8,3% (6–9,2%) против 4,8% (2,8–5,5%); $p_U = 0,0066$ (рис. 2). Различий между группами по абсолютному содержанию данной субпопуляции достигнуто не было: $53/\text{мм}^3$ (21–105/ мм^3) против $28/\text{мм}^3$ (18–58/ мм^3); $p_U = 0,13$.

Для определения прогностической значимости относительного содержания $CD4^+FOXP3^+$ Т-клеток на момент восстановления лейкоцитов в прогнозе развития рецидива в течение первого года после ВХТ с ауто-ТГСК был проведен ROC-анализ. Построение ROC-кривой выявило высокую информативность определения исследуемого показателя. Площадь под кривой составила 0,835 (95% ДИ: 0,678–0,992; $p = 0,0066$). Относительное содержание $CD4^+FOXP3^+$ Т-клеток более 5,77% позволяло прогнозировать неблагоприятный исход с чувствительностью 85,7% и специфичностью 75,7%, отношение правдоподобия 3,55 (рис. 3).

Таблица 1

Относительное и абсолютное содержание $CD4^+FOXP3^+$ Т-клеток у больных ММ до и после ВХТ с ауто-ТГСК

Субпопуляция клеток	Здоровые доноры ($n = 38$)	До ауто-ТГСК ($n = 31$)	Выход из лейкопении ($n = 40$)	+6 мес ($n = 22$)	+12 мес ($n = 14$)
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1,6 (1,4–1,9)	1,3* (1,0–1,5)	0,7*** (0,4–1,0)	1,6 (1,2–2,2)	2,2 ** (1,6–2,7)
$CD4^+FOXP3^+$ Т-клетки, %	2,4 (2,0–3,4)	3,2 (1,9–4,9)	5,1*** (3,1–7,3)	1,8*** (0,9–2,8)	1,9 ** (1,6–2,5)
$CD4^+FOXP3^+$ Т-клетки, клеток/ мм^3	55 (34–108)	43 (28–80)	29* (16–60)	27* (16–43)	49 (21–53)

Примечание. Здесь и в табл. 2 данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона; * – $p_U < 0,05$ – по сравнению с соответствующими значениями здоровых доноров; ** – $p_U < 0,05$ – по сравнению с соответствующими значениями больных до ауто-ТГСК.

Таблица 2

Характеристика больных ММ в зависимости от течения заболевания после ВХТ с ауто-ТГСК

Клинико-лабораторные показатели	Ремиссия (n = 29)	Рецидив (n = 7)	Значимость различий
Стадия по Durie–Salmon:			
I	2	1	$p_{\text{ТМФ}} = 0,49$
II	16	3	$p_{\text{ТМФ}} = 0,43$
III	11	3	$p_{\text{ТМФ}} = 0,57$
Статус на момент ауто-ТГСК:			
полная ремиссия	12	1	$p_{\text{ТМФ}} = 0,19$
частичная ремиссия	15	4	$p_{\text{ТМФ}} = 0,57$
резистентное течение/прогрессия	2	2	$p_{\text{ТМФ}} = 0,16$
Возраст, годы	49 (43–53)	48 (47–55)	$p_U = 0,26$
CD34 ⁺ CD45 ⁺ ГСК, × 10 ⁶ /кг	4,8 (3,8–6,8)	4,4 (3,9–5,4)	$p_U = 0,60$
CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ Т-клетки перед ВХТ с ауто-ТГСК:			
отн., % абс.,	3,7 (1,3–9,0)	3,3 (2,3–4,0)	$p_U = 0,82$
клеток/мм ³	51 (28–89)	65 (26–80)	$p_U = 0,94$

Примечание. $p_{\text{ТМФ}}$ – значимость различий между группами по точному методу Фишера; p_U – значимость различий между группами по U-критерию Манна–Уитни.

