

DOI: 10.21294/1814-4861-2023-22-1-43-54

УДК: 616-006.448:612.112.94

Для цитирования: Баторов Е.В., Аристова Т.А., Ушакова Г.Ю., Сизикова С.А., Денисова В.В., Шевела Е.Я., Останин А.А., Черных Е.Р. Экспрессия рецепторов цитокинов с общей γ -цепью как маркеров функциональных фенотипов PD-1- и TIM-3-позитивных Т-клеток при множественной миеломе. Сибирский онкологический журнал. 2023; 22(1): 43–54. – doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-1-43-54

For citation: Batorov E.V., Aristova T.A., Ushakova G.Yu., Sizikova S.A., Denisova V.V., Shevela E.Ya., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Common γ -chain cytokine receptors as functional phenotype markers of PD-1- and TIM-3-positive T cells in multiple myeloma. Siberian Journal of Oncology. 2023; 22(1): 43–54. – doi: 10.21294/1814-4861-2023-22-1-43-54

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНОВ С ОБЩЕЙ γ -ЦЕПЬЮ КАК МАРКЕРОВ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ФЕНОТИПОВ PD-1- И TIM-3-ПОЗИТИВНЫХ Т-КЛЕТОК ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

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

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

Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14. E-mail: ebatorov@mail.ru

Аннотация

Т-клетки, экспрессирующие чек-пойнт рецепторы PD-1, TIM-3 и др., являются потенциальной мишенью для таргетной иммунотерапии при множественной миеломе (ММ), однако включают в себя различные популяции клеток, дисрегуляция которых может приводить к развитию нежелательных реакций. **Целью исследования** явилось изучение маркеров активации, рецепторов гомеостатических цитокинов и транскрипционных факторов, экспрессируемых PD-1- и TIM-3-позитивными Т-клетками у больных ММ на этапе индукционной терапии. **Материал и методы.** Было исследовано относительное содержание циркулирующих PD-1- и/или TIM-3-позитивных и негативных Т-клеток, экспрессирующих рецепторы цитокинов с общей γ -цепью CD25, CD122, CD127, фосфорилированный STAT5 и транскрипционный фактор EOMES, ассоциированный с Т-клеточным истощением, методом проточной цитометрии у 17 здоровых доноров, 22 больных ММ в состоянии ремиссии и 7 больных ММ с прогрессирующим течением. **Результаты.** Пул Т-лимфоцитов, экспрессирующих ингибиторные чек-пойнт рецепторы PD-1 и/или TIM-3, у больных ММ включал в себя: CD25⁺EOMES⁺ активированные клетки, CD4⁺CD25⁺CD127⁺FOXP3⁺ регуляторные Т-клетки (Treg), CD4⁺CD25⁺EOMES⁺ дисфункциональные клетки. CD25⁺ Т-клетки здоровых доноров и больных ММ независимо от экспрессии исследованных чек-пойнт рецепторов были EOMES-негативными. Не выявлено такой ассоциации для рецепторов цитокинов CD122 и CD127. EOMES в большей степени является маркером Т-клеточного истощения для CD4⁺ Т-клеток, но не для CD8⁺ Т-клеток, в которых он более ассоциирован с активацией. Доля CD4⁺ Treg среди циркулирующих PD-1⁺ и TIM-3⁺ Т-клеток была относительно невысока. Более высокое содержание рецепторов цитокинов в популяции TIM-3⁺ Т-клеток может свидетельствовать о преимущественном вовлечении TIM-3 в контроль гомеостатической пролиферации зрелых Т-клеток в условиях лимфопении, в то время как экспрессия PD-1 может быть более ассоциирована с регуляцией активации через Т-клеточный рецептор. Уровни PD-1⁺ и/или TIM-3⁺ активированных, дисфункциональных и регуляторных Т-клеток в перспективе могут быть использованы для прогноза безопасности и эффективности таргетной иммунотерапии.

Ключевые слова: множественная миелома; PD-1; TIM-3; CD25; CD122; EOMES; Т-клеточное истощение, регуляторные Т-клетки.

COMMON γ -CHAIN CYTOKINE RECEPTORS AS FUNCTIONAL PHENOTYPE MARKERS OF PD-1- AND TIM-3-POSITIVE T CELLS IN MULTIPLE MYELOMA

E.V. Batorov, T.A. Aristova, G.Yu. Ushakova, S.A. Sizikova, V.V. Denisova, E.Ya. Shevela, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia
14, Yadrintsevskaya St., 630099, Novosibirsk, Russia. E-mail: ebatorov@mail.ru

Abstract

T cells expressing checkpoint receptors PD-1, TIM-3 etc., are potential targets for monoclonal antibody immunotherapy in multiple myeloma (MM). However, checkpoint expressing T cell compartment includes different subsets, and their dysregulation following anti-checkpoint therapy can lead to the development of adverse events. **The aim of this study** was to evaluate activation markers – homeostatic cytokine receptors and transcription factors expressed by PD-1- and TIM-3-positive T cells. **Material and Methods.** Relative counts of circulating PD-1- and/or TIM-3-positive and negative T cells expressing common γ -chain cytokine receptors CD25, CD122, CD127, phosphorylated STAT5, and transcription factor EOMES associated with T cell exhaustion were studied using flow cytometry in 17 healthy donors, 22 MM patients with remission and 7 MM patients with progressive disease. **Results.** T cells expressing PD-1 and/or TIM-3 inhibitory checkpoint receptors in MM patients consisted of CD25⁺EOMES⁺ activated cells, CD4⁺CD25⁺CD127⁺FOXP3⁺ regulatory T cells (Treg), CD4⁺CD25⁺EOMES⁺ dysfunctional cells. CD25⁺ T cells from healthy donors and MM patients, regardless of the expression of the studied checkpoint receptors, were EOMES-negative. No such association was found for CD122 and CD127 cytokine receptors. EOMES is a marker of T cell exhaustion for CD4⁺ T cells, but not for CD8⁺ T cells, in which it is more associated with activation. The proportion of CD4⁺ Tregs among circulating PD-1⁺ and TIM-3⁺ T cells was relatively low. A higher content of cytokine receptors in the population of TIM-3⁺ T cells may indicate the predominant involvement of TIM-3 in the control of homeostatic proliferation of mature T cells under lymphopenic conditions, while the expression of PD-1 may be more associated with the regulation of activation through T cell receptor. PD-1⁺ and/or TIM-3⁺ levels of activated, dysfunctional, and regulatory T cells can potentially be used to predict the safety and efficacy of targeted immunotherapy.

Key words: multiple myeloma; PD-1; TIM-3; CD25; CD122; EOMES; T cell exhaustion; regulatory T cells.

Введение

Множественная миелома (ММ), второе по распространенности опухолевое заболевание системы крови, остается неизлечимым состоянием, несмотря на разработку и внедрение в практику ингибиторов протеасом и иммуномодулирующих препаратов (леналидомид, помалидомид), а также высокодозной химиотерапии с трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) [1, 2].

Ранее было показано, что при ММ, как и при большинстве других опухолей, повышено содержание Т-клеток, экспрессирующих ингибиторные сигнальные («чек-поинт») рецепторы PD-1, TIM-3 и др. [3–6]. Транзиторная экспрессия чек-поинт рецепторов ассоциирована с активацией Т-клеток, а устойчивая – с Т-клеточным истощением, состоянием дисфункции Т-клеток памяти, возникающим при длительной антигенной стимуляции [7]. Контакт экспрессированных на опухолевых и стромальных клетках и растворимых чек-поинт лигандов (PD-L1/PD-L2 для PD-1, галектин-9 для TIM-3 и т.д.) с «истощенными» Т-клетками приводит к значительному ослаблению функциональной активности последних. Состояние Т-клеточного

истощения обратимо на ранних этапах, блокада чек-поинт молекул моноклональными антителами предотвращает ускользание опухоли из-под иммунного надзора [7, 8].

Попытки использования моноклональных антител (ингибиторов чек-поинт рецептора PD-1), эффективных при ряде солидных опухолей и лимфоме Ходжкина, при ММ сопровождались снижением показателей выживаемости вследствие частого развития нежелательных явлений и низкой частоты объективного ответа на терапию [9, 10]. Неудовлетворительный ответ на таргетную анти-PD-1 терапию при ММ и большинстве неходжкинских лимфом может быть связан не с восстановлением функции истощенных Т-клеток, а с нарушением регулирования активированных Т-клеток, например, вирус-специфических или аутореактивных популяций, а также регуляторных Т-клеток (Treg). Ранее была показана возможность экспрессии PD-1 и TIM-3 эффекторными Т-клетками при стимуляции цитокинами с общей γ -цепью (IL-2, IL-7, IL-15, IL-21) *in vitro* и в процессе гомеостатической пролиферации *in vivo* [11–13], блокада ингибиторами чек-поинт молекул также может приводить к нарушению регуляции пролиферирующих Т-клеток

с последующим развитием аутоиммунных нежелательных реакций. Также могут отличаться свойства Т-клеток, экспрессирующих разные ингибиторные сигнальные молекулы; по-видимому, TIM-3⁺ и особенно PD-1⁺TIM-3⁺Т-клетки относятся к более «истощенным» по сравнению с PD-1⁺, в значительной мере сохраняющим цитотоксический и цитокин-продуцирующий потенциал [6]. Изучение дополнительных фенотипических маркеров функционального состояния Т-клеток, экспрессирующих чек-пойнт рецепторы, вероятно, позволит прогнозировать развитие иммуноопосредованных побочных реакций таргетной иммунотерапии.

