

*Е.В. Баторов, О.Ю. Леплина, Т.А. Аристова, В.В. Денисова, Д.С. Баторова,
С.А. Сизикова, Г.Ю. Ушакова, Е.Р. Черных*

ХАРАКТЕРИСТИКА ГМ-КСФ-ПРОДУЦИРУЮЩИХ CD4⁺ Т-КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Российская Федерация

Резюме. В работе представлен анализ относительного содержания CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, у пациентов с множественной миеломой. **Цель исследования:** оценить содержание CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток у пациентов с множественной миеломой после высокодозной химиотерапии с трансплантацией аутологичных гемопоэтических клеток-предшественников. **Материалы и методы.** В исследование были включены 15 больных множественной миеломой в стадии ремиссии после индукционной терапии перед высокодозной химиотерапии и после трансплантации аутологичных гемопоэтических клеток-предшественников и девять сопоставимых здоровых доноров. Содержание популяций CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, оценивали в периферической крови и образцах костного мозга методом проточной цитометрии. *In vitro* исследовали экспансию CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток после стимуляции aCD3/CD28 и комбинацией гомеостатических цитокинов. **Результаты.** Относительное содержание CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, было значимо выше у больных множественной миеломой в ремиссии по сравнению со здоровыми донорами. Количество CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток в циркуляции и костном мозге не отличалось. Не выявлено различий в содержании CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток у больных перед высокодозной химиотерапии и при восстановлении лейкоцитов после трансплантации аутологичных гемопоэтических клеток-предшественников, то есть на фоне цитокин-индуцированной гомеостатической пролиферации зрелых лимфоцитов. Экспансия CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, в ответ на стимуляцию aCD3/CD28 и гомеостатическими цитокинами мононуклеарных клеток больных множественной миеломой *in vitro* снижена по сравнению со здоровыми донорами и больными аутоиммунными заболеваниями.

Ключевые слова: множественная миелома, Т-клетки, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, трансплантация аутологичных гемопоэтических клеток-предшественников

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Баторов Егор Васильевич

ebatorov@mail.ru

Дата поступления: 01.09.2024

Образец цитирования: Баторов Е.В., Леплина О.Ю., Аристова Т.А., Денисова В.В., Баторова Д.С., Сизикова С.А., Ушакова Г.Ю., Черных Е.Р. Характеристика ГМ-КСФ-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток у пациентов с множественной миеломой. [Электронный ресурс] Вестник уральской медицинской академической науки. 2024, Том 21, № 3, с. 253–261, DOI: 10.22138/2500-0918-2024-21-3-253-261

Введение

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) является одним из основных цитокинов, стимулирующих экспансию и дифференцировку миелоидных клеток-предшественников, гранулоцитов, моноцитов, макрофагов, дендритных клеток. Помимо клеток миелоидного ряда, ГМ-КСФ вовлечён в пролиферацию и активацию фибробластов, эпителиальных и эндотелиальных

ных клеток, играет важную роль в поддержании воспаления. Фактор продуцируется макрофагами, фибробластами, лимфоцитами и другими типами клеток, в том числе принадлежащими к некоторым типам опухолей. Продукция ГМ-КСФ Т-хелперами является одним из важных путей взаимодействия между клетками приобретенного и врожденного иммунного ответа [1, 2].

Чрезвычайно неоднозначны эффекты ГМ-КСФ в условиях опухолевого роста. Опосредованная ГМ-КСФ пролиферация и активация гранулоцитов, макрофагов и дендритных клеток важна для противоопухолевого иммунного ответа. Препараты ГМ-КСФ широко используются в клинике для сокращения периодов лейкопении после курсов лучевой и химиотерапии. Описан прямой ингибирующий эффект ГМ-КСФ при отдельных видах рака. С другой стороны, ГМ-КСФ является ключевым стимулирующим цитокином для про-опухолевых популяций клеток – М2-макрофагов, миелоидных супрессорных клеток (МСК), так как активирует ангиогенез и экспансию разных типов опухолевых клеток [1].

