

УДК: 616/618, 616-074, 614.88:621.039.586713, 575.113.616.831:616-006.6:616-001.28

Т. Ф. Любарець✉

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, бульвар Т. Шевченка, 13, м. Київ, 01601, Україна

TNF- α ТА ІОНІЗУЮЧЕ ВИПРОМІНЮВАННЯ: РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗІ І ЛІКУВАННІ ПЛАЗМОКЛІТИННОЇ МІЄЛОМИ (огляд літератури)

В огляді представлені дані літератури стосовно ролі фактора некрозу пухлин- α (TNF- α) та іонізуючого випромінювання в патогенезі і лікуванні плазмноклітинної мієломи. Проаналізовано порушення функціонування регуляції даного цитокіну, що впливає на взаємодію імунної системи з субстратними плазматичними клітинами за умов впливу негативних зовнішніх чинників, у тому числі – іонізуючого випромінювання. Представлено сучасні напрямки терапії даного захворювання з використанням новітніх технологій, зокрема CAR T-клітинної терапії, що дозволять в перспективі оптимізувати лікування цього захворювання і, таким чином, покращити якість та тривалість життя хворих на плазмноклітинну мієлому.

Ключові слова: плазмноклітинна мієлома, цитокіни, TNF- α , CAR T-клітинна терапія.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2023. Вип. 28. С. 65–74. doi: 10.33145/2304-8336-2023-28-65-74

T. F. Liubarets✉

Bogomolets National Medical University, 13 Tarasa Shevchenko Blvd, Kyiv, 01601, Ukraine

TNF- α AND IONIZING RADIATION: THE ROLE IN THE PATHOGENESIS AND TREATMENT OF PLASMA CELL MYELOMA (review)

The review presents data from the literature on the role of Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and ionizing radiation (IR) in the pathogenesis and treatment of plasma cell myeloma (PCM). There was analyzed disturbance of regulation of functioning of this cytokine, which affects the interaction of the immune system with substrate plasma cells under the influence of negative external factors, including ionizing radiation IR. Modern directions of therapy of this disease using the latest technologies are presented, in particular CAR T-cell therapy, which will allow to optimize in the future treatment of this disease and, thus, improve the quality and life expectancy of PCM patients.

Key words: plasma cell myeloma, cytokines, TNF- α , CAR T-cell therapy.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2023;28:65-74. doi: 10.33145/2304-8336-2023-28-65-74

✉ Любарець Тетяна Федорівна, e-mail: tliubarets@yahoo.com

✉ Tetiana F. Liubarets, e-mail: tliubarets@yahoo.com

Плазмоклітинна мієлома (ПКМ) – моноклональне лімфопроліферативне захворювання, при якому злоякісно трансформовані плазматичні клітини синтезують патологічні імуноглобуліни або їх фрагменти [1]. Частота ПКМ серед онкогематологічних захворювань сягає близько 15 %, серед хворих переважають чоловіки старші за 65 років, дещо рідше ПКМ виявляється у молодих осіб.

Останніми роками у більшості країн світу, в тому числі і в Україні, має місце зростання захворюваності на ПКМ. Так, у 2019 р., за даними Канцерреєстру України [2], цей показник для жінок становив 2,6 : 100 000 населення, для чоловіків – 2,7 : 100 000 населення. Стандартизований показник захворюваності для України з урахуванням статі (жінки та чоловіки) відповідав 2,3 і 2,9, світові показники визначались на рівні 1,4 і 1,8.

Негативні чинники, з якими протягом життя контактує індивідуум, такі як, наприклад, іонізуюче випромінювання (ІВ), підвищують ризики ПКМ [3]. Наслідки впливу ІВ щодо індукції цього захворювання у різних категорій опромінених осіб (внаслідок атомного бомбардування в Японії; у тих, хто професійно контактує з джерелами ІВ; у хворих на онкологічну та гематологічну патологію, яким призначалась променева терапія; в учасників ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській АЕС) вивчено багатьма дослідниками [3–9].

Однак негативні чинники зовнішнього середовища, включаючи ІВ, сприяють виникненню даного захворювання при взаємодії з низкою ендогенних факторів. Суттєва роль в цьому належить порушенням функціонування імунної системи, у тому числі регуляції мережі цитокінів, які забезпечують проліферацію, диференціацію та функціонування субстратних плазматичних клітин. Зокрема, фактор некрозу пухлини- α ($TNF-\alpha$) сприяє експансії пухлинного клону у хворих на ПКМ [10]. Біологічна гетерогенність субстратних клітин, яка характерна для різних фаз перебігу ПКМ, обумовлена наявністю дисрегульованих взаємозв'язків мережі цитокінів, що надає перевагу $TNF-\alpha$ як промотору прогресії захворювання [11].