Целью исследования явилось изучение маркеров активации, рецепторов гомеостатических цитокинов и транскрипционных факторов, экспрессируемых PD-1- и TIM-3-позитивными Т-клетками.

Материал и методы

В исследование включено 29 больных ММ (таблица), находившихся на стационарном лечении в отделении гематологии с февраля 2021 г. по апрель 2022 г. Данным пациентам ранее не проводили высокодозную химиотерапию с ауто-ТГСК. В качестве группы сравнения было обследовано 17 здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту. Исследования проводились после получения от всех участников письменного информированного

согласия и были одобрены решением локального этического комитета НИИФКИ. Набор образцов периферической крови (ПК) проводили перед очередным курсом химиотерапии при абсолютном содержании лейкоцитов более $1 \times 10^9/\text{л}$.

Лизис эритроцитов проводили раствором VersaLyse («Beckman Coulter», Франция) в соответствии с инструкцией. Методом проточной цитометрии оценивали относительное содержание субпопуляций Т-клеток, позитивных по одному из ингибиторных сигнальных рецепторов (PD-1 или TIM-3) – PD-1⁺TIM-3⁻ и TIM-3⁺PD-1⁻, а также двойных позитивных PD-1⁺TIM-3⁺ клеток в пуле CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, используя анти-CD3 (FITC, PerCP), анти-CD8 (FITC, PE-Cy7), анти-CD4 (FITC, PerCP), анти-PD-1 (APC), анти-TIM-3 (PE, PerCP/Cy 5.5, BV421) моноклональные антитела («BD Biosciences», «Biolegend», США). В каждой из PD-1- и/или TIM-3-позитивных субпопуляций, а также в CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, не экспрессирующих ингибиторные сигнальные рецепторы PD-1 и TIM-3 (PD-1⁻TIM-3⁻), оценивали относительное содержание клеток, экспрессирующих рецепторы гомеостатических цитокинов/поверхностных маркеров активации: CD25 (PE), CD122 (BV510), CD127 (Alexa Fluor 647). Также проведена оценка внутриклеточного содержания фосфорилированного преобразователя сигнала и активатора транскрипции 5 (STAT5, signal transducer and

Таблица/Table

Характеристика пациентов Patient characteristics

Показатель/Characteristics	Значение/Value
Возраст, годы; медиана (мин-макс)/Age, years; median (min-max)	57 (37–64)
Пол, женщины/мужчины/Gender, female/male	17/12
Стадия по Durie–Salmon/Durie–Salmon stage	
II	11
III	18
Вариант/Types	
IgG	18
IgA	7
Бенс–Джонса/Bence Jones	3
Нет данных/Not available	1
Ответ на терапию на момент исследования/Disease status at the time of the study	
Полная ремиссия, очень хороший частичный ответ/ Complete remission, very good partial response	8
Частичный ответ/Partial remission	14
Минимальный ответ, рецидивирующая/рефрактерная множественная миелома/ Minimal response, relapsed/refractory multiple myeloma	7
Количество режимов химиотерапии перед исследованием/ Chemotherapy regimens before the analysis	
1 (бортезомиб-содержащие режимы)/ 1 (bortezomib-based regimens)	6
2 (+ леналидомид-содержащие режимы или DCEP/EDAP/ 2 (+ lenalidomide-containing regimens or DCEP/EDAP)	17
≥3 (+ леналидомид-содержащие режимы + DCEP/EDAP/ ≥3 (+ lenalidomide-containing regimens + DCEP/EDAP)	6

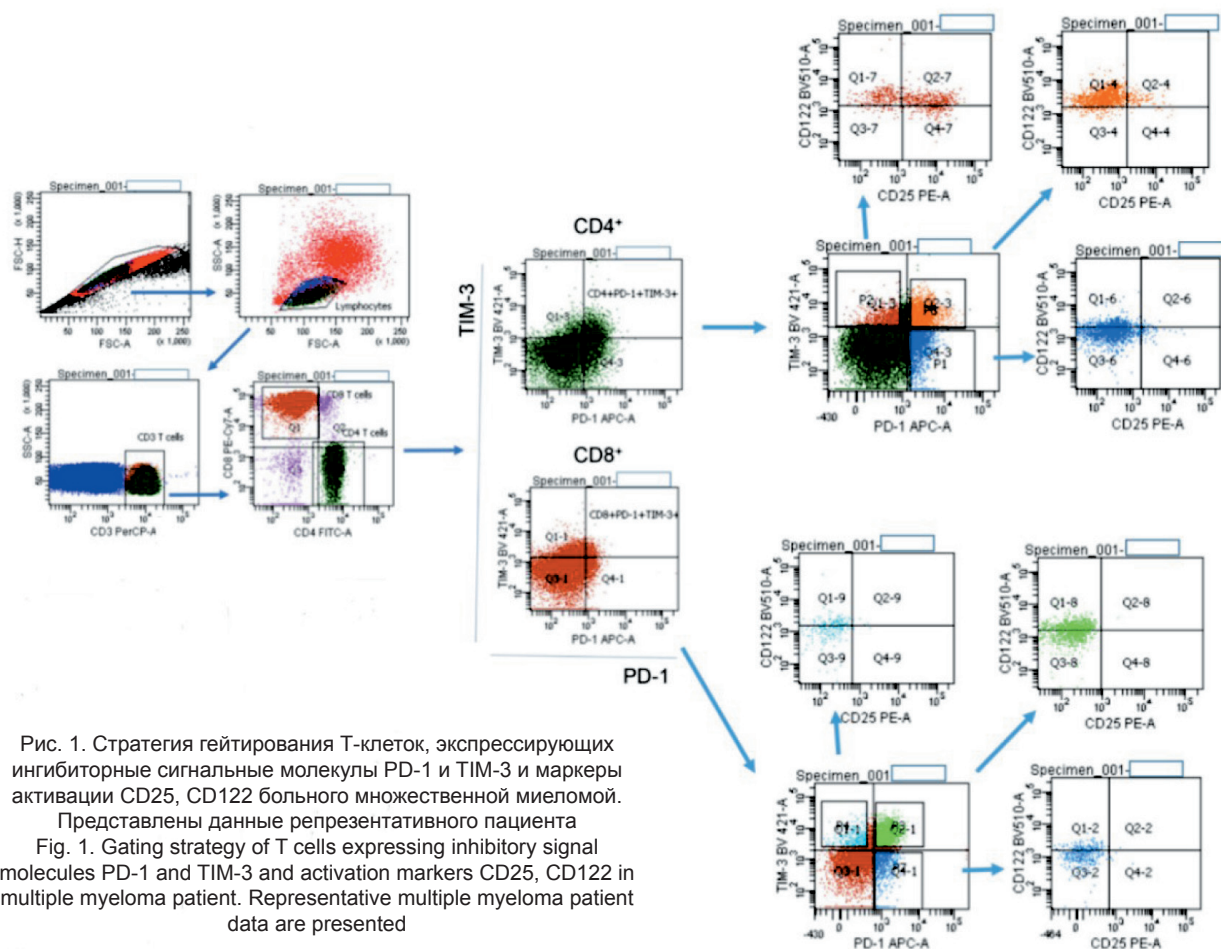
activator of transcription 5), транскрипционных факторов EOMES и FOXP3 (анти-pSTAT5 (PE, BD Biosciences), анти-EOMES (PE, Invitrogen), анти-FOXP3 (PerCP-Cy 5.5, BD Biosciences) соответственно). Для изучения pSTAT5 10^6 мононуклеарных клеток (МНК) активировали в течение 15 мин с интерлейкином-2 (IL-2; «Ронколейкин®», «БИОТЕХ НПК», Россия; конечная концентрация 100 нг/мл суспензии клеток), после чего обрабатывали рекомендуемым фиксирующим раствором BD Fix Buffer I и пермеабилizировали ледяным раствором BD Perm Buffer III (содержит 87,68 % метанол) при -20°C на льду в соответствии с инструкцией. Фиксацию и пермеабилзацию МНК для оценки внутриклеточной экспрессии EOMES и FOXP3 проводили после инкубации клеток с моноклональными антителами против поверхностных антигенов; использовали набор растворов для фиксации/пермеабилзации Transcription Factor Buffer Set («BD Biosciences»). В качестве контролей были использованы набор контрольных частиц BD™ CompBeads Anti-mouse Ig, κ/Negative Control Compensation Particles Set, немеченные МНК, оценка флюоресценции всех маркеров, кроме одного («fluorescence-minus-one»). Содержание погибших клеток оценивали по включению 7-AAD. Исследование проводили по общепринятой методике с использованием параметров прямого и бокового

светорассеяния и флюоресценции на проточном цитометре FACS Canto II (BD Biosciences). Анализ проводили после накопления 5×10^4 – 10^5 событий в регионе $\text{CD}8^+$ Т-клеток. Стратегия гейтирования представлена на рис. 1.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft). Для оценки значимости различий между независимыми группами использовали U-критерий Манна–Уитни. Для оценки значимости различий зависимых выборок использовали критерий Вилкоксона для парных выборок. Данные в тексте и таблицах представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона, если не указано другого. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ (двустороннем).