Множественная миелома (ММ) является одним из злокачественных гематологических новообразований, при котором происходит поражение В-клеточного звена иммунитета. Отличительная черта ММ – неконтролируемая пролиферация клона предшественников В-клеток, дифференцирующихся до плазматических клеток в костном мозге (КМ) и в большинстве случаев способных секретировать гамма-глобулин [3]. В прогрессировании ММ важное значение отводится иммуносупрессивному микроокружению КМ, которое создает благоприятные условия для пролиферации опухолевого клона [4]. При этом в настоящее время мало изучена роль ГМ-КСФ в патогенезе ММ. Описан стимулирующий эффект ГМ-КСФ на малигнизированные миеломные клетки [5], ожидаема активация МСК, имеющих значение в прогрессии ММ [6, 7]. В условиях воспаления одним из основных источников ГМ-КСФ являются CD4⁺ Т-клетки [2]. Доля Т-хелперов, продуцирующих данный ростовой фактор, на разных этапах лечения ММ не исследована. Продукция ГМ-КСФ может иметь особое значение на этапе восстановления кроветворения после высокодозной химиотерапии (ВХ) с трансплантацией аутологичных гемопоэтических клеток-предшественников (ауто-ТГКП) как фактор экспансии МСК.

Цель: оценить содержание CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор у пациентов с множественной миеломой после индукционной терапии и после высокодозной химиотерапии с трансплантацией аутологичных гемопоэтических клеток-предшественников.

Материалы и методы

Пациенты

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИИФКИ. Пациенты обследовались после подписания формы информированного добровольного согласия. Было 15 больных ММ, в возрасте 37—65 лет (медиана 53 года), восемь женщин, семь мужчин, находившихся на лечении в отделении гематологии с блоком трансплантации костного мозга клиники иммунопатологии НИИФКИ с августа 2023 года по июнь 2024 года. У 12 пациентов диагностирован IgG-вариант парапротеина, у двоих – IgA, у одного – миелома Бенс-Джонса. Перед ВХ пациенты получали стандартные бортезомиб-содержащие курсы индукционной терапии, при необходимости – курсы второй линии (ДСЕР – режим иммунохимиотерапии, включающий циклофосфамид, этопозид, цисплатин, дексаметазон, EDAP – содержащий этопозид, дексаметазон, цитарабин, цисплатин) или терапию на основе леналидомида, у всех достигнута полная или частичная ремиссия. Средняя доза реинфузированных CD34⁺ гемопоэтических клеток-предшественников составила $4,7 \times 10^6/\text{кг}$ ($3,5\text{--}6,3 \times 10^6/\text{кг}$). Одновременно были изучены показатели в группе контроля, состоящей из девяти сопоставимых здоровых доноров.

Проточная цитометрия

Образцы периферической крови (ПК) и КМ пациентов получали после индукционной терапии перед проведением ВХ (n=11) и после ауто-ТГКП (дни +14 – +23) (n=12). Для исследования внутриклеточной продукции ГМ-КСФ выделяли мононуклеарные клетки (МНК), с целью активации инкубировали в течение 5 часов с форболмириостат ацетатом («Sigma», Германия; конечная концентрация 10 нг/мл суспензии клеток), иономицином («Sigma»; конечная концентрация 10 мкг/мл суспензии клеток); после первого часа активации в суспензию клеток добавляли ингибитор транспорта белков BD GolgiStop™ (BD Pharmingen™, США), содержащий монэнзин, в соответствии с инструкци-

ей. Фиксацию и пермеабиллизацию МНК проводили после инкубации клеток с анти-CD4 моноклональными антителами (FITC, BD Pharmingen™, США); для фиксации использовали Fixation Buffer (420801, Biolegend, США), для пермеабиллизации – Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (421002, Biolegend, США). Для оценки внутриклеточной продукции ГМ-КСФ использовали анти-ГМ-CSF моноклональные антитела (APC, Biolegend, США). Исследование проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Biosciences, США). Анализ проводили после накопления не менее 30000 событий в регионе CD4⁺ Т-клеток. Стратегия гейтирования представлена на рисунке 1.

