

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ORIGINAL PAPER

**Τα Τ-ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα
ελαττώνονται μετά από χορήγηση
λεναλιδομίδης, αλλά όχι βορτεζομίδης,
στο πολλαπλούν μυέλωμα**

ΣΚΟΠΟΣ Να διερευνηθεί κατά πόσο η θεραπεία με λεναλιδομίδα και βορτεζομίδα προκαλεί μεταβολές των T-regulatory cells (Tregs) και κατά πόσο αυτές σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά της νόσου, την ποιότητα ανταπόκρισης στη θεραπεία και το διάστημα χωρίς πρόοδο νόσου (progression free survival, PFS). Δευτερευόντως, μελετήθηκαν οι μεταβολές των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών (T4, T8, B, NK, NKL) και συγκεκριμένων κυτταροκινών (IL-2, IL-6, IL-17, TGF-β) που σχετίζονται με τη λειτουργία των Tregs και τη βιολογία του πολλαπλού μυελώματος (ΠΜ). **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Μελετήθηκαν 29 ασθενείς με ΠΜ, από τους οποίους 11 έλαβαν βορτεζομίδα-δεξαμεθαζόνη (BD, ομάδα Α) και 18 έλαβαν λεναλιδομίδα-δεξαμεθαζόνη (Rd, ομάδα Β). Ο προσδιορισμός των Tregs και των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών έλαβε χώρα στο περιφερικό αίμα με κυτταρομετρία ροής τετραπλού φθορισμού. Οι κυτταροκίνες μετρήθηκαν στον ορό με ανοσοενζυμικές μεθόδους. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τις προβλεπόμενες μεθόδους. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Στην ομάδα Α δεν διαπιστώθηκε μεταβολή των Tregs κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Στην ομάδα Β παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση των Tregs μεταξύ έναρξης και ανταπόκρισης στη θεραπεία ($p < 0,001$) και αυτό ήταν περισσότερο εμφανές στους ασθενείς που πέτυχαν τουλάχιστον πολύ καλή μερική ανταπόκριση στη θεραπεία ($\geq \text{vgPR}$) ($p = 0,04$). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές των λοιπών λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών και των μελετούμενων κυτταροκινών σε καμιά ομάδα θεραπείας και δεν διαπιστώθηκαν συσχετίσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών των ασθενών και των Tregs. Επιπρόσθετα, δεν προέκυψε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μεταβολών των Tregs και του PFS. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, τα Tregs ανευρίσκονταν σημαντικά ελαττωμένα μετά από θεραπεία με Rd, ιδιαίτερα στους ασθενείς με $\geq \text{vgPR}$, γεγονός το οποίο υποδεικνύει πιθανή συσχέτιση μεταξύ των ανοσολογικών φαινομένων που παρατηρούνται στο ΠΜ και της ποιότητας της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Το PFS δεν συσχετίστηκε με τις μεταβολές των Tregs. Η θεραπεία με BD δεν είχε επίδραση στα Tregs. Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών και των μελετούμενων κυτταροκινών, ούτε συσχετίσεις των Tregs με τα χαρακτηριστικά της νόσου και τις εξεταζόμενες παραμέτρους, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι ανοσολογικοί μηχανισμοί στο ΠΜ είναι σύνθετοι και σε σημαντικό βαθμό αδιευκρίνιστοι.

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2016, 33(4):519-526
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2016, 33(4):519-526

Χ. Χατζηαγγελίδου,¹
Ε. Μανδαλά,²
Ε. Τέρπος,^{1,3}
Δ. Μαρκάλα,¹
Ε. Γιαννάκη,¹
Θ. Παπαθεοδώρου,³
Γ. Ηλνίδης,²
Β. Γαρυπίδου,⁴
Γ. Καϊάφα,⁵
Β. Περιφάνης,⁵
Σ. Βακαλοπούλου,⁴
Α. Γαρύφαλλος,²
Ε. Κατωδρότου^{1,6}

¹Ελληνική Ομάδα Μελέτης Πολλαπλού Μυελώματος

²Δ' Παθολογική Κλινική, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη

³Θεραπευτική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

⁴Β' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη

⁵Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη

⁶Αιματολογική Κλινική, Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης «Θεαγένειο», Θεσσαλονίκη

T-regulatory cells are reduced after treatment with lenalidomide, but not bortezomib, in multiple myeloma

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Βορτεζομίδα
Λεναλιδομίδα
Πολλαπλούν μυέλωμα
Τ-ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs)

Υποβλήθηκε 10.12.2015

Εγκρίθηκε 20.12.2015

Το πολλαπλούν μυέλωμα (ΠΜ) αποτελεί κλωνική διαταραχή των Β-λεμφοκυττάρων στο τελικό στάδιο της διαφοροποίησής τους και χαρακτηρίζεται από τη συκέντρωση νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων στον μυελό των οστών, η οποία προκαλεί διαταραχή της φυσιολογικής αιμοποίησης και οστική νόσο.¹ Τα μυελωματικά κύτταρα αποκτούν πλεονέκτημα επιβίωσης μέσω πολλαπλών και αλληλοεπικαλυπτόμενων δράσεων, οι οποίες επισυμβαίνουν στο μικροπεριβάλλον της νόσου και μεσολαβούνται από τα κύτταρα του στρώματος και από ένα εκτεταμένο δίκτυο κυτταροκινών.^{2,3} Το ΠΜ ως κακοήθεια των πλασματοκυττάρων συνδέεται άρρηκτα με το ανοσοποιητικό σύστημα και συνοδεύεται από πληθώρα ανοσολογικών φαινομένων, η κατανόηση και η αντιμετώπιση των οποίων αποτελούν προϋποθέσεις για την ορθότερη αντιμετώπιση της νόσου. Αρκετά μόρια με ανοσολογική δραστηριότητα αυξάνονται στο πλαίσιο του ΠΜ, ενώ οι παρατηρούμενες ανοσολογικές διαταραχές αφορούν στο σκέλος τόσο της χυμικής όσο και της κυτταρικής ανοσίας και φαίνεται ότι έχουν αρνητική επίδραση στις παραμέτρους επιβίωσης του νοσήματος. Ωστόσο, το βιολογικό τους υπόβαθρο παραμένει σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστο.⁴