Результаты

Относительное содержание PD-1- и TIM-3-позитивных субпопуляций Т-клеток представлено на рис. 2. Количество $\text{CD}4^+\text{PD-1}^+\text{TIM-3}^+$ и $\text{CD}8^+\text{PD-1}^+\text{TIM-3}^+$ Т-клеток ПК было выше у больных ММ в ремиссии по сравнению со здоровыми донорами. Содержание исследуемых популяций было выше у больных с прогрессирующим течением по сравнению как с донорами, так и с пациентами в состоянии ремиссии (кроме $\text{CD}4^+\text{TIM-3}^+$ и $\text{CD}8^+\text{TIM-3}^+$ Т-клеток).



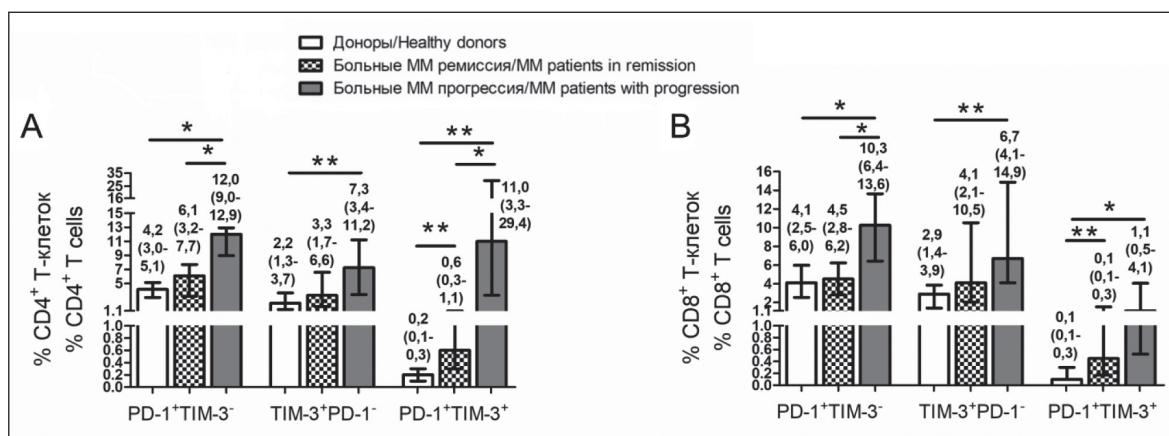


Рис. 2. Относительное содержание PD-1⁺ и TIM-3⁺ субпопуляций Т-клеток периферической крови здоровых доноров и больных множественной миеломой. Представлено относительное количество PD-1⁺TIM-3⁻, TIM-3⁺PD-1⁻ и PD-1⁺TIM-3⁺ CD4⁺ (А) и CD8⁺ (В) Т-клеток в ПК здоровых доноров (n=17), больных ММ в состоянии ремиссии (n=22) и с прогрессирующим течением (n=7).

Значимость различий: * – $p_u < 0,05$, ** – $p_u < 0,005$ по U-критерию Манна-Уитни

Fig. 2. Relative counts of PD-1⁺ and TIM-3⁺ T cell subsets in peripheral blood of healthy donors and multiple myeloma patients. Relative counts of PD-1⁺TIM-3⁻, TIM-3⁺PD-1⁻, PD-1⁺TIM-3⁺ CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T cells in peripheral blood of healthy donors (n=17), MM patients in remission (n=22) and with progressive disease (n=7) are presented. P-values are assessed with Mann-Whitney U-test.

* – $p_u < 0,05$, ** – $p_u < 0,005$

Для оценки функционального потенциала проведено сравнительное исследование экспрессии рецепторов цитокинов/маркеров активации CD25, CD122, CD127 четырьмя популяциями Т-клеток, различающихся по экспрессии ингибиторных рецепторов PD-1 и TIM-3 – PD-1⁺TIM-3⁻, PD-1⁺TIM-3⁺, TIM-3⁺PD-1⁻, PD-1⁺TIM-3⁺, в образцах ПК здоровых доноров, больных ММ в состоянии ремиссии и у пациентов с прогрессией болезни.

У здоровых доноров PD-1- и TIM-3-позитивные популяции CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток отличались более высокой долей CD122⁺ клеток по сравнению с PD-1⁺TIM-3⁻ клетками. Среди CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁺ клеток было выше относительное количество CD25⁺ и CD122⁺ клеток по сравнению с PD-1⁺ и TIM-3⁺ популяциями (рис. 3А). Доля CD122⁺ клеток была выше среди TIM-3⁺ и PD-1⁺TIM-3⁺ CD8⁺ Т-клеток по сравнению с PD-1⁺TIM-3⁻ и PD-1⁺ популяциями (рис. 3В).

Различия между Т-клетками, изолированно экспрессирующими PD-1 или TIM-3, были более выражены у больных ММ в ремиссии заболевания. Большее относительное количество TIM-3⁺ и PD-1⁺TIM-3⁺ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток экспрессировали рецепторы цитокинов с общей γ -цепью CD25, CD122, CD127 по сравнению с PD-1⁺TIM-3⁻ и PD-1⁺ Т-клетками, при этом среди PD-1⁺ Т-клеток доля CD25⁺ и CD127⁺ клеток была значимо ниже по сравнению с PD-1⁺TIM-3⁻ клетками (рис. 3С-Д).

У больных ММ с прогрессированием болезни не было различий по экспрессии рецепторов гомеостатических цитокинов между PD-1⁺TIM-3⁻ и PD-1⁺ CD4⁺ клетками. Доля CD25⁺ клеток была значимо выше в субпопуляциях TIM-3⁺ и PD-1⁺TIM-3⁺ CD4⁺ Т-клеток, а CD122⁺ клеток – в PD-1⁺TIM-3⁺ CD4⁺ Т-клетках по сравнению с PD-1⁺ CD4⁺ Т-клетками (рис. 3Е). В пуле CD8⁺TIM-3⁺ Т-клеток было выше

содержание CD25⁺ клеток по сравнению с PD-1⁺ популяцией, и CD122⁺ клеток – по сравнению с PD-1⁺TIM-3⁻ клетками (рис. 3F).

По сравнению со здоровыми донорами у больных ММ в ремиссии повышено содержание CD25⁺ клеток в пуле CD4⁺TIM-3⁺ Т-клеток ($p_u = 0,039$). У больных с прогрессирующим течением была выше доля CD122⁺ клеток среди CD4⁺PD-1⁺ и CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁺ Т-клеток по сравнению со здоровыми донорами ($p_u = 0,012$ и $p_u = 0,0061$ соответственно) и больными ММ в ремиссии ($p_u = 0,032$ и $p_u = 0,013$ соответственно). У больных ММ с прогрессированием заболевания повышено содержание CD122⁺ клеток в пуле CD8⁺PD-1⁺ Т-клеток по сравнению со здоровыми донорами и больными в ремиссии ($p_u = 0,047$ и $p_u = 0,015$ соответственно) и среди CD8⁺TIM-3⁺ Т-клеток по сравнению с больными в ремиссии ($p_u = 0,049$). У больных ММ в ремиссии и с прогрессирующим течением было значимо меньшее количество CD127⁺ CD8⁺PD-1⁺ клеток по сравнению с донорами ($p_u = 0,0025$ и $p_u = 0,045$ соответственно). Эффекты гомеостатических цитокинов, передаваемые через рецепторы с общей γ -цепью (CD25, CD122, CD127, CD132), реализуются посредством активации-фосфорилирования STAT5 [14]. Состояние Т-клеточного истощения и в ряде случаев активации ассоциировано с транскрипционным фактором EOMES [15–17]. Была проведена оценка внутриклеточного содержания фосфорилированного STAT5 (pSTAT5) и EOMES в PD-1⁺TIM-3⁻, PD-1⁺, TIM-3⁺, PD-1⁺TIM-3⁺ Т-клетках. CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки доноров и больных ММ сохраняли способность продуцировать pSTAT5 независимо от экспрессии PD-1 и TIM-3 (рис. 4). Значимое снижение pSTAT5⁺ клеток отмечено только среди CD4⁺TIM-3⁺ субпопуляции по сравнению с PD-1⁺TIM-3⁻ и PD-1⁺ CD4⁺ Т-клетками (рис. 4С).