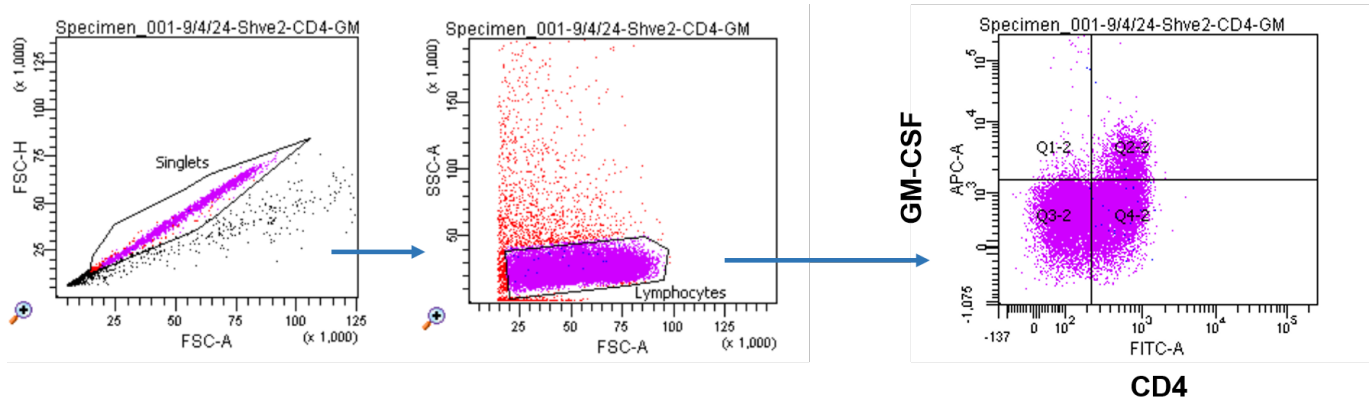


Рисунок 1. Стратегия гейтирования CD4⁺ Т-клеток, внутриклеточно продуцирующих ГМ-КСФ, больного множественной миеломой

Примечание: представлены данные репрезентативного пациента

Figure 1. Gating strategy for CD4⁺ T cells expressing GM-CSF in a multiple myeloma patient

Note: the data of a representative patient are presented

Эксперименты *in vitro*

Для изучения продукции ГМ-КСФ CD4⁺ Т-клетками в условиях активации через Т-клеточный рецептор либо гомеостатическими цитокинами IL-2, IL-7, IL-15 из 8 мл ПК здоровых доноров (n=8), больных ММ (n=8) и больных ревматоидным артритом и анкилозирующим спондилоартритом (n=7) получали МНК. Мононуклеарные клетки культивировали в количестве 10⁵ единиц/лунку в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-1640 в присутствии 10 % FCS (фетальной телячьей сыворотки) при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 48 часов в следующих вариантах: 1) без стимуляции; 2) при стимуляции анти-CD3 моноклональными антителами (3 мкг/мл) и CD28 (BD Pharmingen™, США); 3) при стимуляции IL-2 (50 ЕД/мл) (Ронколейкин, Биотех, Россия), IL-7 (50 нг/мл) (SCI store, Россия), IL-15 (50 нг/мл) (SCI store, Россия). Культуры дублировали в 12 лунках с целью получения клеток в количестве, достаточном для проведения цитофлуориметрического анализа. Через 48 часов клетки собирали, инкубировали в течение 5 часов с растворами РМА (propidium monoazide), иономицина и монэнзина, инкубировали с анти-CD4 (флуорохром FITC) и анти-ГМ-CSF (флуорохром APC) моноклональными антителами и исследовали методом проточной цитометрии.

Статистический анализ данных

Данные анализировали с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона. Сравнение между двумя группами проводили с помощью U-непараметрического теста Манна-Уитни (критерий PU). Сравнение между двумя показателями внутри группы проводили с помощью парного критерия знаков. Двусторонний p<0,05 считался статистически значимым.