Протягом тривалого проміжку часу загибель клітин внаслідок опромінення розглядали як поєднання інтерфазної та репродуктивної «смерті» [12]. Цей постулат базувався на класичній радіобіологічній концепції аналізу виживання клоногенних клітин. На сьогодні проведені численні дослідження, спрямовані на вивчення молекулярних шляхів і етапів клітинної смерті (апоптозу), що ре-

Plasma cell myeloma (PCM) is a monoclonal lymphoproliferative disease in which plasma cells are malignantly transformed synthesize pathological immunoglobulins or their fragments [1]. The frequency of PCM among oncohematological diseases reaches about 15 %, among the patients men older than 65 years predominate, PCM is somewhat less often found in young people.

In recent years, in most countries of the world, including Ukraine, there has been an increase in the incidence of PCM. Thus, in 2019, according to the Cancer Register of Ukraine [2], this indicator for women was 2.6 : 100,000 population, for men 2.7 : 100,000 population. The standardized incidence rate for Ukraine, taking into account gender (women and men), corresponded to 2.3 and 2.9, the world indicators were determined at the level of 1.4 and 1.8.

Negative factors with which an individual comes into contact during his life, such as, for example, ionizing radiation (IR), increase the risks of PCM [3]. Consequences of exposure to IR in relation to the induction of this disease in various categories of irradiated persons (suffered after the atomic bombing in Japan; in those who have professional contact with sources of IR; in patients with oncological and hematological pathology who were prescribed radiation therapy; in clean-up workers of the Chornobyl nuclear power plant accident) has been studied by many researchers [3–9].

However, negative environmental factors, including IR, contribute in inducing of this disease in interaction with a number of endogenous factors. A significant role in this is due to the disruption of the functioning of the immune system, including the regulation of the cytokine network, which ensures the proliferation, differentiation and functioning of substrate plasma cells. In particular, Tumor necrosis factor- α ($TNF-\alpha$) contributes to the expansion of the tumor clone in PCM patients [10]. The biological heterogeneity of substrate cells, which characterizes different phases of the course of PCM, is the result of the presence of dysregulated interconnections of the cytokine network, which gives an advantage $TNF-\alpha$ as a promoter of disease progression [11].

For a long time, cell death due to irradiation was considered as a combination of interphase and reproductive «death» [12]. This postulate was based on the classical radiobiological concept of the analysis of the survival of clonogenic cells. To date, numerous studies have been conducted aimed at studying the molecular pathways and stages of cell

гулює виживання клітин пухлин. Маркери апоптозу також становлять інтерес як прогностичні чинники оцінки ефективності лікування і прогнозування ймовірності виникнення ускладнень, пов'язаних з впливом ІВ на здорові клітини, зокрема, лімфоїдного ряду.

Для виявлення молекулярних змін, які відбуваються в процесі апоптозу, використовують різноманітні маркери [12], зокрема анексин V/PI та каспазу-3. Результати дослідження [12] свідчать про різнорідну реакцію клітин пухлин на дію ліганду смерті $TNF-\alpha$ в поєднанні з опроміненням. Кількість клітин, які перебувають у процесі апоптозу, суттєво відрізняється між визначеними анексином V/PI та каспазою-3 кінцевими точками. Вивчення особливостей впливу чинників на клітини лімфоїдної лінії SU-DHL-4 показали, що $TNF-\alpha$ помірно впливав на інтенсивність апоптозу (аналіз проведено із застосуванням обох маркерів – анексину V і каспази-3). В той же час, опромінення призвело до збільшення на 60 % кількості клітин, які вступили до апоптозу (при використанні маркування анексином V) і на 50 % клітин – при застосуванні каспази-3 як маркера процесу.

Проведені дослідження [13] показали, що під впливом стресогенних чинників протеїнкінази (stress-activated protein kinases, SAPK), також відомі як аміно-термінальні кінази c-Jun (c-jun amino-terminal kinases, JNK), активуються. Це має місце і у відповідь на дію різноманітних ендогенних факторів, включаючи цитокіни, і, зокрема, $TNF-\alpha$ [13]. Хоча всі вищезазначені чинники ініціюють апоптоз, питання щодо необхідності активації SAPK/JNK для ініціації цього процесу в субстратних клітинах при ПКМ потребує подальшого вивчення. У дослідженні [13] показано, що ІВ і кортикостероїд (дексаметазон) індукують апоптоз у лініях клітин мієломи, а також у субстратних плазматичних клітинах, отриманих від пацієнтів. Ініційований ІВ апоптоз обумовлений активацією SAPK/JNK і p38 кінази, на відміну від дексаметазон-індукованого апоптозу, який не пов'язаний з активацією стрескіназ. Крім того, при дексаметазон-індукованому апоптозі має місце значне зниження активності мітоген-активованої протеїнкінази (MAPK) і p70S6K. Як ІВ, так і дексаметазон, сприяють розщепленню полі-ADP рибози полімеразою (PARP), що є подією, характерною для апоптозу. Інший цитокін, інтерлейкін-6 (IL-6) інгібує дексаметазон-індукований апоптоз, пригнічення кіназ росту MAP і p70S6K та розщеплення PARP. Однак, IL-6 не інгібує

death (apoptosis), which regulates the survival of tumor cells. Apoptosis markers are also of interest as prognostic factors for evaluating the effectiveness of treatment and predicting the likelihood of complications associated with the effect on healthy cells, in particular the lymphoid line, IR.