У здоровых доноров и у больных ММ большинство PD-1- и TIM-3-позитивных популяций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток отличалось более высокой долей EOMES⁺ клеток по сравнению с PD-1⁻TIM-3⁻ популяцией (рис. 4). При этом CD4⁺ Т-клетки, не экспрессировавшие PD-1 и TIM-3, у доноров и больных в ремиссии содержали незначительное количество EOMES⁺ клеток (5,4 и 4,6 % по медианам, соответственно), в то время как среди CD8⁺PD-1⁻TIM-3⁻ Т-клеток содержание EOMES⁺ популяции составляло 27,9 и 39,4 % для доноров и больных в ремиссии соответственно. Это может свидетель-

ствовать о разных функциях данного транскрипционного фактора в CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках.

Относительное содержание EOMES⁺ CD8⁺TIM-3⁺ клеток у доноров было значимо ниже по сравнению с CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ клетками (рис. 4B); количество EOMES⁺ CD8⁺TIM-3⁺ клеток у больных ММ независимо от течения болезни было значимо ниже по сравнению с CD8⁺PD-1⁺ и CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺ клетками (рис. 4D, F).

У больных ММ с прогрессирующим течением было значимо выше количество EOMES⁺ клеток в популяции CD4⁺ Т-лимфоцитов независимо от

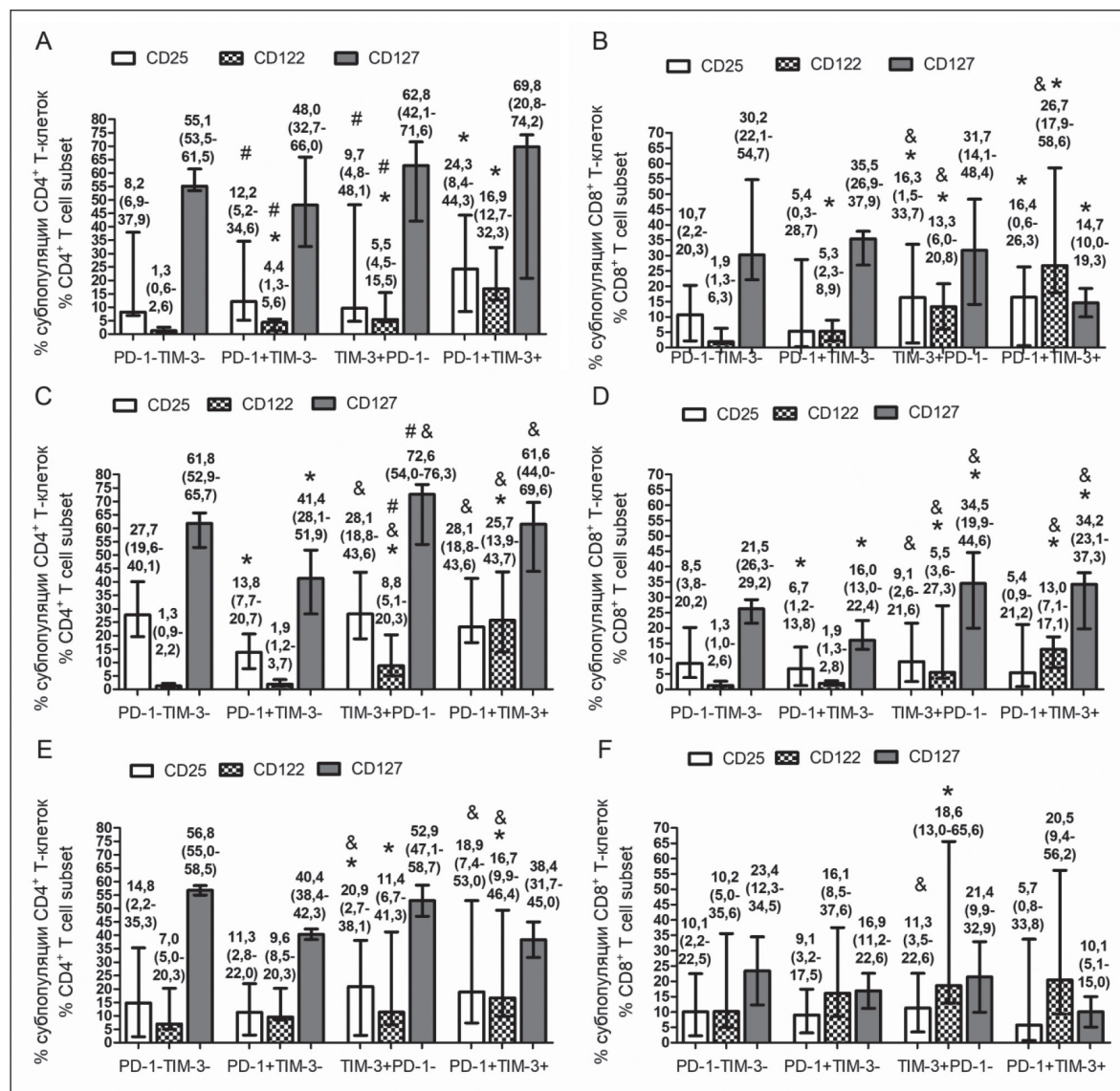


Рис. 3. Доля клеток, экспрессирующих рецепторы цитокинов CD25, CD122, CD127, в PD-1- и TIM-3-позитивных и негативных субпопуляциях Т-клеток периферической крови здоровых доноров и больных множественной миеломой. Представлено относительное количество CD25⁺, CD122⁺, CD127⁺ клеток среди PD-1- и TIM-3-позитивных и негативных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в ПК здоровых доноров (n=17) (A, B), больных ММ в состоянии ремиссии (n=19) (C, D) и с прогрессирующим течением (n=7) (E, F).

Значимость различий p<0,05 по критерию Вилкоксона для парных выборок:

* – по сравнению с PD-1⁺TIM-3⁻ клетками; # – по сравнению с PD-1⁺TIM-3⁺ клетками; & – по сравнению с PD-1⁺TIM-3⁺ клетками

Fig. 3. Frequencies of cells expressing cytokine receptors CD25, CD122, CD127 in PD-1- and TIM-3-positive and negative T cell subsets in peripheral blood of healthy donors and multiple myeloma patients. Relative counts of CD25⁺, CD122⁺, CD127⁺ cells in PD-1- and TIM-3-positive and negative CD4⁺ and CD8⁺ T cells in peripheral blood of healthy donors (n=17) (A, B), MM patients in remission (n=19) (C, D) and with progressive disease (n=7) (E, F) are presented. P-values are assessed with Wilcoxon matched pairs test:

* – p<0.05 comparing with PD-1⁺TIM-3⁻ cells; # – p<0.05 comparing with PD-1⁺TIM-3⁺ cells; & – p<0.05 comparing with PD-1⁺TIM-3⁺ cells

экспрессии PD-1 и TIM-3 по сравнению с донорами ($p_u < 0,05$ для всех исследованных субпопуляций).

Интересно, что все $CD25^+$ Т-клетки здоровых доноров и больных ММ, являясь $pSTAT5^+$, независимо от экспрессии исследованных чек-пойнт рецепторов были EOMES-негативными (рис. 5). Ранее такой закономерности не описано. Не выявлено такой ассоциации для рецепторов цитокинов CD122 и CD127.

Регуляторные Т-клетки, обладающие супрессорной активностью, также могут экспрессировать чек-пойнт рецепторы PD-1 и TIM-3. Относительное содержание циркулирующих $CD4^+CD25^{hi}CD127^+FOXP3^+$ Трег составило 1,5 % (1,3–1,9 %), 1,9 % (1,4–2,2 %), 3,5 % (1,3–5,9 %) у здоровых доноров, больных ММ в ремиссии и больных ММ с прогрессированием болезни соответственно.