Результаты

Лишь незначительная доля CD4⁺ Т-клеток продуцировала ГМ-КСФ у доноров. У больных ММ в ремиссии после индукционной терапии относительное содержание CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток было значительно выше в сравнении со здоровыми людьми. Не было выявлено различий по содержанию CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток между группами больных ММ в ремиссии перед кондиционированием с ауто-ТГКП и после восстановления лейкоцитов (Табл. 1). Относительное количество CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток и про-

цент GM-CSF⁺ в CD4⁺ Т-клетках в образцах КМ больных ММ в ремиссии составляли соответственно 5,0% (2,2-5,9%) и 10,0% (9,5-28,0%) и значимо не отличалось от значений циркулирующих популяций.

Таблица 1
Относительное содержание CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток в периферической крови доноров и больных ММ

Table 1
Relative content of CD4⁺GM-CSF⁺ T cells from peripheral blood of healthy donors and patients with multiple myeloma

Показатель Cell subset	Доноры Donors	Больные перед ВХ Patients before HC	Больные после ауто-ТГКП Patients following auto-HPCT
CD4 ⁺ G-CSF ⁺ -лимфоциты, % CD4 ⁺ G-CSF ⁺ -lymphocytes, %	1,8 (1,1-3,0)	8,2 (5,3-9,6)**	6,8 (5,8-8,7)*
CD4 ⁺ G-CSF ⁺ -Т-лимфоциты, % CD4 ⁺ G-CSF ⁺ - T-cells, %+	4,2 (2,9-19,3)	23,1 (13,6-28,4)*	15,6 (14,2-16,4)*

Для изучения продукции ГМ-КСФ CD4⁺ Т-клетками в условиях активации через Т-клеточный рецептор либо при гомеостатической пролиферации была проведена серия экспериментов *in vitro*. Культуры МНК доноров, больных ММ и больных аутоиммунными заболеваниями (АИЗ), стимулировались анти-CD3/CD28 или комбинацией интерлейкинов (ИЛ) IL-2, IL-7, IL-15. Мононуклеарные клетки больных ревматоидным артритом и анкилозирующим спондилоартритом высокой активности были исследованы в качестве положительного контроля, так как патогенетическая роль ГМ-КСФ и повышенная реактивность CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток ранее была описана при ряде АИЗ [2].

В культурах МНК здоровых доноров выявлено значимое увеличение содержания CD4⁺Т-клеток, продуцирующих ГМ-КСФ при стимуляции гомеостатическими цитокинами в сравнении с нестимулированными культурами (Рис. 2). В культурах больных АИЗ отмечено более выраженное увеличение количества CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток при стимуляции через Т-клеточный рецептор (αCD3/CD28). В культурах больных ММ не было выявлено существенных изменений в содержании CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток в αCD3/CD28- и ИЛ-стимулированных культурах, несмотря на некоторое увеличение исследуемой популяции (p=0,063 по критерию Вилкоксона для парных выборок между ИЛ-стимулированными и нестимулированными культурами) (Рис. 2). При этом также не обнаружено значимых различий в содержании этих клеток между стимулированными культурами больных ММ и доноров, и больных АИЗ.

Обсуждение

Было проведено исследование содержания CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих ГМ-КСФ, у больных ММ на разных этапах терапии. Роль этого ростового фактора в патогенезе ММ изучена недостаточно. Помимо стимуляции миелоидных клеток с противоопухолевой активностью – в первую очередь, популяций антигенпрезентирующих клеток, – ГМ-КСФ активирует проопухолевые фракции миелоидного ряда, в особенности МСК [1, 6, 7]. Кроме того, Zhang X.G. и соавт. (1990) выявили опосредованный стимулирующий эффект ГМ-КСФ на пролиферацию опухолевого клона при ММ.

Относительное количество CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток было значимо выше у больных ММ в ремиссии после индукционной терапии и после ВХ с ауто-ТГКП в сравнении с донорами. При этом не отличались между собой показатели CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток перед ВХ и при восстановлении лейкоцитов после ауто-ТГКП, то есть при цитокин-индуцированной гомеостатической пролиферации. Содержание продуцирующих ГМ-КСФ CD4⁺ Т-клеток в образцах КМ не отличалось от показателей периферической крови.