Η εισαγωγή των νέων παραγόντων (ΝΠ) στη θεραπευτική του μυελώματος, δηλαδή των ανοσοτροποποιητικών φαρμάκων και των αναστολέων του πρωτεασώματος, όπως η λεναλιδομίδη και η βορτεζομίδη, αντίστοιχα, βελτίωσαν την ανταπόκριση και τις παραμέτρους επιβίωσης στο ΠΜ. Η δημιουργία των νέων φαρμάκων στηρίχθηκε στη δράση τους στα νεοπλασματικά πλασματοκύτταρα και στα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος.⁵⁻⁷

Τα Τ-ρυθμιστικά κύτταρα (T-regulatory cells ή Tregs) αποτελούν έναν ισχυρό ανοσορρυθμιστικό υποπληθυσμό των CD4(+) Τ-λεμφοκυττάρων (5–15%) με δραστηριότητες που αφορούν στη διατήρηση της περιφερικής ανοσιακής ανοχής, την Τ ανοσορρύθμιση και τις ανοσοαντιδράσεις κατά του καρκίνου και των παθογόνων αντιγόνων. Η αποστολή των Tregs συνίσταται στην επίτευξη ισορροπίας μεταξύ του περιορισμού των αυτοάνοσων αντιδράσεων και της εκδήλωσης των ανοσιακών απαντήσεων έναντι των παθογόνων αντιγόνων. Αύξηση της δραστηριοποίησης των Tregs οδηγεί σε αποδυνάμωση της ανοσιακής απάντησης έναντι του καρκίνου και σε ατελή ανοσοποίηση έναντι χρόνιων αντιγονικών ερεθισμών, ενώ στην αντίθετη περίπτωση κατά την οποία η λειτουργία των κυττάρων αυτών υπολείπεται, προκαλείται έκλυση εκσεσημασμένων φλεγμονωδών και αλλεργικών αντιδράσεων και ανεξέλεγκτη εμφάνιση φαινομένων αυτοανοσίας.^{8,9}

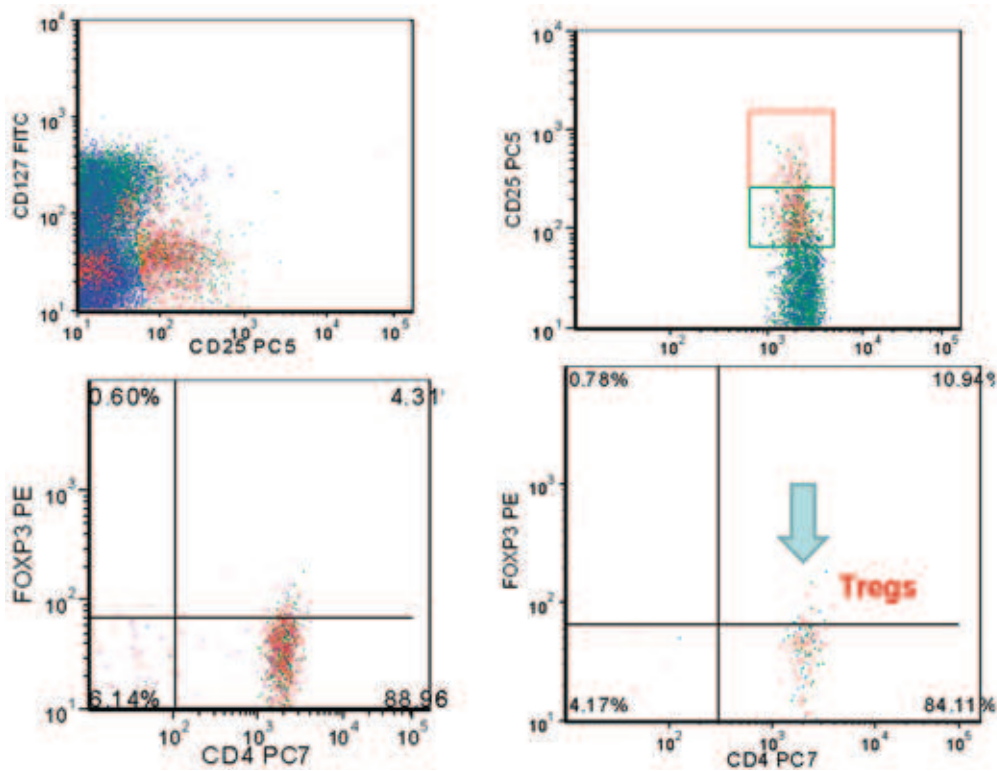
Τα καρκινικά αντιγόνα αναγνωρίζονται ως αυτοαντιγόνα (self antigens) και οι αυτοάνοσες αντιδράσεις που