Various markers are used to detect molecular changes that occur during the process of apoptosis [12], in particular annexin V/PI and caspase-3. The results of the study [12] indicate a heterogeneous response of tumor cells to the action of the death ligand $TNF-\alpha$ in combination with irradiation. The number of cells undergoing apoptosis differs significantly between the annexin V/PI and caspase-3 endpoints. The study of the peculiarities of the influence of factors on the cells of the lymphoid line SU-DHL-4 showed that $TNF-\alpha$ moderately affected the intensity of apoptosis (the analysis was carried out using both markers – annexin V and caspase-3). At the same time, irradiation led to a 60 % increase in the number of cells that entered apoptosis (using annexin V labeling) and a 50 % increase in cells when a marker of the caspase-3 process was used.

Conducted studies [13] have shown that under the influence of stressogenic factors, stress-activated protein kinases (SAPK), also known as c-jun amino-terminal kinases (JNK), are activated. This also occurs in response to the action of various endogenous factors, including cytokines, and, in particular, $TNF-\alpha$ [13]. Although all of the above factors initiate apoptosis, the question of the need for SAPK/JNK activation to initiate this process in PCM substrate cells requires further study. The study [13] showed that IR and a corticosteroid (dexamethasone) induce apoptosis in myeloma cell lines as well as in patient-derived plasma cell substrates. Initiated IR apoptosis is the result of the activation of SAPK/JNK and p38 kinase, in contrast to dexamethasone-induced apoptosis, which is not associated with activation of stress kinases. In addition, dexamethasone-induced apoptosis is accompanied by a significant decrease in the activity of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and p70S6K. Both IR and dexamethasone promote the cleavage of poly-ADP ribose polymerase (PARP), an event characteristic of apoptosis. Another cytokine, interleukin-6 (IL-6) inhibits dexamethasone-induced apoptosis, inhibition of MAP and p70S6K growth kinases, and PARP cleavage. However, IL-6 does not inhibit IR-induced apoptosis, SAPK/JNK acti-

ІВ-індукований апоптоз, активацію SAPK/JNK і розщеплення PARP. Таким чином, показано, що існує два апоптотичних сигнальних шляхи: SAPK/JNK-асоційований, який індукується ІВ і на який не впливає ІЛ-6, та SAPK/JNK-незалежний, який індукується дексаметазоном, пов'язаний зі зниженням регуляції MAPK та p70S6K та інгібується ІЛ-6.

Дослідження [14] мало на меті вивчити синергічний ефект циркулярно реаранжованого (circularly permuted) TRAIL (CPT) – ліганда, який індукує *TNF*-залежний апоптоз (Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand)), та циклопаміну (гемостатичний, ангіопротекторний засіб) щодо проліферації та апоптозу клітин мієломи. TRAIL мож бути перспективним прототипом препарату для лікування ПКМ. Результати дослідження показали, що інгібуючий вплив циклопаміну на проліферацію ліній RPMI-8226 і SKO-007 клітин мієломи людини був слабким. Клітини лінії RPMI-8226 були чутливі до CPT, однак проліферація клітин SKO-007 не була ефективно супресована CPT. Таким чином, клітини SKO-007 було розцінено як стійкі до циклопаміну та химерних антигенних рецепторів (chimeric antigen receptor, CAR) і використані [14] в подальшому для оцінки їх синергічного впливу на клітини мієломи цієї лінії. Було показано, що комбінована дія циклопаміну та CAR обумовлює значне пригнічення проліферації клітин лінії SKO-007. Циклопамін посилював індукований CAR апоптоз у клітинах SKO-007 і демонстрував синергетичну індукцію апоптозу в поєднанні з CAR, що призводило до зменшення об'єму пухлини. Кількісна полімеразна ланцюгова реакція показала, що циклопамін знижує рівні експресії мРНК *GLI1/GLI2/GLI3* і підвищує рівні експресії рецептора смерті 4. Узагальнюючи отримані в даному експериментальному дослідженні результати, визначено ще один перспективний шлях інгібування проліферації та індукції апоптозу в клітинах мієломи.