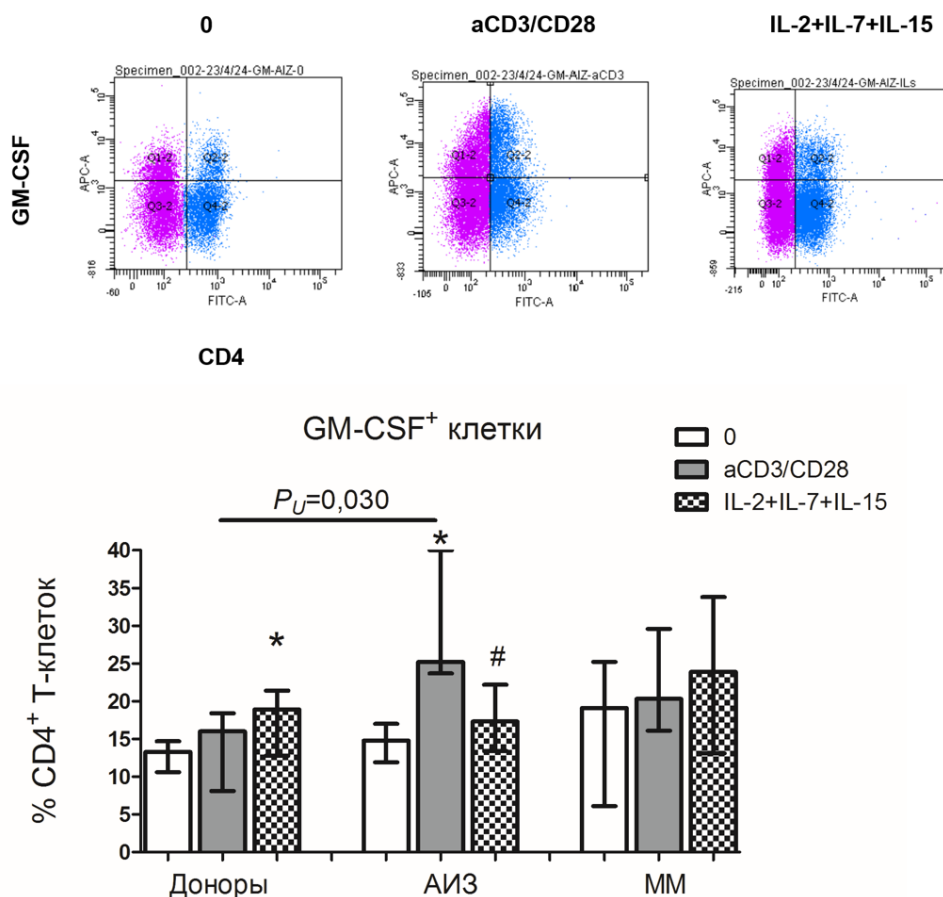


Рисунок 2. Относительное содержание ГМ-КСФ-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток доноров, больных аутоиммунными заболеваниями и множественной миеломой в различных условиях культивирования. Примечание. МНК доноров (n=8, «Доноры»), больных аутоиммунными заболеваниями (n=7, «АИЗ») и множественной миеломой (n=7, «ММ») культивировали в концентрации 105 единиц/лунку в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640 в присутствии 10% FCS при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 48 часов в следующих вариантах: 1) без стимуляции («0»), 2) при стимуляции анти-CD3 моноклональными антителами и CD28 («aCD3/CD28»), 3) при стимуляции IL-2 (50 ЕД/мл) IL-7 (50 нг/мл), IL-15 (50 нг/мл) («IL-2+IL-7+IL-15»). Представлены данные репрезентативного пациента с ревматоидным артритом и результаты серии экспериментов.