εκλύονται στη συγκεκριμένη περίπτωση συνιστούν μέρος της ανοσιακής απάντησης του οργανισμού εναντίον του όγκου. Τα Tregs, στο πλαίσιο της διατήρησης της περιφερικής ανοσοανοχής και του περιορισμού των αυτοάνοσων αντιδράσεων, ενδεχομένως καταστέλλουν τη φυσική αντινεοπλασματική απάντηση του οργανισμού. Αρκετές μελέτες συνηγορούν για αύξηση του αριθμού των Tregs σε κακοήθειες του αίματος και των συμπαγών οργάνων, ενώ έχουν συνδέσει την παρουσία των εν λόγω κυττάρων με δυσμενή πρόγνωση.^{10,11} Ωστόσο, στην περίπτωση του ΠΜ, τα ερευνητικά δεδομένα σχετικά τόσο με τον ρόλο και τη συμπεριφορά των Tregs στο πλαίσιο του νοσήματος, όσο και με τις μεταβολές των κυττάρων αυτών κατά τη θεραπεία με ΝΠ είναι περιορισμένα και αμφιλεγόμενα.

Πρωτεύων καταληκτικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί κατά πόσο η χρησιμοποίηση των νέων παραγόντων λεναλιδομίδη και βορτεζομίδη στη θεραπεία του ΠΜ προκαλεί μεταβολές του ποσοστού των Tregs (Tregs%) επί του συνόλου των λεμφοκυττάρων και κατά πόσο οι εν λόγω μεταβολές σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά της νόσου και με τις παραμέτρους επιβίωσης και ανταπόκρισης στη θεραπεία. Δευτερευόντως, μελετήθηκαν οι μεταβολές των υπολοίπων λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών (T4, T8, B, NK, NKL) και συγκεκριμένων κυτταροκινών (IL-2, IL-6, IL-17, TGF-β), οι οποίες σχετίζονται με τη λειτουργία των Tregs και των νεοπλασματικών πλασματοκυττάρων κατά τη διάρκεια της θεραπείας με τους ΝΠ.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Μελετήθηκαν 29 ασθενείς με ΠΜ, από τους οποίους 11 έλαβαν συνδυασμό βορτεζομίδης και δεξαμεθαζόνης (VD) (ομάδα Α) και 18 λεναλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη (Rd) (ομάδα Β). Προσδιορίστηκαν οι διάμεσες ποσοστιαίες τιμές των Tregs κατά την έναρξη και τη μέγιστη ανταπόκριση στη θεραπεία, καθώς επίσης τα επίπεδα των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών T4, T8, NK, NKL και των κυτταροκινών IL-2, IL-6, IL-17 και TGF-β. Οι αντίστοιχες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν και σε 20 υγιείς μάρτυρες (controls). Η ποσοστιαία τιμή των Tregs (Tregs%) προσδιορίστηκε επί του συνόλου των λεμφοκυττάρων με πολυπαραμετρική ανάλυση κυτταρομετρίας ροής τετραπλού φθορισμού και τη χρήση των ανάλογων ισουπικών controls (Beckman Coulter, eBioscience), με στόχο την απομόνωση ενός συγκεκριμένου πληθυσμού ρυθμιστικών κυττάρων με ανοσοφαινοτυπικό προφίλ CD4(+)CD25(+)highCD127neg/lowFoxP3(+) (εικ. 1). Η ταυτοποίηση των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών διενεργήθηκε με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής και χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των επιφανειακών αντιγόνων CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19 και CD45 (Beckman Coulter). Οι κυτταροκίνες μετρήθηκαν στον ορό των ασθενών με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA και τη χρήση ειδικών αντισωμάτων (R&D Quantikine ELISA kit). Η ανταπόκριση



Εικόνα 1. Οριοθέτηση (gating) των CD4(+)CD25(+)highCD127neg/lowFoxP3(+) Tregs με κυτταρομετρία ροής.

ορίστηκε σύμφωνα με τα Uniform Response Criteria.¹² Ως μέγιστη ανταπόκριση ορίστηκε η ανταπόκριση, η οποία παρέμενε σταθερή σε δύο διαδοχικές μετρήσεις με διαφορά ενός μήνα.

Στατιστική ανάλυση

Ως διάστημα χωρίς πρόοδο νόσου (progression free survival, PFS) ορίστηκε το διάστημα από την έναρξη της θεραπείας μέχρι την εξέλιξη της νόσου ή τον θάνατο του ασθενούς. Η σύγκριση των κλινικοεργαστηριακών χαρακτηριστικών των ασθενών πραγματοποιήθηκε με τις δοκιμασίες Mann-Whitney U test, με Pearson’s χ^2 test και με one-way ANOVA, ενώ οι μεταβολές των παραμέτρων προς αξιολόγηση προσδιορίστηκαν με το Wilcoxon Rank Sum test. Η συσχέτιση των Tregs με την παράμετρο PFS έγινε με Cox regression ανάλυση, ενώ ως στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε η τιμή $p \leq 0,05$. Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων διενεργήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα Statistical Package for Social Sciences (SPSS), έκδοση 16.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα χαρακτηριστικά του συνόλου των ασθενών και των ομάδων θεραπείας A και B παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Οι ασθενείς των δύο ομάδων είχαν παρόμοια χαρακτηριστικά. Διέφεραν μόνο στις τιμές της αιμοσφαιρίνης (hemoglobin, Hb), των αιμοπεταλίων (platelets, PLTs) και