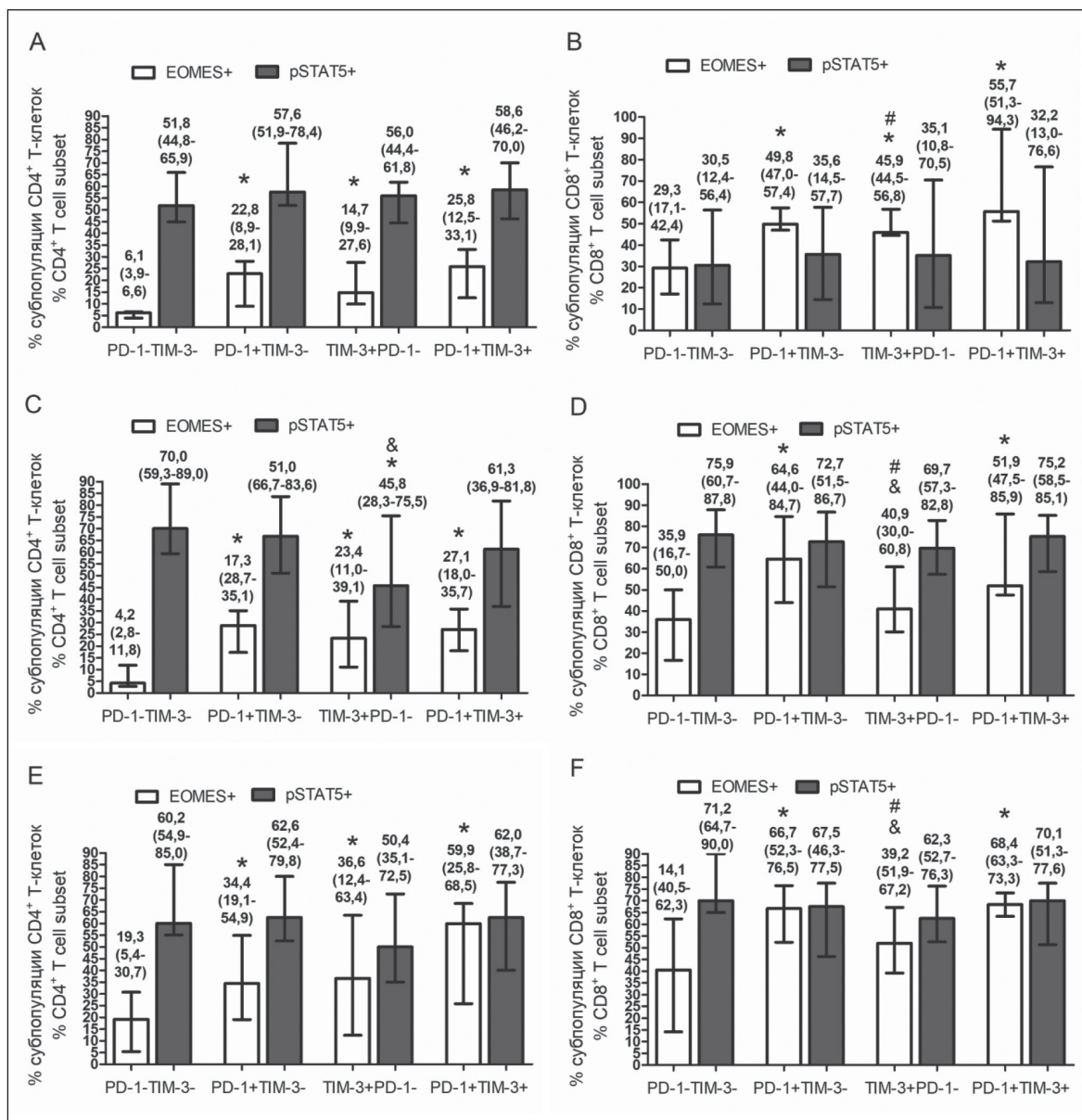


Рис. 4. Доля клеток, внутриклеточно экспрессирующих pSTAT5 и EOMES, в PD-1- и TIM-3-позитивных и негативных субпопуляциях Т-клеток периферической крови здоровых доноров и больных множественной миеломой. Представлено относительное количество EOMES+ и pSTAT5+ клеток среди PD-1- и TIM-3-позитивных и негативных CD4+ и CD8+ Т-клеток в ПК здоровых доноров (n=10) (А, В) больных ММ в состоянии ремиссии (n=9) (С, D) и с прогрессирующим течением (n=6) (Е, F). Значимость различий $p < 0,05$ по критерию Вилкоксона для парных выборок:

* – по сравнению с PD-1-TIM-3- клетками; # – по сравнению с PD-1+TIM-3+ клетками; & – по сравнению с PD-1+TIM-3- клетками

Fig. 4. Frequencies of cells with intracellular expression pSTAT5 and EOMES in PD-1- and TIM-3-positive and negative T cell subsets in peripheral blood of healthy donors and multiple myeloma patients. Relative counts of EOMES+ and pSTAT5+ cells in PD-1- and TIM-3-positive and negative CD4+ and CD8+ T cells in peripheral blood of healthy donors (n=10) (A, B), MM patients in remission (n=9) (C, D) and with progressive disease (n=6) (E, F) are presented.

P-values are assessed with Wilcoxon matched pairs test: * – $p < 0.05$ comparing with PD-1-TIM-3- cells; # – $p < 0.05$ comparing with PD-1+TIM-3+ cells; & – $p < 0.05$ comparing with PD-1+TIM-3- cells

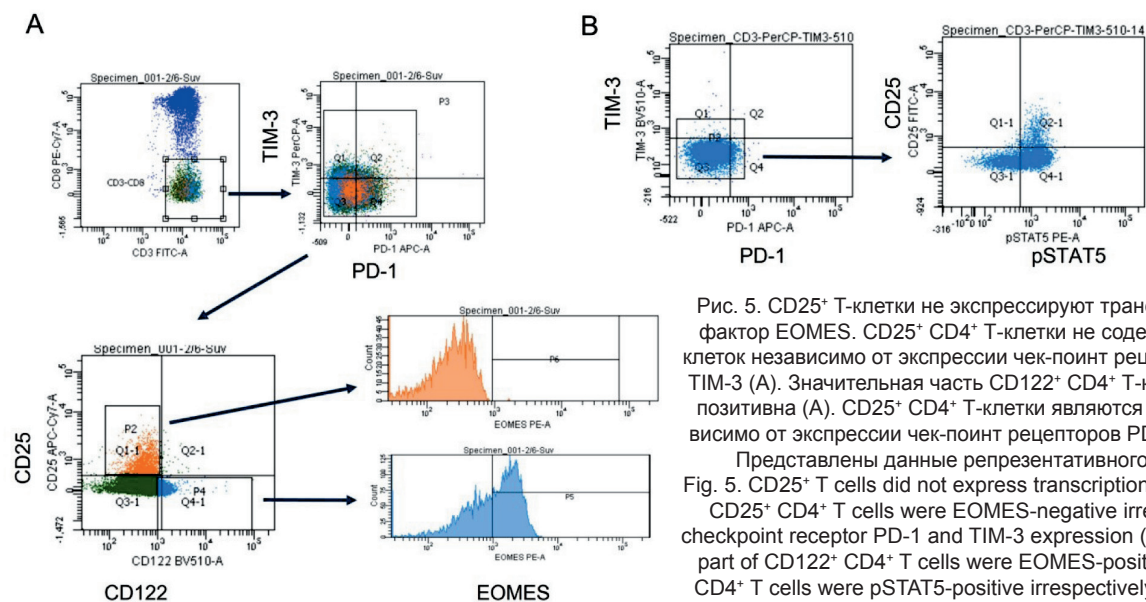


Рис. 5. CD25⁺ Т-клетки не экспрессируют транскрипционный фактор EOMES. CD25⁺ CD4⁺ Т-клетки не содержат EOMES⁺ клеток независимо от экспрессии чек-пойнт рецепторов PD-1 и TIM-3 (А). Значительная часть CD122⁺ CD4⁺ Т-клеток EOMES-позитивна (А). CD25⁺ CD4⁺ Т-клетки являются pSTAT5⁺ независимо от экспрессии чек-пойнт рецепторов PD-1 и TIM-3 (В).

Представлены данные репрезентативного пациента Fig. 5. CD25⁺ T cells did not express transcription factor EOMES. CD25⁺ CD4⁺ T cells were EOMES-negative irrespectively of checkpoint receptor PD-1 and TIM-3 expression (A). A substantial part of CD122⁺ CD4⁺ T cells were EOMES-positive (A). CD25⁺ CD4⁺ T cells were pSTAT5⁺ irrespectively of checkpoint receptor PD-1 and TIM-3 expression (B). Representative multiple myeloma patient data are presented