Важливим аспектом патогенезу ПКМ є наявність поліморфізму генів цитокінів, їх роль як прогностичних чинників перебігу захворювання підтверджено в дослідженні [10]. Проведено вивчення зв'язку між поліморфними варіантами генів ряду цитокінів, у тому числі – *TNF- α* та *IFN- γ* , клінічними характеристиками і прогнозом перебігу захворювання у пацієнтів, які вперше отримували нові терапевтичні препарати. Встановлено, що генотип *AG*, асоційований з високою експресією гена *TNF- α* (-308), виявлявся значно частіше ($p = 0,019$), а генотип *GG*, асоційований з низькою експресією гена *TNF- α* (-308), у хворих на ПКМ зустрічався значно рідше у зістав-

vation, and PARP cleavage. Thus, it is shown that there are two apoptotic signaling pathways: SAPK/JNK-associated, which is induced by IR and is not affected by IL-6, and SAPK/JNK-independent, which is induced by dexamethasone, associated with the downregulation of MAPK and p70S6K and is inhibited by IL-6.

Research [14] was aimed on investigating the synergistic effect of circularly permuted TRAIL (CPT) – ligand, which induces *TNF*-dependent apoptosis (Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand)), and cycloamine (hemostatic, angioprotective agent) on the proliferation and apoptosis of myeloma cells. TRAIL may be a promising prototype drug for the treatment of PCM. The results of the study showed that the inhibitory effect of cycloamine on the proliferation of RPMI-8226 and SKO-007 human myeloma cell lines was weak. RPMI-8226 cells were sensitive to CPT, but the proliferation of SKO-007 cells was not effectively suppressed by CPT. Thus, SKO-007 cells were considered resistant to cycloamine and CAR and used [14] in the future to evaluate their synergistic effect on myeloma cells of this line. It was shown that the combined action of cycloamine and SAR causes a significant inhibition of the proliferation of cells of the SKO-007 line. Cycloamine enhanced CAP-induced apoptosis in SKO-007 cells and demonstrated synergistic induction of apoptosis in combination with CAP, leading to a reduction in tumor volume. Quantitative PCR showed that cycloamine decreases *GLI1/GLI2/GLI3* mRNA expression levels and increases death receptor 4 expression levels. Summarizing the results obtained in this experimental study, one more promising way of inhibiting proliferation and inducing apoptosis in myeloma cells has been determined.

An important aspect of the pathogenesis of PCM is the presence of cytokine gene polymorphisms, their role as prognostic factors in the course of the disease was confirmed in a study [10]. The relationship between polymorphic gene variants of a number of cytokines, including *TNF- α* and *IFN- γ* , clinical characteristics and the prognosis of the disease in patients who received new therapeutic drugs for the first time was studied. It was established that the *AG* genotype, associated with high expression of the *TNF- α* gene (-308), was found significantly more often ($p = 0.019$), and the *GG* genotype, associated with low expression of the *TNF- α* gene (-308), was

ленні з контролем ($p = 0,012$). Отримані [10] результати свідчать, що *AG* генотип гена *TNF- α* (-308) і *TT* генотип гена *IFN- γ* (+874) пов'язані з ризиком ПКМ, на відміну від поліморфізмів інших досліджуваних цитокінів (transforming growth factor beta-1 (*TGF- β 1*), інтерлейкіну-6 (*IL-6*) та інтерлейкіну-10 (*IL-10*)).

З урахуванням представлених вище даних щодо ролі цитокінів у виникненні і перебігу ПКМ, очевидна їхня роль як чинників, що можуть впливати на ефективність лікування даного захворювання. На сьогодні спектр методів лікування ПКМ достатньо широкий. Однак, незважаючи на успіхи, яких було досягнуто, отримання повної ремісії у пацієнтів залишається складною проблемою [15].

Одним із перспективних сучасних методів лікування ПКМ є аутологічна трансплантація стовбурових гемопоетичних клітин (АТГСК), ефективність якої також певною мірою обумовлена взаємодією цитокінів з мікросередовищем кісткового мозку (КМ) пацієнтів [16]. Оскільки дані щодо кореляції рівнів цитокінів з глибиною відповіді на лікування після проведення трансплантації обмежені, для оцінки ефективності проведення АТГСК і тривалості отриманої ремісії у хворих на ПКМ було вивчено взаємозв'язок клінічних характеристик перебігу захворювання з рівнем ряду цитокінів у периферичній крові (ПК) і КМ [16].

В ретроспективному дослідженні [16] оцінено рівні трьох цитокінів (*TNF- α* , *TGF- β 1* та *IFN- γ*) у суміші периферичних гемопоетичних стовбурових клітин (peripheral hematopoietic stem cells, PHSC), отриманих методом лейкоферезу, у пацієнтів з ПКМ, які були перспективними кандидатами для АТГСК. Проаналізовано зв'язок рівнів цих цитокінів з рядом клініко-гематологічних характеристик пацієнтів: кількістю мобілізованих PHSC CD34⁺ клітини/кг, стадією захворювання, відповіддю на терапію. У пацієнтів, які втратили глибину відповіді (клінічну ремісію) на третьому місяці після АТГСК, підвищувався рівень *IFN- γ* , тоді як у тих, хто досягнув кращої відповіді, рівень *IFN- γ* залишався низьким. При оцінці загальної виживаності і виживаності без прогресування після АТГСК не виявлено статистично значущої кореляції з вмістом *TNF- α* та *TGF- β 1*.