στο στάδιο νόσου. Ο διάμεσος αριθμός θεραπειών που έλαβαν οι ασθενείς πριν από την έναρξή τους στη μελέτη ήταν 2 (εύρος 1–4). Οι διάμεσες ποσοστιαίες τιμές των Tregs και των λοιπών λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών για το σύνολο των ασθενών και για τις επί μέρους ομάδες θεραπείας κατά τις χρονικές στιγμές της έναρξης (baseline) και της μέγιστης ανταπόκρισης στη θεραπεία (response) παρουσιάζονται στον πίνακα 2, ενώ οι διάμεσες τιμές των μελετούμενων κυτταροκινών παρατίθενται στον πίνακα 3. Σε σύγκριση με τα controls, η διάμεση τιμή των Tregs% των ασθενών πριν από τη θεραπεία ήταν σημαντικά μεγαλύτερη (εικ. 2). Οι διάμεσες τιμές των Tregs% και των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών δεν παρουσίαζαν διαφορές μεταξύ των ομάδων A και B, με εξαίρεση τον πληθυσμό των CD19(+) B λεμφοκυττάρων (πίν. 2). Οι διάμεσες τιμές των ιντερλευκινών 2, 6 και 17 δεν παρουσίαζαν διαφορές μεταξύ baseline και response για τις ομάδες A και B, ενώ για τον παράγοντα TGF- β παρατηρήθηκε οριακή διαφορά (πίν. 3). Το σύνολο των ασθενών παρουσίασε ελάττωση των Tregs κατά τη διάρκεια της θεραπείας με τους ΝΠ. Στην ομάδα A δεν διαπιστώθηκε μεταβολή των Tregs% κατά τη διάρκεια της θεραπείας (εικ. 3). Αντίθετα, οι ασθενείς που έλαβαν λεναλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη (ομάδα B) παρουσίασαν σημαντική ελάττωση των Tregs (εικ. 4). Η ελάττωση των Tregs αφορούσε κυρίως στους ασθενείς της

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των ασθενών και σύγκριση μεταξύ των ομάδων Α και Β.

| Χαρακτηριστικά Μ | Σύνολο ασθενών (n=29) | Ομάδα Α, BD (n=11) | Ομάδα Β, Rd (n=18) | p (<0,05) |
|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------|
| Ηλικία (έτη) | 61 (39–77) | 61 (43–76) | 63 (39–77) | NS |
| Φύλο (Α/Γ) | A=15, Γ=14 | A=6, Γ=5 | A=9, Γ=9 | NS |
| Hb (g/dL) | 10,4 (6,6–15,3) | 11,1 (8,9–14,6) | 12,7 (6,6–15,3) | 0,044 |
| PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$) | 216 (140–372) | 198 (140–286) | 260 (153–372) | 0,016 |
| LDH (U/L) | 180 (88–294) | 210 (91–294) | 177 (88–236) | NS |
| Alb (g/dL) | 3,8 (1,7–5,1) | 3,7 (3–5,1) | 3,8 (1,7–5,1) | NS |
| $\beta 2\text{m}$ (mg/L) | 3,3 (1,89–24,5) | 4 (1,89–24,5) | 3,3 (2,0–17,9) | NS |
| Τύπος μυελώματος | IGG=16, IGA=8, LC=2, NonS=3 | IGG=7, IGA=3, LC=1 | IGG=9, IGA=5, LC=1, NonS=3 | NS |
| ISS | ISSI=16, ISSII=6, ISSIII=7 | ISSI=3, ISSII=4, ISSIII=4 | ISSI=13, ISSII=2, ISSIII=3 | 0,04 |
| ORR | 22/29 | 9/11 | 13/18 | NS |
| $\geq \text{vgPR}$ | 13/29 | 3/11 | 10/18 | NS |
| Προηγούμενες θεραπείες | 2 (1–4) | 2 (1–4) | 2 (1–4) | NS |

M: Median, BD: Bortezomib/dexamethasone, Rd: Lenalidomide/dexamethasone, A: Άνδρες, Γ: Γυναίκες, Hb: Hemoglobin, PLT: Platelets, LDH: Lactate dehydrogenase, Alb: Albumin, $\beta 2\text{m}$: $\beta 2$ microglobulin, ISS: International scoring system, ORR: Overall response rate, vgPR: Very good partial response, LC: Light chain, NonS: Non secretory, NS: Non significant

Πίνακας 2. Διάμεσες % τιμές Tregs και λοιπών λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών σε ασθενείς και σύγκριση μεταξύ των ομάδων Α και Β.