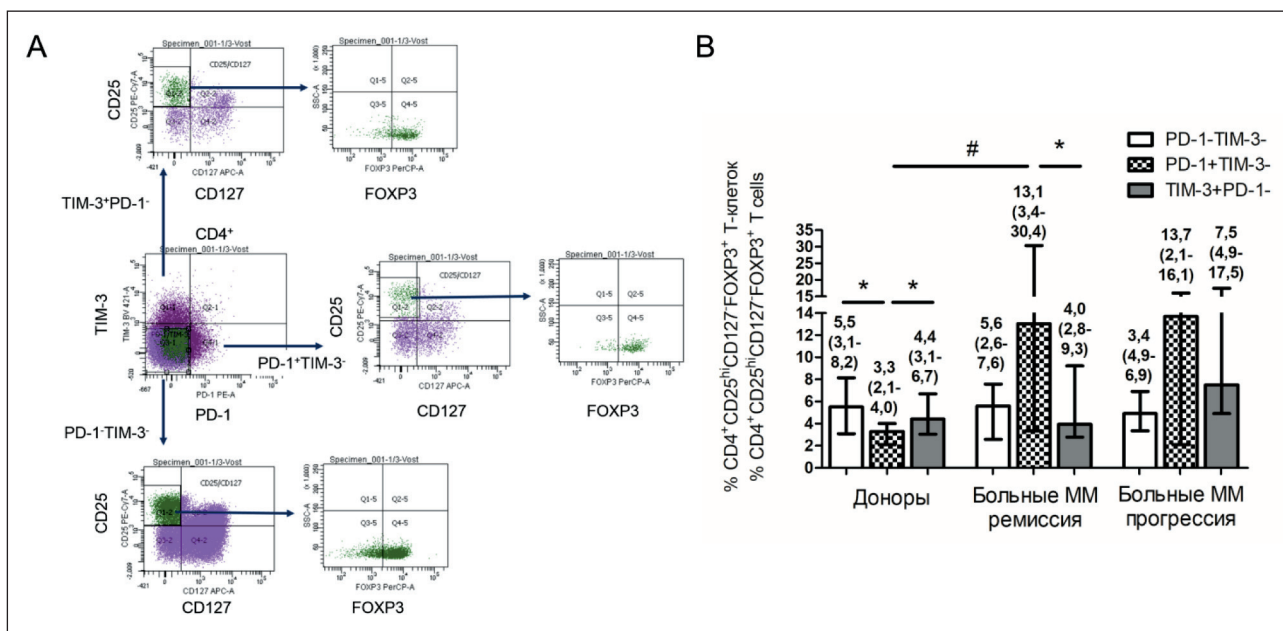


Рис. 6. Доля CD4⁺CD25^{hi}CD127⁺FOXP3⁺ регуляторных Т-клеток в PD-1- и TIM-3-позитивных и негативных субпопуляциях Т-клеток периферической крови здоровых доноров и больных множественной миеломой. Представлены (А) стратегия гейтирования репрезентативного пациента и (В) относительное количество CD4⁺CD25^{hi}CD127⁺FOXP3⁺ Трег среди CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁺, CD4⁺PD-1⁺, CD4⁺TIM-3⁺ Т-клеток в ПК здоровых доноров (n=12), больных ММ в состоянии ремиссии (n=11) и с прогрессирующим течением (n=6). Значимость различий: * – p<0,05 по критерию Вилкоксона для парных выборок; # – p<0,05 по U-критерию Манна-Уитни

Fig. 6. Frequencies of CD4⁺CD25^{hi}CD127⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in PD-1- and TIM-3-positive and negative T cell subsets in peripheral blood of healthy donors and multiple myeloma patients. Gating strategy (A) and relative counts of CD4⁺CD25^{hi}CD127⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁺, CD4⁺PD-1⁺, CD4⁺TIM-3⁺ T cells in peripheral blood of healthy donors (n=12), MM patients in remission (n=11) and with progressive disease (n=6) are presented. P-values are assessed with Wilcoxon matched pairs test (* – p<0.05) and with Mann-Whitney U-test (# – p<0.05)

Содержание Трег среди CD4⁺PD-1⁺ Т-клеток было значимо выше у больных ММ в ремиссии по сравнению со здоровыми донорами. Относительное количество Трег в пуле CD4⁺TIM-3⁺ Т-клеток не отличалось от CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁺ популяции у здоровых доноров и больных ММ, а также между донорами и больными ММ (рис. 6).

Обсуждение

Клинические испытания анти-PD-1 моноклональных антител при рецидивирующей/рефрактерной ММ были прерваны в связи с тяжелыми побочными реакциями и снижением показателей выживаемости [9, 10]. Неудовлетворительный ответ на таргетную иммунотерапию может быть

следствием чрезмерной активации PD-1⁺ Т-клеток, пул которых включает в себя истощенные, активированные, пролиферирующие под влиянием цитокинов с общей γ -цепью эффекторные Т-клетки, а также Трег [13, 18]. В этой связи представляется важным поиск доступных маркеров функционального состояния Т-клеток с фенотипом активированных/истощенных. Настоящая работа посвящена сравнительной характеристике циркулирующих PD-1- и TIM-3-позитивных Т-клеток, экспрессирующих рецепторы цитокинов с общей γ -цепью, у здоровых лиц и у больных ММ. В представленном исследовании, как и в большинстве более ранних работ, показано увеличение Т-клеток, экспрессирующих чек-пойнт рецепторы, при ММ; неблагоприятное течение заболевания ассоциировано с увеличением экспрессии чек-пойнт молекул [3–6].

По сравнению с донорами и больными ММ в ремиссии у больных ММ с прогрессирующим течением увеличено содержание CD8⁺PD-1⁺ и CD8⁺TIM-3⁺ Т-клеток, экспрессирующих CD122, β -цепь рецептора IL-2 и IL-15. CD8⁺CD122⁺ Т-клетки человека, как правило, относят к активированным клеткам памяти и, реже, к CD8⁺ регуляторным Т-клеткам [19–22]. В мышинной модели CD8⁺PD-1⁺CD122⁺ продуцировали IL-10 и предотвращали отторжение аллотрансплантата [23, 24]. Значение экспрессии PD-1 и TIM-3 этой субпопуляцией у человека в норме и при патологии неизвестно и требует дальнейшего изучения.

Часть PD-1⁺ и TIM-3⁺ Т-клеток экспрессировали CD25, высокоаффинную α -цепь рецептора IL-2. Увеличение экспрессии CD25 контролируется pSTAT5 и наблюдается при активации Т-лимфоцитов через Т-клеточный рецептор и при гомеостатической пролиферации. Нами впервые показано, что CD25⁺ Т-клетки здоровых доноров и больных ММ не экспрессировали транскрипционный фактор EOMES, ассоциируемый с Т-клеточным истощением и терминальной активацией [15–17]. Для других рецепторов гомеостатических цитокинов такой связи выявлено не было. Таким образом, CD25 может заменить внутриклеточное определение EOMES для оценки функционального состояния Т-клеток. Вероятнее всего, коэкспрессия CD25 и чек-пойнт рецепторов могут быть индикатором активированных (неистощенных) и/или пролиферирующих в условиях лимфопении Т-клеток, учитывая выявленную сохранную способность PD-1⁺ и TIM-3⁺ Т-клеток фосфорилировать STAT5 при кратковременной стимуляции IL-2, а также маркером активированных CD4⁺CD25⁺CD127⁺FOXP3⁺ естественных регуляторных Т-клеток.

В нашем исследовании относительно небольшая часть TIM-3⁺ и несколько большая PD-1⁺ CD4⁺CD25⁺ Т-клеток больных ММ были идентифицированы как CD4⁺CD25^{hi}CD127⁺FOXP3⁺ Трег. Увеличение PD-1- и/или TIM-3-экспрессирующих

Трег описано в моделях опухолей и при различных онкологических заболеваниях, в большинстве исследований отмечается выраженный супрессорный потенциал PD-1⁺/TIM-3⁺ Трег [25–28]. Клиническое значение этих Трег, равно как и последствия анти-PD-1 блокады, остаются предметом дискуссий.

Нужно отметить, что ценность определения EOMES как маркера истощения в пуле CD8⁺ Т-клеток, по-видимому, снижена, так как и у здоровых доноров, и у больных ММ значительная часть PD-1/TIM-3-негативных CD8⁺ Т-клеток, в отличие от CD4⁺ Т-клеток, была EOMES⁺. В литературе также есть указания на то, что для CD8⁺ Т-клеток экспрессия EOMES ассоциирована как с активацией [29, 30], так и с терминальным Т-клеточным истощением, характеризующимся выраженным снижением функциональной активности и отсутствием ответа на анти-PD-1 таргетную терапию [16, 31].

Т-клетки, экспрессирующие TIM-3 (TIM-3⁺PD-1⁺ и PD-1⁺TIM-3⁺), отличались более высокой долей CD25⁺ и CD122⁺ клеток по сравнению с PD-1⁺ популяцией Т-клеток. Более высокое содержание рецепторов гомеостатических цитокинов в популяции TIM-3⁺ Т-клеток может говорить о преимущественном вовлечении этой ингибиторной молекулы в контроль гомеостатической пролиферации зрелых Т-клеток в условиях лимфопении, в то время как молекула PD-1 может быть более ассоциирована с регуляцией активации через Т-клеточный рецептор. Ранее нами были описаны различия в функциональной активности между PD-1⁺ и TIM-3⁺ (включая PD-1⁺TIM-3⁺) Т-клетками при ММ; значительная часть CD8⁺PD-1⁺ и CD4⁺PD-1⁺ Т-клеток обладала выраженным цитотоксическим и цитокин-продуцирующим потенциалом, не отличаясь от PD-1-негативного компартмента либо превосходя его, в то время как TIM-3⁺ и PD-1⁺TIM-3⁺ Т-клетки были более ассоциированы с состоянием Т-клеточного истощения [6].