Обсуждение

К регуляторным Т-клеткам в широком смысле относят различные популяции CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$, NK-Т и CD4⁺CD8⁺-лимфоцитов, способных подавлять иммунный ответ. Наиболее исследованными в настоящее время являются CD4⁺ Трег, экспрессирующие молекулу CD25 и транскрипционный фактор FOXP3, ответственный за реализацию супрессорных функций. Однако FOXP3 и другие поверхностные и внутриклеточные маркеры неспецифичны для Трег, их также транзитивно экспрессируют активированные CD4⁺ Т-клетки. Отдельные субпопуляции CD4⁺ Трег могут быть CD25-негативными и при этом обладать значительным регуляторным потенциалом [16, 17]. Поэтому в настоящей работе в качестве Трег была исследована субпопуляция CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих FOXP3.

Полученные результаты свидетельствуют, что относительное содержание CD4⁺ FOXP3⁺ Т-клеток у больных ММ в первый год после ауто-ТГСК претерпевает значительные изменения: ко дню +14-му после ауто-ТГСК значимо превышает исходные значения, после чего снижается и к исходу 12 мес достигает нормы. Быстрое восстановление Трег после ауто-ТГСК согласуется с данными литературы [12–14]. Основным источником Трег на фоне глубокого угнетения тимопоэза являются реинфузируемые в составе продукта сепарации Т-клетки. Ранее рядом исследователей показано увеличение

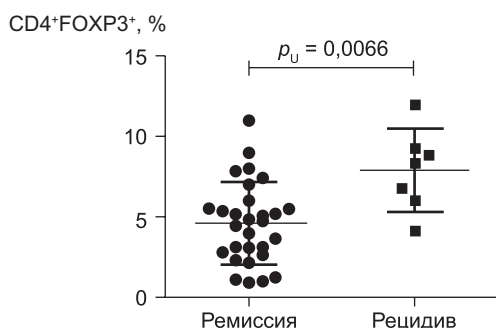


Рис. 2. Относительное количество CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток на момент выхода из лейкопении у больных ММ в зависимости от течения посттрансплантационного периода.

Данные представлены в виде индивидуальных значений, медиана и интерквартильный диапазон.

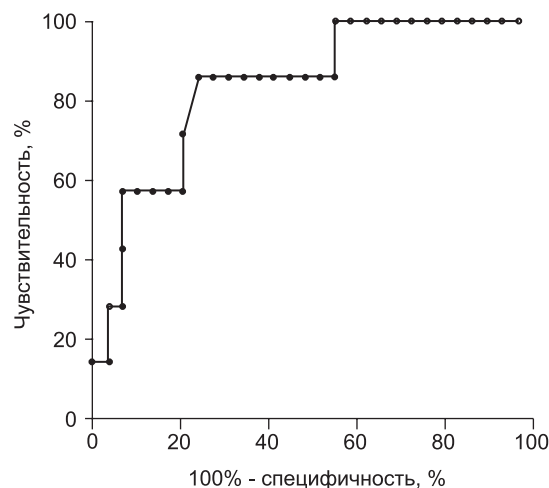


Рис. 3. ROC-анализ диагностической значимости определения содержания CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток на момент выхода из лейкопении после ауто-ТГСК у больных ММ в прогнозе раннего рецидива.

пролиферативной активности Трег после аллогенной ТГСК [12, 14, 18]. При этом колебания относительного количества Трег также зависят от общего числа лимфоцитов и восстановления других субпопуляций лимфоцитов. Мы обнаружили, что абсолютное количество Трег остается на одном уровне в течение посттрансплантационного периода у больных ММ от момента выхода из лейкопении до конца первого года после ТГСК.

Роль более высокого относительного количества Трег в условиях лимфопении и их влияние на процессы периферической экспансии лимфоцитов остаются предметом дискуссий. S. Shen и соавт. [19] продемонстрировали, что Трег более эффективно подавляли гомеостатическую пролиферацию Т-клеток с низкоавидными Т-клеточными рецепторами. C. Winstead и соавт. [20] показали, что CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ клетки ингибировали антигенспецифическую «спонтанную» экспансию Т-лимфоцитов, но не влияли на гомеостатическую пролиферацию, индуцируемую интерлейкином 7. Также отмечено, что отсутствие Трег в течение периода реконструкции Т-лимфоцитов приводит к ограничению репертуара Т-клеточных рецепторов и снижению способности развивать полноценный иммунный ответ на чужеродные антигены [21]. Возможно, Трег предотвращают неконтролируемую экспансию быстро пролиферирующих клонов, чем способствуют будущему разнообразию Т-клеток.