| Υποπληθυσμοί (M%) | Σύνολο (n=29) | Ομάδα Α, BD (n=11) | Ομάδα Β, Rd (n=18) | p (<0,05) |
|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------|
| Tregs% BASE | 0,138 (0,01–5,7) | 0,2 (0,01–1,20) | 0,09 (0,02–5,7) | NS |
| Tregs % RES | | 0,6 (0,02–1,32) | 0,02 (0,0–0,12) | NS |
| NK% BASE | 19,1 (2,8–31,3) | 18,6 (2,8–25,5) | 22 (10,5–31,3) | NS |
| NK% RES | | 15,5 (8,1–19,3) | 17 (5,7–28,0) | NS |
| CD4% BASE | 38 (14,3–70,0) | 35,2 (14,3–70,0) | 34 (23,7–54,2) | NS |
| CD4% RES | | 40,4 (35,5–61,3) | 34 (15,0–48,0) | NS |
| CD8% BASE | 33,5 (12,0–55,0) | 18,9 (12,0–38,5) | 31,8 (24,0–55,0) | NS |
| CD8% RES | | 33,5 (14,1–43,8) | 32,6 (21,8–45,0) | NS |
| NKL% BASE | 6 (0,8–17,7) | 4,7 (0,8–7,8) | 5,5 (1,1–17,7) | NS |
| NKL% RES | | 3,2 (1,07–8,48) | 4,5 (1,0–19,5) | NS |
| CD19% BASE | 6,7 (0,5–24,2) | 8,3 (1,5–24,2) | 4,3 (0,5–17,0) | 0,02 |
| CD19% RES | | 2,2 (0,0–10,8) | 2,3 (0,6–20,5) | NS |

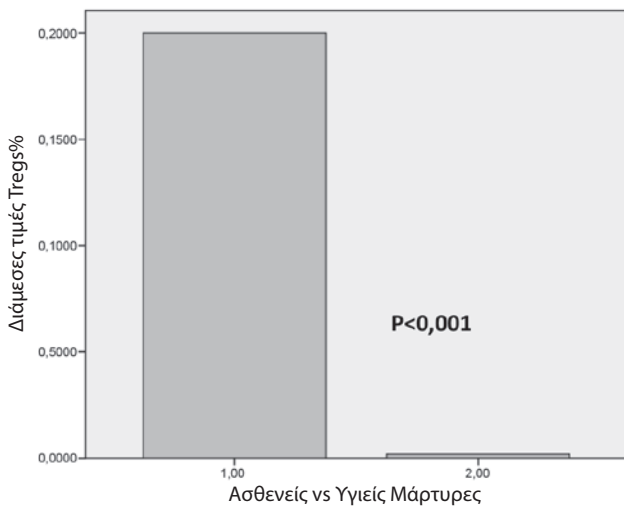
m%: Median percentage, n: Number, BASE: Baseline, RES: Response, Tregs: T-regulatory cells, CD: Classification determinant, NK: Natural killers, NKL: Natural killers like, NS: Non significant

Πίνακας 3. Διάμεσες τιμές κυτταροκινών σε ασθενείς και σύγκριση μεταξύ των ομάδων Α και Β.

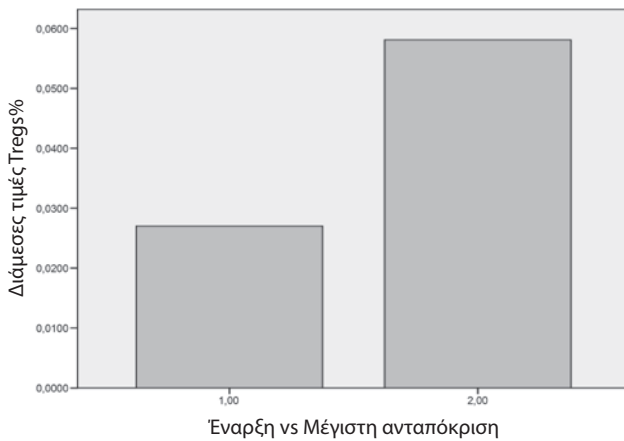
| Κυτταροκίνες (M) | Σύνολο (n=29) | Ομάδα Α, BD (n=11) | Ομάδα Β, Rd (n=18) | p (<0,05) |
|---------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|-----------|
| IL-2 BASE (pg/mL) | 7,7 (5,5–18,7) | 7,9 (5,5–9,8) | 7,9 (6,08–18,7) | NS |
| IL-2 RES (pg/mL) | | 8,1 (6,5–34,8) | 8,07 (5,6–11,0) | NS |
| IL-6 BASE (pg/mL) | 3,9 (1,6–103,7) | 5,4 (1,7–33,9) | 3,8 (1,6–103,7) | NS |
| IL-6 RES (pg/mL) | | 8,5 (2,2–30,4) | 4,4 (1,8–29,06) | NS |
| IL-17 BASE (pg/mL) | 5,3 (3,8–9,5) | 5,4 (3,8–7,6) | 5,3 (4,16–9,5) | NS |
| IL-17 RES (pg/mL) | | 4,6 (3,7–6,1) | 6,0 (2,5–10,7) | NS |
| TGF- β BASE (ng/mL) | 19,2 (0,26–35,9) | 14,8 (8,9–30,5) | 22,8 (0,26–35,9) | 0,046 |
| TGF- β RES (ng/mL) | | 22,5 (14,3–33,07) | 19,3 (0,7–32,5) | NS |

M: Median, BASE: Baseline, RES: Response, NK: Natural killers, NKL: Natural killers like, IL: Interleukin, TGF- β : Transforming growth factor- β , NS: Non significant

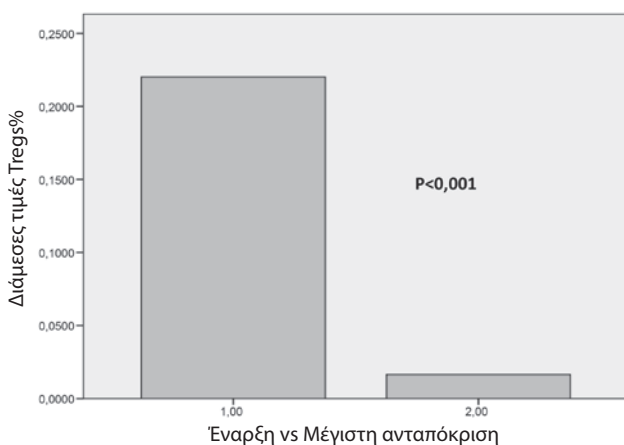
ομάδας Α, στους οποίους επιτεύχθηκε τουλάχιστον πολύ καλή μερική ανταπόκριση στη θεραπεία ($\geq \text{vgPR}$) (εικ. 5). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών και των κυτταροκινών μεταξύ έναρξης και ανταπόκρισης στη θεραπεία σε καμία ομάδα. Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στις τιμές των Tregs και τα χαρακτηριστικά των ασθενών, καθώς και στα επίπεδα των λοιπών λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών.