Складність лікування ПКМ зумовила необхідність проведення активних пошуків, спрямованих на розробку нових напрямків і конкретних шляхів, спрямованих на підвищення ефективності лікування ПКМ. Одним із таких підходів є застосування

found in PCM patients significantly less often compared to the control ($p = 0.012$). The results obtained [10] indicate that the *AG* genotype of the *TNF- α* gene (-308) and the *TT* genotype of the *IFN- γ* gene (+874) are associated with the risk of PCM contrary to polymorphisms of other studied cytokines i.e. transforming growth factor beta-1 (*TGF- β 1*), interleukin-6 (*IL-6*) and interleukin-10 (*IL-10*).

Taking into account the data presented above regarding the role of cytokines in the occurrence and course of PCM, their role as factors that can influence the effectiveness of the treatment of this disease is obvious. Today, the range of PCM treatment methods is wide enough. However, despite the successes that have been achieved, receiving the complete remission in patients remains a difficult problem [15].

One of the perspective modern methods of PCM treatment is autologous hematopoietic stem cell transplantation (ATHSC), the effectiveness of which is also determined to some extent by the interaction of cytokines with the microenvironment of the bone marrow (BM) of patients [16]. Since the data on the correlation of cytokine levels with the depth of the response to treatment after the transplantation are limited, in order to assess the effectiveness of ATSC and the duration of remission in PCM patients, the relationship between the clinical characteristics of the course of the disease and the level of a number of cytokines in the peripheral blood (PB) and BM was studied [16].

In a retrospective study [16] the levels of three cytokines (*TNF- α* , *TGF- β 1*, and *IFN- γ*) were evaluated in a mixture of peripheral hematopoietic stem cells (PHSC) obtained by leukapheresis in patients with PCM who were promising candidates for ATHSC. The relationship between the levels of these cytokines and a number of clinical and hematological characteristics of patients was analyzed: the number of mobilized PHSC CD34⁺ cells/kg, the stage of the disease, response to therapy. Patients who lost the depth of response (clinical remission) at the third month after ATHSC had increased *IFN- γ* levels, while in those who achieved a better response, *IFN- γ* levels remained low. When assessing overall survival and progression-free survival after ATHSC, no statistically significant correlation with the content of *TNF- α* and *TGF- β 1* was found.

The complexity of PCM treatment necessitated active research aimed at developing new directions and specific ways to improve the effectiveness of PCM treatment. One of these approaches is the use of the

новітньої CAR-Ts (chimeric antigen receptor T-cells) технології. Численними дослідженнями показано, що T-клітинний рецептор химерного антигену, CAR-Ts, є перспективною стратегією для лікування багатьох видів злоякісних захворювань, у тому числі ПКМ, яка характеризується високою експресією CD38 [17]. Авторами було розроблено новий різновид нанотіла проти CD38 – CD38-CAR. CD3⁺ T-клітини здорових людей трансдукували за допомогою CD38-CAR з ефективністю понад 60 %, що було підтверджено методом проточної цитометрії. CD38-CAR-Ts ефективно проліферували та, за їх активації, синтезували більше прозапальних цитокінів, таких як *IL-2*, *IFN-γ* та *TNF-α*. Показано, що CD38-CAR-Ts були ефективними щодо лізису субстратних клітин CD38⁺, включаючи клітини ліній мієломи LP-1, RPMI 8226, OPM2 і MOLP8, а також субстратних плазматичних клітин, отриманих від хворих на ПКМ. В той же час, CD38-CAR-Ts проявляли дуже низьку цитотоксичність щодо CD38⁺ фракцій T-клітин, B-клітин і природних клітин-кілерів. Таким чином, застосування CD38-CAR-Ts, асоційованих з нанотілом анти-CD38, може бути перспективним підходом до лікування ПКМ [17].

Подальшими дослідженнями було показано, що при лікуванні CAR-T-клітинами, основним спрямуванням є антиген дозрівання B-клітин (B-cell maturation antigen, BCMA), що пригнічує злоякісно трансформовані плазматичні клітини і сприяє їх редукції у пацієнтів з рецидивом/рефрактерною ПКМ [18]. В дослідженні [18] було вивчено ефективність застосування CAR-T-клітинної терапії з використанням BCMA у пацієнтів саме з такою формою захворювання. Показано, що важливу роль у підтриманні резистентності субстратних клітин відіграє *TGF-β*, який пов'язаний з *TNF-α*, і є багатофункціональним цитокіном, експресується на високому рівні та сприяє імуносупресивному впливу на мікрооточення кісткового мозку у хворих на ПКМ, підтримуючи проліферацію пухлинного клону. Поява рецидиву після лікування CAR-T-клітинами обумовлена зниженням регуляції BCMA на клітинах мієломи та/або з появою BCMA-негативних клонів субстратних клітин [19–22]. Однак, у кількох клінічних дослідженнях у пацієнтів також спостерігалась відсутність відповіді та рецидиви, незважаючи на постійну експресію BCMA на субстратних плазматичних клітинах [19, 23–25]. Це свідчить про те, що невдача терапії CAR T-клітинами, ймовірно, може бути результатом недостатньої їх експансії та персистенції, відсутності стійкості або втрати ефективності дії.