Представлены медиана, интерквартильный диапазон. Значимые различия представлены на рисунке. *p<0,05 – по критерию Вилкоксона для парных выборок в сравнении с нестимулированными культурами одной группы; #p<0,05 – по критерию Вилкоксона для парных выборок в сравнении с aCD3/CD28-стимулированными культурами одной группы.

Figure 2. Relative abundance of GM-CSF-producing CD4⁺ T cells from donors, patients with autoimmune diseases and multiple myeloma under different culture conditions

Note. Mononuclear cells from healthy donors (n=8, "Donors"), patients with autoimmune diseases (n=7, "AID") and multiple myeloma (n=7, "MM") were cultured 105 units/well in 96-well round-bottom plates in RPMI-1640 medium in the presence of 10% FCS at 37°C in a CO₂ incubator for 48 hours in the following variants: 1) without stimulation ("0"), 2) with stimulation with anti-CD3 monoclonal antibodies and CD28 ("aCD3/CD28"), 3) with stimulation with IL-2 (50 U/ml), IL-7 (50 ng/ml), IL-15 (50 ng/ml) ("IL-2+IL-7+IL-15"). Data from a representative patient with rheumatoid arthritis and the results of a series of experiments are presented.

Medians and interquartile ranges are presented. Significant differences are shown in the figure. *p<0,05 – by the Wilcoxon test for paired samples compared to unstimulated cultures of the same group; #p<0,05 – by the Wilcoxon test for paired samples compared to aCD3/CD28-stimulated cultures of the same group.

В проведенных экспериментах *in vitro* показана экспансия продуцирующих ГМ-КСФ CD4⁺ Т-клеток в ответ на стимуляцию комбинацией цитокинов в культурах здоровых доноров и через Т-клеточный рецептор (aCD3/CD28) – больных АИЗ. При этом содержание CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток в стимулиро-

ванных культурах больных ММ увеличивалось статистически незначимо. Отсутствие увеличения продукции ГМ-КСФ CD4⁺ Т-клетками в ответ на стимуляцию согласуется с полученными данными *in vivo* и может быть обусловлено дисфункцией Т-лимфоцитов в условиях опухолевого роста либо предшествующей индукционной терапией. Ранее нами было выявлено увеличение количества популяций МСК в раннем посттрансплантационном периоде [8]. Роль CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток в экспансии клеток миелоидного ряда и возможные негативные или позитивные эффекты после ауто-ТГКП нуждаются в дальнейшем изучении.

Заключение

Относительное содержание CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих ГМ-КСФ, было значимо выше у больных ММ в ремиссии в сравнении с донорами. Количество CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток в циркуляции и в КМ не отличалось. Не выявлено различий в содержании CD4⁺GM-CSF⁺ Т-клеток у больных перед ВХ и при восстановлении лейкоцитов после ауто-ТГКП, то есть при цитокин-индуцированной гомеостатической пролиферации зрелых лимфоцитов. Экспансия CD4⁺ Т-клеток, продуцирующих ГМ-КСФ, в ответ на стимуляцию aCD3/CD28 и гомеостатическими цитокинами МНК больных ММ *in vitro* снижена в сравнении с донорами и больными АИЗ.