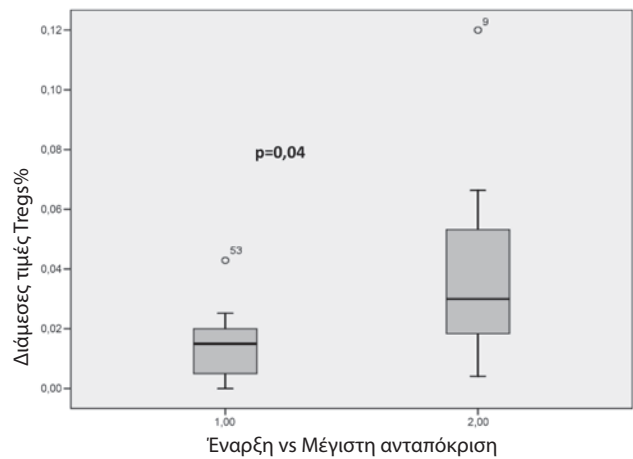
Εικόνα 2. Σύγκριση διάμεσων τιμών Tregs% (T-regulatory cells) σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες (controls).



Εικόνα 3. Ομάδα A (VD) (velcade-dexamethasone): Μεταβολές των % Tregs (T-regulatory cells) μεταξύ έναρξης και μέγιστης ανταπόκρισης στη θεραπεία με νέους παράγοντες.



Εικόνα 4. Ομάδα B (Rd) (revlimid-dexamethasone): Μεταβολές των % Tregs (T-regulatory cells) μεταξύ έναρξης και μέγιστης ανταπόκρισης στη θεραπεία με νέους παράγοντες.



Εικόνα 5. Ομάδα B (Rd) (revlimid-dexamethasone): Μεταβολές των % Tregs (T-regulatory cells) ανάλογα με την ανταπόκριση στη θεραπεία. vgPR: Very good partial response.

σμών και κυτταροκινών. Από την ανάλυση Cox regression δεν προέκυψε κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μεταβολών των Tregs κατά τη διάρκεια της θεραπείας και του διαστήματος PFS.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μελετήθηκαν οι μεταβολές των Tregs σε 29 ασθενείς με ΠΜ, οι οποίοι έλαβαν βορτεζομίδη και λεναλιδομίδη. Παράλληλα, μετρήθηκαν τα επίπεδα των Tregs σε 20 υγιείς μάρτυρες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι ασθενείς με ΠΜ είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα Tregs% σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό, γεγονός το οποίο βρίσκεται σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα άλλων μελετών.^{13,14} Οι ασθενείς της ομάδας B (Rd) παρουσίασαν σημαντική ελάττωση των Tregs μεταξύ έναρξης και μέγιστης ανταπόκρισης στη θεραπεία. Η ελάττωση των Tregs συσχετίστηκε με την ποιότητα ανταπόκρισης. Οι ασθενείς στους οποίους επιτεύχθηκε \geq vgPR είχαν στατιστικά μεγαλύτερη μείωση των Tregs σε σχέση με τους υπόλοιπους. Οι Muthu Raja et al¹⁵ μελέτησαν τις μεταβολές των Tregs σε 15 ασθενείς με ΠΜ οι οποίοι έλαβαν θεραπεία με Rd και παρατήρησαν αύξηση των Tregs στους 14 ασθενείς που ανταποκρίθηκαν. Ωστόσο, στη σχετική μελέτη μόνο σε 3 ασθενείς επιτεύχθηκε \geq vgPR, ενώ στους ανταποκριθέντες ασθενείς συμπεριελήφθησαν και 8 ασθενείς οι οποίοι πέτυχαν ελάχιστη ανταπόκριση, γεγονός που μπορεί να ερμηνεύσει ως έναν βαθμό τα αντιφατικά αποτελέσματα της προηγούμενης μελέτης σε σχέση με την παρούσα. Σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης, οι Galustian et al¹⁶ παρατήρησαν ότι τα Tregs ελαττώνονται *in vitro* μετά από προσθήκη λεναλιδομίδης και πομαλιδομίδης, γεγονός που, σύμφωνα

με τους ερευνητές, παραπέμπει στην ύπαρξη ενός μηχανισμού μέσω του οποίου τα ανοσοτροποποιητικά φάρμακα μπορούν να υπερκεράσουν την κατασταλτική δράση των Tregs και να ενδυναμώσουν την ανοσιακή απάντηση του οργανισμού έναντι του όγκου.