Автори [18] припустили, що «захищені» від супресивних ефектів *TGF-β* BCMA CAR-T-клітини будуть

latest CAR-Ts (chimeric antigen receptor T-cells) technology. Numerous studies have shown that T-cell receptor chimeric antigen, CAR-Ts, is a promising strategy for the treatment of many types of malignant diseases, including PCM, which is characterized by high expression of CD38 [17]. The authors developed a new type of nanobody against CD38 – CD38-CAR. CD3⁺ T cells from healthy individuals were transduced with CD38-CAR with over 60 % efficiency as confirmed by flow cytometry. CD38-CAR-Ts efficiently proliferated and, upon their activation, synthesized more pro-inflammatory cytokines, such as *IL-2*, *IFN-γ* and *TNF-α*. CD38-CAR-Ts were shown to be effective in lysing CD38⁺ substrate cells, including myeloma cell lines LP-1, RPMI 8226, OPM2, and MOLP8, as well as substrate plasma cells obtained from PCM patients. At the same time, CD38-CAR-Ts showed very low cytotoxicity against CD38⁺ fractions of T cells, B cells and natural killers. Thus, the use of CD38-CAR-Ts associated with an anti-CD38 nanobody may be a promising approach to the treatment of PCM [17].

Further studies have shown that in CAR-T-cell treatment, the main target is B-cell maturation antigen (BCMA), which inhibits malignantly transformed plasma cells and promotes their reduction in patients with relapsed/refractory PCM [18]. In study [18] the effectiveness of CAR-T cell therapy using BCMA in patients with this form of the disease was studied. It was shown that important role in maintaining the resistance of substrate cells is played by *TGF-β*, which is associated with *TNF-α* and it is a multifunctional cytokine, expressed at a high level and contributes to the immunosuppressive effect on the BM microenvironment in PCM patients, supporting the proliferation of the tumor clone. The occurrence of relapse after treatment with CAR-T cells is due to the downregulation of BCMA on myeloma cells and/or the appearance of BCMA-negative clones of substrate cells [19–22]. However, in several clinical trials, patients also experienced non-response and relapse despite persistent BCMA expression on the substrate plasma cells [19, 23–25]. This suggests that the failure of CAR T-cell therapy is likely to be the result of insufficient expansion and persistence, absence of the stability or loss of effectiveness.

The authors of [18] assumed that «protected» from the suppressive effects of *TGF-β* BCMA

сприяти підвищенню ефективності лікування ПКМ. З цією метою було розроблено новий тип ВСМА CAR-T-клітин, які мають високу стійкість до супресивної дії цього цитокіну. «Захищені» B2ARM CAR-T-клітини успішно витримували інгібування, опосередковане $TGF-\beta$, і більшою мірою сприяли дегрануляції та знищенню клітин-мішеней, секреції цитокінів, забезпечувати надійну активацію, ефекторну диференціацію, персистенцію та поліфункціональність як *in vitro*, так і *in vivo*. Модифіковані B2ARM CAR-T-клітини значно пригнічували клітини лінії мієломи MM.1S, що підтверджено тривалим моніторингом їх цитотоксичного ефекту, навіть за умов наявності високого вмісту $TGF-\beta$, тоді як цитотоксична функція «незахищених» B2 CAR-T-клітин пригнічувалась $TGF-\beta$. Відповідно, показано, що після тривалої дії на субстратні клітини в присутності $TGF-\beta$, B2ARM, CAR-T-клітини були збагачені Granzyme B, CD107a, Ki67 і поліфункціональними T-клітинами, які були подвійно або потрійно позитивні для $IFN-\gamma$, $IL-2$ та/або $TNF-\alpha$, що підтверджено результатами проточної цитометрії.