В настоящем исследовании продемонстрировано, что более высокое относительное содержание Трег в раннем посттрансплантационном периоде ассоциировано с развитием рецидива ММ в течение 12 мес после ауто-ТГСК. Данные о взаимосвязи Трег с исходами ауто-ТГСК неоднозначны. Так, по данным некоторых авторов [9, 11] повышенное количество CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Трег при ММ ассоциировано с плохим прогнозом. В то же время в других исследованиях [8, 10] взаимосвязи между количеством Трег и выживаемостью не обнаружено. Учитывая лимфоидный генез ММ, общность продуцируемых опухолевыми и иммунокомпетентными клетками цитокинов и их развитие в условиях одного костно-мозгового микроокружения, сложно с уверенностью говорить, является ли повышение Трег причиной или следствием прогрессии данного заболевания. Малигнизированные плазматические клетки, полученные как от больных, так и из клеточных линий ММ, способны стимулировать генерацию индуцибельных Трег (предположительно, при взаимодействии через ICOS/ICOS-L) [6], однако в условиях деpleции значительного количества опухолевых клеток после ВХТ с ауто-ТГСК возможности опухоли индуцировать генерацию Трег ограничены. При этом более высокое относительное количество Трег в условиях лимфопении может приводить к ограничению экспансии

эффекторных лимфоцитов и способствовать прогрессии заболевания даже без дополнительной стимуляции.

Несмотря на отсутствие четкого понимания роли Трег в патогенезе ММ, проведенный ROC-анализ позволил заключить, что выявленные различия в количестве этих клеток могут быть использованы в качестве фактора прогноза раннего рецидива после ауто-ТГСК. Известно, что существующие классификации (по Durie-Salmon и ISS) недостаточно информативны для прогноза течения ММ после проведения ВХТ с ауто-ТГСК [1]. Хорошей прогностической значимостью обладают методы цитогенетического и FISH-исследований больных ММ [22], однако сложность и высокая стоимость ограничивают их широкое применение. В этих условиях определение CD4⁺FOXP3⁺ Т-клеток в периферической крови на день выхода из лейкопении может служить своеобразным суррогатным маркером неблагоприятного прогноза ММ. Дальнейшие исследования механизмов взаимодействия опухоли, клеток иммунной системы и стромального микроокружения, возможно, прольют свет на роль Трег в детерминировании течения болезни при ММ.

Полученные данные позволяют сделать несколько заключений:

- относительное содержание Трег у больных ММ после ВХТ с ауто-ТГСК быстро (ко времени выхода из лейкопении) достигает и превышает предтрансплантационный уровень, после чего снижается и к исходу 12 мес достигает нормативных значений;
- развитие раннего рецидива заболевания после ауто-ТГСК ассоциируется с более высоким содержанием Трег ко времени выхода из лейкопении;
- оценка относительного содержания этих клеток по предварительным данным может быть использована для прогнозирования течения посттрансплантационного периода.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бессмельцев С.С. Множественная миелома (патогенез, клиника, диагностика, дифференциальный диагноз). Часть I. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2013; 6(3): 237–57

Остальные источники литературы см. в References

REFERENCES

1. Bessmeltsev S.S. Multiple myeloma (pathogenesis, clinical features, diagnosis, differential diagnosis). Part I. *Clinical Oncohematology. Fundamental research and clinical practice. Russian journal (Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamentalnye issledovaniya i klinicheskaya praktika)*. 2013; 6(3): 237–57. (in Russian)
2. Kumar S.K., Rajkumar S.V., Dispenzieri A., Lacy M.Q., Hayman S.R., Buadi F.K., et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*. 2008; 111(5): 2516–20.
3. Pratt G., Goodyear O., Moss P. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* 2007; 138(5): 563–79.
4. Mittal S., Marshall N.A., Duncan L., Culligan D.J., Barker R.N., Vickers M.A. Local and systemic induction of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008; 111(11): 5359–70. doi: 10.1182/blood-2007-08-105395.
5. Heier I., Hofgaard P.O., Brandtzaeg P., Jahnsen F.L., Karlsson M. Depletion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells inhibits local tumour growth in a mouse model of B cell lymphoma. *Clin. Exp. Immunol.* 2008; 152(2): 381–7.