Οι ασθενείς της ομάδας Α που έλαβαν βορτεζομίδη παρουσίασαν μη στατιστικά σημαντική αύξηση των Tregs, γεγονός που συνάδει με τα διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία η *in vitro* προσθήκη βορτεζομίδης σε καλλιέργειες CD4(+) λεμφοκυττάρων αφ' ενός περιορίζει την επέκταση των Τ δρώντων λεμφοκυττάρων και αφ' ετέρου ευοδώνει την ανάπτυξη ενός διακριτού πληθυσμού ρυθμιστικών κυττάρων, που συμπεριφέρονται με ανθεκτικότητα στις αποπτωτικές δράσεις του φαρμάκου.¹⁷ Τα παραπάνω ενισχύουν την ιδέα της χρησιμοποίησης της βορτεζομίδης για την ελάττωση της νόσου του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (graft-versus-host disease, GVHD) μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και συνάδουν με τα συμπεράσματα αρκετών μελετών, σύμφωνα με τα οποία η παρουσία μεγάλου αριθμού κυκλοφορούντων CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) Tregs σχετίζεται με μικρότερη συχνότητα εμφάνισης GVHD.^{18–20}

Στην παρούσα μελέτη, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των μεταβολών των Tregs με το PFS. Ωστόσο, απαιτείται

μεγαλύτερος αριθμός ασθενών για την εξαγωγή τελικών συμπερασμάτων ως προς την παράμετρο αυτή. Τα περισσότερα βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι οι αυξημένες τιμές των Tregs στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΠΜ σχετίζονται αρνητικά με τις παραμέτρους επιβίωσης του νοσήματος.^{21,22} Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των μεταβολών των Tregs και των σχετιζόμενων με το ΠΜ και τα Tregs κυτταροκινών, δηλαδή των ιντερλευκινών 2, 6 και 17 και του παράγοντα TGF-β. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές των λεμφοκυτταρικών υποπληθυσμών και των υπό εξέταση κυτταροκινών μετά τη θεραπεία με λεναλιδομίδη ή βορτεζομίδη. Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν την πολυπλοκότητα των ανοσολογικών φαινομένων που διέπουν τη βιολογία του ΠΜ και τους μηχανισμούς ομοίωσης των Tregs.

Συμπερασματικά, η θεραπεία με λεναλιδομίδη και δεξαμεθαζόνη ελαττώνει σημαντικά τα επίπεδα των Tregs στο περιφερικό αίμα και η εν λόγω μείωση σχετίζεται με την ποιότητα της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Αντίθετα, η θεραπεία με βορτεζομίδη δεν φαίνεται να έχει επίπτωση στον αριθμό των Tregs. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση των μεταβολών των Tregs με το PFS. Ωστόσο, απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός ασθενών για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

ABSTRACT

T-regulatory cells are reduced after treatment with lenalidomide, but not bortezomib, in multiple myeloma

C. HADJIAGGELIDOU,¹ E. MANDALA,² E. TERPOS,^{1,3} D. MARKALA,¹ E. YIANNAKI,¹ A. PAPATHEODOROU,³ G. ILONIDIS,² V. GARIPIDOU,⁴ G. KAIAFA,⁵ V. PERIFANIS,⁵ S. VAKALOPOULOU,⁴ A. GARIFALOS,² E. KATODRITOU^{1,6}

¹Greek Myeloma Working Group, ²Fourth Department of Internal Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, ³Department of Clinical Therapeutics, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, ⁴Second Propedeutic Department of Internal Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, ⁵First Propedeutic Department of Internal Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, ⁶Department of Hematology, "Theagenion" Cancer Hospital, Thessaloniki, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2016, 33(4):519–526

OBJECTIVE To explore possible alterations of T-regulatory cells (Tregs) and lymphocyte subpopulations (T4, T8, B, NK, NKL), and changes in the levels of cytokines related to the function of Tregs and the biological parameters of multiple myeloma (MM) (IL-6, IL-2, IL-17, TGF-β) during treatment with novel agents (NA), and their correlation with disease characteristics and response parameters. **METHOD** The study was conducted on 29 patients with symptomatic MM at diagnosis or during relapse (male/female: 15/14, median age: 61 years, range: 39–77 years). Of the NA, 11 patients were administered bortezomib-dexamethasone (BD) (group A) and 18 lenalidomide-dexamethasone (Rd) (group B). The patients had received 0–3 previous treatment lines (median 2). Tregs and lymphocyte subpopulations were detected in peripheral blood samples using polyparametric flow cytometry analysis and appropriate isotypic controls from healthy subjects. Cytokines were measured in serum samples using the enzyme-linked immunosorbent assay ELISA. Statistical analysis was performed using appropriate methods and p<0.05 was considered statistically signif-

icant. **RESULTS** In group A, no significant alteration in Tregs%, lymphocyte subpopulations or cytokines were observed during treatment. In group B, there was a significant reduction in Tregs% ($p < 0.001$) which was more marked in patients who achieved at least a very good partial response to treatment (\geq vgPR) ($p = 0.04$). No alteration in lymphocyte subpopulations or cytokines was observed during treatment with NA in either group of patients. Patients had a significantly higher median Tregs% than healthy control subjects (HV) ($p < 0.001$). No significant correlation was detected between disease characteristics and Tregs in either group of patients. In Cox regression analysis, Tregs% was not correlated with progression free survival (PFS). **CONCLUSIONS** Tregs% was significantly reduced after treatment with Rd, especially in patients with \geq vgPR, suggesting a possible relationship between the immune phenomena of MM and the quality of response, although the PFS was not affected in this study. Bortezomib-based treatment had no impact on Tregs%. Patients with MM had higher Tregs% than HV, confirming the implication of immune impairment in the biology of this disease. No relationship between Tregs and disease characteristics was observed, nor between Tregs and relevant cytokines, indicating that the immune mechanisms underlying MM need to be explored.