В експерименті [18] було показано, що у мишей лінії NSG, клітини лінії RPMI-8226 яких надмірно експресували $TGF-\beta$, B2ARM CAR-T-клітини опосередковували 100 % відторгнення клітин пухлини та сприяли кращому виживанню тварин внаслідок вищої інфільтрації пухлин на 7-й день після лікування CAR-T-клітинами (% $CD3^+CAR^+$) і більшої експресії $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, Ki67, Granzyme B і PD-1 порівняно з «незахищеними» B2 CAR-T-клітинами. Узагальнюючи отримані дані, показано, що «захищені» B2ARM CAR-T-клітини забезпечують високу стійкість, проліферацію, багатофункціональність, ефекторну диференціацію та протипухлинну функцію в доклінічних моделях ПКМ, одночасно скасовуючи $TGF-\beta$ -опосередковану супресію. Таким чином, «захищені» B2ARM CAR T-клітини діють більш ефективно і мають переваги при лікуванні даного захворювання, оскільки значно зменшують $TGF-\beta$ -опосередкований вплив мікросередовища на субстратні клітини мієломи.

Підсумовуючи усе вищевикладене, проведений аналіз даних літератури свідчить, що патогенетичні механізми виникнення ПКМ зумовлені комплексним впливом несприятливих екологічних чинників зовнішнього середовища, включаючи ІВ, у взаємозв'язку з ендogenous факторами – порушеннями функціонування мережі цитокінів, зокрема $TNF-\alpha$, що забезпечує взаємодію імунної системи із субстратними плазматичними клітинами. Незважаючи на складність механізмів, які зумовлюють розвиток

CAR T-cells will contribute to increasing the effectiveness of PCM treatment. For this purpose it was developed a new type of BCMA CAR-T cells that are highly resistant to the suppressive effect of this cytokine. «Protected» B2ARM CAR T-cells successfully withstood $TGF-\beta$ -mediated inhibition and promoted degranulation and killing of target cells to a greater extent, cytokine secretion, robust activation, effector differentiation, persistence and polyfunctionality both *in vitro* and *in vivo*. Modified B2ARM CAR-T cells significantly inhibited the MM.1S myeloma cell line, which was confirmed by durable monitoring of their cytotoxic effect, even in the presence of high $TGF-\beta$, while the cytotoxic function of «unprotected» B2 CAR-T cells was inhibited by $TGF-\beta$. Accordingly, it was shown that after prolonged exposure to substrate cells in the presence of $TGF-\beta$, B2ARM, CAR T cells were enriched for Granzyme B, CD107a, Ki67 and polyfunctional T cells that were double or triple positive for $IFN-\gamma$, $IL-2$ and/or $TNF-\alpha$, as confirmed by the results of flow cytometry.

Experiment [18] showed that in RPMI-8226 NSG mice overexpressing $TGF-\beta$, B2ARM CAR-T cells mediated 100 % tumor cell rejection and improved animal survival due to higher tumor infiltration at day 7 after CAR T-cells treatment (% $CD3^+CAR^+$) and higher expression of $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, Ki67, Granzyme B and PD-1 compared to «unprotected» B2 CAR-T-cells. Summarizing the obtained data, it is shown that «protected» B2ARM CAR-T cells provide high resistance, proliferation, multifunctionality, effector differentiation and antitumor function in preclinical models of PCM, while abrogating $TGF-\beta$ -mediated suppression. So, «protected» B2ARM CAR T-cells act more effectively and have advantages in the treatment of this disease, because significantly reduce $TGF-\beta$ -mediated effects of the microenvironment on substrate cells of myeloma.

Summarizing all of the above, the analysis of literature data shows that the pathogenetic mechanisms of the occurrence of PCM are caused by the complex influence of adverse environmental factors, including IR, in conjunction with endogenous factors – dysfunctions of cytokine networks, in particular $TNF-\alpha$, which ensures interaction of the immune system with substrate plasma cells. Despite of the complexity of the mechanisms that lead to the development of PCM, the emergence