Благодарности

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 20-75-10132-П.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kumar A., Taghi Khani A., Sanchez Ortiz A., Swaminathan S. GM-CSF: A Double-Edged Sword in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2022; 13:901277. doi:10.3389/fimmu.2022.901277.
2. Lotfi N., Thome R., Rezaei N., Zhang G.X., Rezaei A., Rostami A., Esmaeil N. Roles of GM-CSF in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases: An Update. *Front Immunol.* 2019; 10:1265. doi:10.3389/fimmu.2019.01265.
3. Fairfield H., Falank C., Avery L., Reagan M.R. Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Ann N Y Acad Sci.* 2016; 1364(1):32-51. doi:10.1111/nyas.13038.
4. García-Ortiz A., Rodríguez-García Y., Encinas J., Maroto-Martín E., Castellano E., Teixidó J., Martínez-López J. The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression. *Cancers (Basel).* 2021; 13(2):217. doi:10.3390/cancers13020217.
5. Zhang X.G., Bataille R., Jourdan M., Saeland S., Banchereau J., Mannoni P., Klein B. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synergizes with interleukin-6 in supporting the proliferation of human myeloma cells. *Blood.* 1990; 76(12):2599-2605.
6. Ma N., Liu Q., Hou L., Wang Y., Liu Z. MDSCs are involved in the protumorigenic potentials of GM-CSF in colitis-associated cancer. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2017; 30(2):152-162. doi:10.1177/0394632017711055.
7. Park M.Y., Lim B.G., Kim S.Y., Sohn H.J., Kim S., Kim T.G. GM-CSF Promotes the Expansion and Differentiation of Cord Blood Myeloid-Derived Suppressor Cells, Which Attenuate Xenogeneic Graft-vs.-Host Disease. *Front Immunol.* 2019; 10:183. doi:10.3389/fimmu.2019.00183.
8. Tyrinova T., Batorov E., Aristova T., Ushakova G., Sizikova S., Denisova V., Chernykh E. Decreased circulating myeloid-derived suppressor cell count at the engraftment is one of the risk factors for multiple myeloma relapse after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Heliyon.* 2024; 10(5):e26362. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e26362.

Авторы

Баторов Егор Васильевич

К.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии

ebatorov@mail.ru

Леплина Ольга Юрьевна

Д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии

oleplina@mail.ru

Аристова Татьяна Андреевна

К.м.н., врач-гематолог отделения гематологии с блоком трансплантации костного мозга клиники иммунопатологии

taris06@mail.ru

Денисова Вера Васильевна

К.м.н., заведующий отделением гематологии с блоком трансплантации костного мозга клиники иммунопатологии

verden@bk.ru

Баторова Дарья Сергеевна

К.м.н., врач-гематолог отделения гематологии с блоком трансплантации костного мозга клиники иммунопатологии

sugar1983@mail.ru

Сизикова Светлана Анатольевна

К.м.н., врач-гематолог отделения гематологии с блоком трансплантации костного мозга клиники иммунопатологии

svetlana_sizikova@mail.ru

Ушакова Галина Юрьевна

К.м.н., врач-гематолог отделения гематологии с блоком трансплантации костного мозга клиники иммунопатологии

bmt-novosibirsk@mail.ru

Черных Елена Рэмовна

Д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клеточной иммунотерапии

ct_lab@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

Новосибирск, Российская Федерация

***E.V. Batorov, O.Yu. Leplina, T.A. Aristova, V.V. Denisova, D.S. Batorova,
S.A. Sizikova, G.Yu. Ushakova, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh***

GM-CSF-PRODUCING CD4⁺ T CELLS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

FSBSI «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology»,
Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The paper presents an analysis of the relative content of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing CD4⁺ T-cells in patients with multiple myeloma (MM). *The aim of the study* was to evaluate the content of CD4⁺GM-CSF⁺ T-cells in patients with MM after high-dose chemotherapy (HC) with autologous hematopoietic progenitor cell transplantation (auto-HPCT). *Materials and methods.* The study included 15 patients with MM and 9 matched healthy donors. The content of GM-CSF-producing CD4⁺ T cells were assessed in peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) samples by flow cytometry. *In vitro*, the expansion of CD4⁺GM-CSF⁺ T-cells was studied after stimulation with aCD3/CD28 and a combination

of homeostatic cytokines. **Results.** The relative content of GM-CSF-producing CD4⁺ T-cells was significantly higher in MM patients in remission compared to healthy donors. The number of CD4⁺GM-CSF⁺ T-cells in the circulation and BM did not differ. No differences were found in the content of CD4⁺GM-CSF⁺ T cells in patients before HC and during leukocyte recovery after auto-HPCT, i.e., against the background of cytokine-induced homeostatic proliferation of mature lymphocytes. The expansion of GM-CSF-producing CD4⁺ T-cells in response to stimulation with aCD3/CD28 and homeostatic cytokines of MNCs from MM patients in vitro was reduced compared to healthy donors and patients with autoimmune diseases.