Выявленные различия подчеркивают неоднородность пула Т-клеток, относимых к дисфункциональным и «истощенным», экспрессирующих разные чек-пойнт рецепторы и их комбинации. Ограничением настоящего этапа исследований является небольшое число наблюдений пациентов с прогрессирующим течением заболевания. Тем не менее изучение экспрессии маркеров активации Т-клеток позволяет точнее определить степень Т-клеточной дисфункции при ММ и в перспективе может быть использовано для прогноза безопасности и эффективности таргетной иммунотерапии.

Заключение

Пул Т-лимфоцитов, экспрессирующих ингибиторные чек-пойнт рецепторы PD-1 и/или TIM-3, у больных ММ включает в себя: CD25⁺EOMES⁺ активированные клетки (содержание выше в популяции TIM-3⁺ Т-клеток по сравнению с PD-1⁺),

CD4⁺CD25⁺CD127⁺FOXP3⁺ регуляторные Т-клетки (PD-1⁺TIM-3⁺), по-видимому, CD8⁺CD122⁺ регуляторные Т-клетки, CD4⁺CD25⁺EOMES⁺ дисфункциональные клетки. Оценка поверхностной экспрессии CD25 может заменить определение внутриклеточного содержания транскрипционного фактора EOMES. EOMES в большей степени маркер истощения для CD4⁺ Т-клеток, но не для CD8⁺ Т-клеток, в которых он более ассоциирован с активацией. Доля CD4⁺ Трег среди циркулирующих PD-1⁺ и TIM-3⁺ Т-клеток невысока. Функциональные свойства PD-1⁺ и TIM-3⁺CD8⁺CD122⁺ Т-клеток требуют дальнейшего изучения. Более

высокое содержание рецепторов цитокинов в популяции TIM-3⁺ Т-клеток может свидетельствовать о преимущественном вовлечении рецептора TIM-3 в контроль гомеостатической пролиферации зрелых Т-клеток в условиях лимфопении, в то время как экспрессия молекулы PD-1 может быть более ассоциирована с регуляцией активации через Т-клеточный рецептор. Уровни PD-1⁺ и/или TIM-3⁺ активированных, дисфункциональных и регуляторных Т-клеток могут быть использованы для прогноза безопасности и эффективности таргетной иммунотерапии.

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. Cowan A.J., Green D.J., Kwok M., Lee S., Coffey D.G., Holmberg L.A., Tuzan S., Gopal A.K., Libby E.N. Diagnosis and Management of Multiple Myeloma: A Review. *JAMA.* 2022; 327(5): 464–77. doi: 10.1001/jama.2022.0003.
3. Zelle-Rieser C., Thangavadivel S., Biedermann R., Brunner A., Stoitzner P., Willenbacher E., Greil R., Jöhner K. 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.
4. Tan J., Chen S., Huang J., Chen Y., Yang L., Wang C., Zhong J., Lu Y., Wang L., Zhu K., Li Y. 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): 266–74. doi: 10.1111/ajco.13033.
5. Görgün G., Samur M.K., Cowens K.B., Paula S., Bianchi G., Anderson J.E., White R.E., Singh A., Ohguchi H., Suzuki R., Kikuchi S., Harada T., Hideshima T., Tai Y.T., Laubach J.P., Raju N., Magrangeas F., Minvielle S., Avet-Loiseau H., Munshi N.C., Dorfman D.M., Richardson P.G., Anderson K.C. 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.
6. Batorov E.V., Aristova T.A., Sergeevicheva V.V., Sizikova S.A., Ushakova G.Y., Pronkina N.V., Shishkova I.V., Shevela E.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Quantitative and functional characteristics of circulating and bone marrow PD-1- and TIM-3-positive T cells in treated multiple myeloma patients. *Sci Rep.* 2020; 10(1). doi:10.1038/s41598-020-77941-y.
7. 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.
8. Robert C. A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Nat Commun.* 2020; 11(1): 3801. doi: 10.1038/s41467-020-17670-y.
9. Usmani S.Z., Schjesvold F., Oriol A., Karlin L., Cavo M., Rifkin R.M., Yimer H.A., LeBlanc R., Takezako N., McCroskey R.D., Lim A.B.M., Suzuki K., Kosugi H., Grigoriadis G., Avivi I., Facon T., Jagannath S., Lonial S., Ghori R.U., Farooqui M.Z.H., Marinello P., San-Miguel J., KEYNOTE-185 Investigators. Pembrolizumab plus lenalidomide and dexamethasone for patients with treatment-naïve multiple myeloma (KEYNOTE-185): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* 2019; 6(9): 448–58. doi: 10.1016/S2352-3026(19)30109-7.
10. Mateos M.V., Blacklock H., Schjesvold F., Oriol A., Simpson D., George A., Goldschmidt H., Larocca A., Chanan-Khan A., Sherbenou D., Avivi I., Benyamini N., Iida S., Matsumoto M., Suzuki K., Ribrag V., Usmani S.Z., Jagannath S., Ocio E.M., Rodriguez-Otero P., San Miguel J., Kher U., Farooqui M., Liao J., Marinello P., Lonial S.; KEYNOTE-183 Investigators. Pembrolizumab plus pomalidomide and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (KEYNOTE-183): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* 2019; 6(9): 459–69. doi: 10.1016/S2352-3026(19)30110-3.
11. Kinter A.L., Godbout E.J., McNally J.P., Sereti I., Roby G.A., O'Shea M.A., Fauci A.S. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol.* 2008; 181(10): 6738–46. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.6738.
12. Mujib S., Jones R.B., Lo C., Aidarus N., Clayton K., Sakhdari A., Benko E., Kovacs C., Ostrowski M.A. Antigen-independent induction of Tim-3 expression on human T cells by the common γ -chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 is associated with proliferation and is dependent on the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Immunol.* 2012; 188(8): 3745–56. doi: 10.4049/jimmunol.1102609.
13. Marshall N., Hutchinson K., Marron T.U., Aleynick M., Hamerich L., Upadhyay R., Svensson-Arvelund J., Brown B.D., Merad M., Brody J.D. 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.
14. Waickman A.T., Park J.Y., Park J.H. The common γ -chain cytokine receptor: tricks-and-treats for T cells. *Cell Mol Life Sci.* 2016; 73(2): 253–69. doi: 10.1007/s00018-015-2062-4.
15. Crawford A., Angelosanto J.M., Kao C., Doering T.A., Odorizzi P.M., Barnett B.E., Wherry E.J. Molecular and transcriptional basis of CD4⁺ T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity.* 2014; 40(2): 289–302. doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.005.
16. Li J., He Y., Hao J., Ni L., Dong C. High Levels of Eomes Promote Exhaustion of Anti-tumor CD8⁺ T Cells. *Front Immunol.* 2018; 9: 2981. doi: 10.3389/fimmu.2018.02981.
17. Llaó-Cid L., Roessner P.M., Chapaprieta V., Öztürk S., Roeder T., Bordan M., Izcue A., Colomer D., Dietrich S., Stölgenbauer S., Hanna B., Martin-Subero J.I., Seifert M. EOMES is essential for antitumor activity of CD8⁺ T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2021; 35(11): 3152–62. doi: 10.1038/s41375-021-01198-1.
18. Ramos-Casals M., Brahmer J.R., Callahan M.K., Flores-Chávez A., Keegan N., Khamashta M.A., Lambotte O., Mariette X., Prat A., Suárez-Almazor M.E. Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors. *Nat Rev Dis Primers.* 2020; 6(1): 38. doi: 10.1038/s41572-020-0160-6.
19. Anthony S., Schluns K.S. Emerging roles for IL-15 in the activation and function of T-cells during immune stimulation. *Research and Reports in Biology.* 2015; 6: 25–37. doi: 10.2147/RRB.S57685.
20. Zhao Y., Cai C., Samir J., Palgen J.L., Keoshkerian E., Li H., Bull R.A., Luciani F., An H., Lloyd A.R. Human CD8 T-stem cell memory subsets phenotypic and functional characterization are defined by expression of CD122 or CXCR3. *Eur J Immunol.* 2021; 51(7): 1732–47. doi: 10.1002/eji.202049057.
21. Li S., Xie Q., Zeng Y., Zou C., Liu X., Wu S., Deng H., Xu Y., Li X.C., Dai Z. A naturally occurring CD8(+)CD122(+) T-cell subset as a memory-like Treg family. *Cell Mol Immunol.* 2014; 11(4): 326–31. doi: 10.1038/cmi.2014.25.
22. Villarreal D.O., Allegranza M.J., Smith M.A., Chin D., Luistro L.L., Snyder L.A. Targeting of CD122 enhances antitumor immunity by altering the tumor immune environment. *Oncotarget.* 2017; 8(65): 109151–60. doi: 10.18632/oncotarget.22642.
23. Elizondo D.M., Andargie T.E., Haddock N.L., da Silva R.L.L., de Moura T.R., Lipscomb M.W. IL-10 producing CD8⁺ CD122⁺ PD-1⁺ regulatory T cells are expanded by dendritic cells silenced for Allograft Inflammatory Factor-1. *J Leukoc Biol.* 2019; 105(1): 123–30. doi: 10.1002/JLB.1A0118-010RR.
24. Liu H., Qiu F., Wang Y., Zeng Q., Liu C., Chen Y., Liang C.L., Zhang Q., Han L., Dai Z. CD8⁺CD122⁺PD-1⁺ Tregs Synergize With Costimulatory Blockade of CD40/CD154, but Not B7/CD28, to Prolong Murine Allograft Survival. *Front Immunol.* 2019; 10: 306. doi: 10.3389/fimmu.2019.00306.
25. Sakuishi K., Ngiew S.F., Sullivan J.M., Teng M.W., Kuchroo V.K., Smyth M.J., Anderson A.C. TIM3+FOXP3+ regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *Oncoimmunology.* 2013; 2(4). doi: 10.4161/onci.23849.
26. Banerjee H., Nieves-Rosado H., Kulkarni A., Murter B., McGrath K.V., Chandran U.R., Chang A., Szymczak-Workman A.L., Vujanovic L., Delgoffe G.M., Ferris R.L., Kane L.P. Expression of Tim-3 drives phenotypic and functional changes in Treg cells in secondary lymphoid organs and the tumor microenvironment. *Cell Rep.* 2021; 36(11). doi: 10.1016/j.celrep.2021.109699.
27. Dahlhoff J., Manz H., Steinfatt T., Delgado-Tascon J., Seebacher E., Schneider T., Wilnit A., Mokhtari Z., Tabares P., Böckle D., Rasche L.,