6. Feyler S., Scott G.B., Parrish C., Jarmin S., Evans P., Short M., et al. Tumour cell generation of inducible regulatory T-cells in multiple myeloma is contact-dependent and antigen-presenting cell-independent. *PLoS One*. 2012; 7(5): e35981.
7. Prabhala R.H., Neri P., Bae J.E., Tassone P., Shammas M.A., Allam C.K., et al. Dysfunctional T regulatory cells in multiple myeloma. *Blood*. 2006; 107(1): 301–4.
8. Beyer M., Kochanek M., Giese T., Endl E., Weihrauch M.R., Knolle P.A., et al. In vivo peripheral expansion of naive CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2006; 107(10): 3940–9.
9. Muthu Raja K.R., Rihova L., Zahradova L., Klincova M., Penka M., Hajek R. Increased T regulatory cells are associated with adverse clinical features and predict progression in multiple myeloma. *PLoS One*. 2012; 7(10): e47077.
10. Foglietta M., Castella B., Mariani S., Coscia M., Godio L., Ferracini R., et al. The bone marrow of myeloma patients is steadily inhabited by a normal-sized pool of functional regulatory T cells irrespective of the disease status. *Haematologica*. 2014; 99(10): 1605–10.
11. Giannopoulos K., Kaminska W., Hus I., Dmoszynska A. The frequency of T regulatory cells modulates the survival of multiple myeloma patients: detailed characterisation of immune status in multiple myeloma. *Br. J. Cancer*. 2012; 106(3): 546–52.
12. Atanackovic D., Cao Y., Luetkens T., Panse J., Faltz C., Arfsten J., et al. CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T regulatory cells reconstitute and accumulate in the bone marrow of patients with multiple myeloma following allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2008; 93(3): 423–30.
13. Ganesan P., Gupta R., Hakim M., Kumar L., Bhaskar A., Sharma A. Reconstitution of regulatory T cells after autologous transplantation in multiple myeloma. *Int. J. Hematol.* 2011; 94(6): 578–9.
14. Matsuoka K., Kim H. T., McDonough S., Bascug G., Warshauer B., Koreth J., et al. Altered regulatory T cell homeostasis in patients with CD4⁺ lymphopenia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Clin. Invest.* 2010; 120(5): 1479–93.
15. Durie B.G., Salmon S.E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 1975; 36(3): 842–54.
16. Feyler S., Selby P.J., Cook G. Regulating the regulators in cancer-immunosuppression in multiple myeloma (MM). *Blood Rev.* 2013; 27(3): 155–64.
17. Haque R., Lei F., Xiong X., Song J. The regulation of FoxP3-expressing regulatory T cells. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*. 2011; 11(4): 334–46.
18. Kawano Y., Kim H.T., Matsuoka K., Bascug G., McDonough S., Ho V.T., et al. Low telomerase activity in CD4⁺ regulatory T cells in patients with severe chronic GVHD after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2011; 118(18): 5021–30.
19. Shen S., Ding Y., Tadokoro C.E., Olivares-Villagómez D., Camps-Ramírez M., Curotto de Lafaille M.A., et al. Control of homeostatic proliferation by regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 2005; 115(12): 3517–26.
20. Winstead C.J., Fraser J.M., Khoruts A. Regulatory CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells selectively inhibit the spontaneous form of lymphopenia-induced proliferation of naive T cells. *J. Immunol.* 2008; 180(11): 7305–17.
21. Winstead C.J., Reilly C.S., Moon J.J., Jenkins M.K., Hamilton S.E., Jameson S.C., et al. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells optimize diversity of the conventional T cell repertoire during reconstitution from lymphopenia. *J. Immunol.* 2010; 184(9): 4749–60.
22. Avet-Loiseau H., Attal M., Moreau P., Charbonnel C., Garban F., Hulin C., et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergrupee Francophone du Myélome. *Blood*. 2007; 109(8): 3489–95.

Поступила 24.11.16

Принята к печати 10.02.17