Keywords: regulatory T cells, IL-10, PD-1, TIM-3, multiple myeloma

There is no conflict of interest.

Contact information for the corresponding author:

Egor V. Batorov

ebatorov@mail.ru

Received: 01.09.2024

For citation: Batorov E.V., Leplina O.Yu., Aristova T.A., Denisova V.V., Batorova D.S., Sizikova S.A., Ushakova G.Yu., Ostanin A.A., Chernykh E.R. GM-CSF-producing CD4⁺ T cells in patients with multiple myeloma. [Online] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2024, Vol. 21, no. 3, pp. 253–261. DOI: 10.22138/2500-0918-2024-21-3-253-261 (In Russ)

REFERENCES

1. Kumar A., Taghi Khani A., Sanchez Ortiz A., Swaminathan S. GM-CSF: A Double-Edged Sword in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2022; 13:901277. doi:10.3389/fimmu.2022.901277.
2. Lotfi N., Thome R., Rezaei N., Zhang G.X., Rezaei A., Rostami A., Esmaeil N. Roles of GM-CSF in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases: An Update. *Front Immunol.* 2019; 10:1265. doi:10.3389/fimmu.2019.01265.
3. Fairfield H., Falank C., Avery L., Reagan M.R. Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Ann N Y Acad Sci.* 2016; 1364(1):32-51. doi:10.1111/nyas.13038.
4. García-Ortiz A., Rodríguez-García Y., Encinas J., Maroto-Martín E., Castellano E., Teixidó J., Martínez-López J. The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression. *Cancers (Basel).* 2021; 13(2):217. doi:10.3390/cancers13020217.
5. Zhang X.G., Bataille R., Jourdan M., Saeland S., Banchereau J., Mannoni P., Klein B. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synergizes with interleukin-6 in supporting the proliferation of human myeloma cells. *Blood.* 1990; 76(12):2599-2605.
6. Ma N., Liu Q., Hou L., Wang Y., Liu Z. MDSCs are involved in the protumorigenic potentials of GM-CSF in colitis-associated cancer. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2017; 30(2):152-162. doi:10.1177/0394632017711055.
7. Park M.Y., Lim B.G., Kim S.Y., Sohn H.J., Kim S., Kim T.G. GM-CSF Promotes the Expansion and Differentiation of Cord Blood Myeloid-Derived Suppressor Cells, Which Attenuate Xenogeneic Graft-vs.-Host Disease. *Front Immunol.* 2019; 10:183. doi:10.3389/fimmu.2019.00183.
8. Tyrinova T., Batorov E., Aristova T., Ushakova G., Sizikova S., Denisova V., Chernykh E. Decreased circulating myeloid-derived suppressor cell count at the engraftment is one of the risk factors for multiple myeloma relapse after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Heliyon.* 2024; 10(5):e26362. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e26362.

Authors

Egor V. Batorov

PhD, senior researcher of the laboratory of cellular immunotherapy

ebatorov@mail.ru

Olga Yu. Leplina
DM, Leader Researcher of the Laboratory of Cellular Immunotherapy
oleplina@mail.ru

Tatyana A. Aristova
PhD, hematologist of the Hematology Department with the bone marrow transplantation unit of the Immunopathology Clinic
taris06@mail.ru

Vera V. Denisova
PhD, head of the Hematology Department with the Bone Marrow Transplantation Unit of the Immunopathology Clinic
verden@bk.ru

Darya S. Batorova
PhD, hematologist of the Hematology Department with the bone marrow transplantation unit of the Immunopathology Clinic
sugar1983@mail.ru

Svetlana A. Sizikova
PhD, hematologist of the Hematology Department with the bone marrow transplantation unit of the Immunopathology Clinic
svetlana_sizikova@mail.ru

Galina Y. Ushakova
PhD, hematologist of the Hematology Department with the bone marrow transplantation unit of the Immunopathology Clinic
bmt-novosibirsk@mail.ru

Elena R. Chernykh
DM, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Immunotherapy
ct_lab@mail.ru

Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology» (RIFCI)
Novosibirsk, Russian Federation