Key words: Bortezomib, Lenalidomide, Multiple myeloma, T-regulatory cells (Tregs)

Βιβλιογραφία

1. RAJKUMAR SV. Multiple myeloma: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2013, 88:226–235
2. PALUMBO A, ANDERSON K. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2011, 364:1046–1060
3. MERICO F, BERGUI L, GREGORETTI MG, GHIA P, AIMO G, LINDLEY IJD ET AL. Cytokines involved in the progression of multiple myeloma. *Clin Exp Immunol* 1993, 92:27–31
4. SCHÜTT P, BRANDHORST D, STELLBERG W, POSER M, EBELING P, MÜLLER S ET AL. Immune parameters in multiple myeloma patients: Influence of treatment and correlation with opportunistic infections. *Leuk Lymphoma* 2006, 47:1570–1582
5. DOU QP, ZONDER JA. Overview of proteasome inhibitor-based anti-cancer therapies: Perspective on bortezomib and second generation proteasome inhibitors versus future generation inhibitors of ubiquitin-proteasome system. *Curr Cancer Drug Targets* 2014, 14:517–536
6. KUBICZKOVA L, POUR L, SEDLARIKOVA L, HAJEK R, SEVCIKOVA S. Proteasome inhibitors – molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *J Cell Mol Med* 2014, 18:947–961
7. DIMOPOULOS MA, TERPOS E, NIESVIZKY R. How lenalidomide is changing the treatment of patients with multiple myeloma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013, 88(Suppl 1):S23–S35
8. FEHÉRVARI Z, SAKAGUCHI S. Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2004, 16:203–208
9. WORKMAN CJ, SZYMCZAK-WORKMAN AL, COLLISON LW, PILLAI MR, VIGNALI DA. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci* 2009, 66:2603–2622
10. CURIEL TJ. Regulatory T cells and treatment of cancer. *Curr Opin Immunol* 2008, 20:241–246
11. WANG HY, WANG RF. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol* 2007, 19:217–223
12. DURIE BG, HAROUSSEAU JL, MIGUEL JS, BLADÉ J, BARLOGIE B, ANDERSON K ET AL. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006, 20:1467–1473
13. FEYLER S, VON LILIENFELD-TOAL M, JARMIN S, MARLES L, RAWSTRON A, ASHCROFT AJ ET AL. CD4(+)CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are increased whilst CD3(+)CD4(-)CD8(-) alpha betaTCR(+) double negative T cells are decreased in the peripheral blood of patients with multiple myeloma which correlates with disease burden. *Br J Haematol* 2009, 144:686–695
14. BEYER M, KOCHANEK M, GIESE T, ENDL E, WEIHRAUCH MR, KNOLLE PA ET AL. *In vivo* peripheral expansion of naive CD4+CD25^{high} FoxP3+ regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood* 2006, 107:3940–3949
15. MUTHU RAJA KR, KORVARONA L, HAJEK R. Induction by lenalidomide and dexamethasone combination increases regulatory cells of patients with previously untreated multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2012, 53:1406–1408
16. GALUSTIAN C, MEYER B, LABARTHE MC, DREDGE K, KLASCHKA D, HENRY J ET AL. The anti-cancer agents lenalidomide and pomalidomide inhibit the proliferation and function of T regulatory cells. *Cancer Immunol Immunother* 2009, 58:1033–1045
17. BLANCO B, PÉREZ-SIMÓN LA, SÁNCHEZ-ABARCA LI, CABALLERO-VELAZQUEZ T, GUTIERREZ-COSSÍO S, HERNÁNDEZ-CAMPO P ET AL. Treatment with bortezomib of human CD4+ T cells preserves natural regulatory T cells and allows the emergence of a distinct suppressor T-cell population. *Haematologica* 2009, 94:975–983
18. ZORN E, KIM HT, LEE SJ, FLOYD BH, LITSA D, ARUMUGARAJAH S ET AL. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005, 106:2903–2911
19. MIURA Y, THOBURN CJ, BRIGHT EC, PHELPS ML, SHIN T, MATSUI EC ET AL. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* 2004, 104:2187–2193
20. REZVANI K, MIELKE S, AHMADZADEH M, KILICAL Y, SAVANI BN, ZEILAH J ET AL. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood* 2006, 108:1291–1297
21. GIANNOPOULOS K, KAMINSKA W, HUS I, DMOSZYNSKA A. The fre-

- quency of T regulatory cells modulates the survival of multiple myeloma patients: Detailed characterisation of immune status in multiple myeloma. *Br J Cancer* 2012, 106:546–552
22. MUTHU RAJA KR, KOVÁŘOVÁ L, KAISAROVÁ P, BARTOŇOVÁ J, HÁJEK R. Regulatory T cells predict progression in previously untreated myeloma patients and treatment by cyclophosphamide, thalidomide plus dexamethasone reduces regulatory

T cells. American Society of Hematology Meeting and Exposition, San Diego, CA, 2011

Corresponding author:

C. Hadjiaggelidou, "Theagenio" Cancer Hospital, 2 Alexandrou Symeonidi street, GR-546 39 Thessaloniki, Greece
e-mail: chadjiaggelidou@yahoo.com