Martin Kortüm K., Lutz M.B., Einsele H., Brandl A., Beilhack A. Transient regulatory T-cell targeting triggers immune control of multiple myeloma and prevents disease progression. *Leukemia*. 2022; 36(3): 790–800. doi: 10.1038/s41375-021-01422-y.

28. Kim M.J., Ha S.J. Differential Role of PD-1 Expressed by Various Immune and Tumor Cells in the Tumor Immune Microenvironment: Expression, Function, Therapeutic Efficacy, and Resistance to Cancer Immunotherapy. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9. doi: 10.3389/fcell.2021.767466.

29. Pearce E.L., Mullen A.C., Martins G.A., Krawczyk C.M., Hutchins A.S., Zedlak V.P., Banica M., DiCioccio C.B., Gross D.A., Mao C.A., Shen H., Cereb N., Yang S.Y., Lindsten T., Rossant J., Hunter C.A., Reiner S.L. Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. *Science*. 2003; 302(5647): 1041–3. doi: 10.1126/science.1090148.

30. Intlekofer A.M., Takemoto N., Wherry E.J., Longworth S.A., Northrup J.T., Palanivel V.R., Mullen A.C., Gasink C.R., Kaech S.M., Miller J.D., Gapin L., Ryan K., Russ A.P., Lindsten T., Orange J.S., Goldrath A.W., Ahmed R., Reiner S.L. Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nat Immunol*. 2005; 6(12): 1236–44. doi: 10.1038/ni1268. Erratum in: *Nat Immunol*. 2006; 7(1): 113.

31. Paley M.A., Kroy D.C., Odorizzi P.M., Johnnidis J.B., Dolfi D.V., Barnett B.E., Bikoff E.K., Robertson E.J., Lauer G.M., Reiner S.L., Wherry E.J. Progenitor and terminal subsets of CD8⁺ T cells cooperate to contain chronic viral infection. *Science*. 2012; 338(6111): 1220–5. doi: 10.1126/science.1229620.

Поступила/Received 04.07.2022

Одобрена после рецензирования/Revised 08.02.2023

Принята к публикации/Accepted 13.02.2023

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Баторов Егор Васильевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск, Россия). E-mail: Ebatorov@mail.ru. SPIN-код: 6316-0759. Researcher ID (WOS): L-8628-2015. Author ID (Scopus): 35768879800. ORCID: 0000-0003-2902-9336.

Аристов Татьяна Андреевна, врач-гематолог гематологического отделения с блоком трансплантации костного мозга, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск, Россия). ORCID: 0000-0002-4885-8327.

Ушакова Галина Юрьевна, кандидат медицинских наук, врач-гематолог гематологического отделения с блоком трансплантации костного мозга, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск, Россия). ORCID: 0000-0003-1822-6326.

Сизикова Светлана Анатольевна, кандидат медицинских наук, врач-гематолог гематологического отделения с блоком трансплантации костного мозга, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск, Россия). ORCID: 0000-0001-7109-3839.

Денисова Вера Васильевна, кандидат медицинских наук, заведующая гематологическим отделением с блоком трансплантации костного мозга, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 5507-1870. Author ID (Scopus): 54881246800. ORCID: 0000-0003-1951-2260.

Шевела Екатерина Яковлевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск, Россия). Researcher ID (WOS): Y-6730-2018. Author ID (Scopus): 14013896300. ORCID: 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» (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 3199-0970. Researcher ID (WOS): Y-6591-2018. Author ID (Scopus): 6701440111. ORCID: 0000-0001-6895-938X.

Черных Елена Рэмовна, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск, Россия). SPIN-код: 8957-0362. Researcher ID (WOS): K-1052-2014. Author ID (Scopus): 7003649977.

ВКЛАД АВТОРОВ

Баторов Егор Васильевич: разработка концепции, статистический анализ, написание статьи.

Аристов Татьяна Андреевна: статистический анализ.

Ушакова Галина Юрьевна: анализ клинических данных.

Сизикова Светлана Анатольевна: анализ клинических данных.

Денисова Вера Васильевна: написание статьи.

Шевела Екатерина Яковлевна: написание статьи.

Останин Александр Анатольевич: статистический анализ, написание статьи.

Черных Елена Рэмовна: разработка концепции, анализ данных, утверждение публикуемой версии рукописи.

Финансирование

Результаты исследования экспрессии T-клетками рецепторов PD-1, TIM-3, CD25, CD122, CD127 и внутриклеточной экспрессии pSTAT5 получены за счет средств Российского научного фонда (проект № 20-75-10132). Результаты исследования внутриклеточной экспрессии EOMES и регуляторных T-клеток выполнены в рамках государственного задания 2021–2023 № 122011800353-4.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Egor V. Batorov, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk, Russia). E-mail: Ebatorov@mail.ru. Researcher ID (WOS): L-8628-2015. Author ID (Scopus): 35768879800. ORCID: 0000-0003-2902-9336.

Tatyana A. Aristova, MD, Hematologist, Hematology Department with Bone Marrow Transplantation Unit, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-4885-8327.

Galina Yu. Ushakova, MD, PhD, Hematologist, Hematology Department with Bone Marrow Transplantation Unit, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk, Russia). ORCID: 0000-0003-1822-6326.

Svetlana A. Sizikova, MD, PhD, Hematologist, Hematology Department with Bone Marrow Transplantation Unit, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk, Russia). ORCID: 0000-0001-7109-3839.

Vera V. Denisova, MD, PhD, Head of the Hematology Department with a Bone Marrow Transplantation Unit, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk, Russia). Author ID (Scopus): 54881246800. ORCID: 0000-0003-1951-2260.

Ekaterina Ya. Shevela, MD, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk, Russia). Researcher ID (WOS): Y-6730-2018. Author ID (Scopus): 14013896300. ORCID: 0000-0001-8997-3586.

Alexander A. Ostanin, MD, Professor, Chief Researcher of the Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk, Russia). Researcher ID (WOS): Y-6591-2018. Author ID (Scopus): 6701440111. ORCID: 0000-0001-6895-938X.

Elena R. Chernykh, MD, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (Novosibirsk, Russia). Researcher ID (WOS): K-1052-2014. Author ID (Scopus): 7003649977.

AUTHOR CONTRIBUTION

Egor V. Batorov: study conception and design, statistical data analysis, drafting of the manuscript.

Tatyana A. Aristova: statistical data analysis.

Galina Yu. Ushakova: clinical data analysis.

Svetlana A. Sizikova: clinical data analysis.

Vera V. Denisova: drafting of the manuscript.

Ekaterina Ya. Shevela: drafting of the manuscript.

Alexander A. Ostanin: statistical data analysis, drafting of the manuscript.

Elena R. Chernykh: study conception, data analysis, final revision of the manuscript.

Funding

The results of the study concerning T cell expression of PD-1, TIM-3, CD25, CD122, CD127 and intracellular expression of pSTAT5 were obtained within the Russian Science Foundation grant (project № 20-75-10132). The results of the study concerning EOMES intracellular expression and regulatory T cell counts were carried out within the framework No 122011800353-4.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.