ПКМ, появу резистентності в процесі її лікування, на сьогодні активно розробляються нові напрямки вирішення даної проблеми. Впровадження новітніх технологій, зокрема CAR-T-клітинної терапії, є перспективним методом лікування цього захворювання, що дозволить подовжити тривалість життя даної категорії пацієнтів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms / S. H. Swerdlow, E. Campo, S. A. Pileri et al. *Blood*. 2016. Vol. 127, no. 20. P. 2375-2390. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569
2. Рак в Україні, 2019-2020. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби / З. П. Федоренко, Л. О. Гулак, Ю. Й. Михайлович та ін. [Електронний ресурс]. *Бюлетень Національного канцер-реєстру України*. 2021. № 22. Режим доступу: http://ncru.inf.ua/publications/BULL_22/index.htm (дата звернення: 28.03.2023).
3. Hunter N., Haylock R. Radiation risks of lymphoma and multiple myeloma incidence in the updated NRRW-3 cohort in the UK: 1955-2011. *J. Radiol. Prot.* 2022. Vol. 42, no. 1. Art. 011517. doi: 10.1088/1361-6498/abee96.
4. The incidence of leukaemia, lymphoma and multiple myeloma among atomic bomb survivors: 1950-2001 / W.-L. Hsu, D. L. Preston, M. Soda et al. *Radiat. Res.* 2013. Vol. 179, no. 3. P. 361-382. doi: 10.1667/RR2892.1
5. Ionising radiation and risk of death from leukaemia and lymphoma in radiation-monitored workers (INWORKS): an international cohort study / K. Leuraud, D. B. Richardson, E. Cardis et al. *Lancet Haematol.* 2015. Vol. 2, no. 7. P. E276-E281. doi: 10.1016/S2352-3026(15) 00094-0
6. Cancer mortality and incidence following external occupational radiation exposure: an update of the 3rd analysis of the UK national registry for radiation workers / R. G. E. Haylock, M. Gillies, N. Hunter et al. *Br. J. Cancer*. 2018. Vol. 119, no. 5. P. 631-637. doi: 10.1038/s41416-018-0184-9.
7. Occupational radiation and haematopoietic malignancy mortality in the retrospective cohort study of US radiologic technologists, 1983–2012 / M. S. Linet, M. P. Little, C. M. Kitahara et al. *Occup. Environ. Med.* 2020. Vol. 77, no. 12. P. 822-831. doi: 10.1136/oemed-2019-106346.
8. Lymphoma and multiple myeloma in cohorts of persons exposed to ionising radiation at a young age / M. P. Little, R. Wakeford, L. B. Zablotska et al. *Leukemia*. 2021. Vol. 35, no. 10. P. 2906-2916. doi: 10.1038/s41375-021-01284-4.
9. Epidemiology of late health effects in Ukrainian Chernobyl cleanup workers / D. Bazyka, A. Pryszyzhnyuk, N. Gudzenko et al. *Health Phys.* 2018. Vol. 115, no. 1. P. 161-169. doi: 10.1097/HP.0000000000000868
10. Effect of cytokine genes in the pathogenesis and on the clinical parameters for the treatment of multiple myeloma / H. Haydaroglu,

of resistance in the process of its treatment, new ways of solving this problem are being actively developed today. Implementation of the latest technologies, in particular CAR-T cell therapy is promising method of treatment of this disease, which will prolong the life expectancy of this category of patients.

REFERENCES

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569.
2. Fedorenko ZP, Hulak LO, Mykhailovych YuY, Gorokh YeL, Ryzhov AYU, Sumkina OV, Kutsenko LB. Cancer in Ukraine, 2019-2020. Morbidity, mortality, performance indicators of the oncology service [Internet]. *Bulletin of the National Cancer Registry of Ukraine*. 2021.No. 22. Available from: http://ncru.inf.ua/publications/BULL_22/index.htm. Application date: 03/28/2023.
3. Hunter N, Haylock R. Radiation risks of lymphoma and multiple myeloma incidence in the updated NRRW-3 cohort in the UK: 1955-2011. *J Radiol Prot.* 2022;42(1). doi: 10.1088/1361-6498/abee96.
4. Hsu W-L, Preston DL, Soda M, Sugiyama H, Funamoto S, Kodama K, et al. The incidence of leukaemia, lymphoma and multiple myeloma among atomic bomb survivors: 1950-2001. *Radiat Res.* 2013;179(3):361.382. doi: 10.1667/RR2892.1.
5. Leuraud K, Richardson DB, Cardis E, Daniels RD, Gillies M, O'Hagan JA, et al. Ionising radiation and risk of death from leukaemia and lymphoma in radiation-monitored workers (INWORKS): an international cohort study. *Lancet Haematol.* 2015;2(7):276-281. doi: 10.1016/S2352-3026(15)00094-0.
6. Haylock RGE, Gillies M, Hunter N, Zhang W, Phillipson M. Cancer mortality and incidence following external occupational radiation exposure: an update of the 3rd analysis of the UK national registry for radiation workers. *Br J Cancer*. 2018;119(5):631-637. doi: 10.1038/s41416-018-0184-9.
7. Linet MS, Little MP, Kitahara CM, Cahoon EK, Doody MM, Simon SL, et al. Occupational radiation and haematopoietic malignancy mortality in the retrospective cohort study of US radiologic technologists, 1983–2012. *Occup Environ Med.* 2020;77(12):822-831. doi: 10.1136/oemed-2019-106346.
8. Little MP, Wakeford R, Zablotska LB, Borrego D, Griffin KT, Allodji RS, et al. Lymphoma and multiple myeloma in cohorts of persons exposed to ionising radiation at a young age. *Leukemia*. 2021;35(10):2906-2916. doi: 10.1038/s41375-021-01284-4.
9. Bazyka D, Pryszyzhnyuk A, Gudzenko N, Dyagil I, Belyi D, Chumak V, Buzunov V.. Epidemiology of late health effects in Ukrainian Chernobyl cleanup workers. *Health Phys.* 2018;115(1):161-169. doi: 10.1097/HP.0000000000000868.
10. Haydaroglu H, Balci SO, Pehlivan S, Ozd?il? K, Gundogan E, Okan V, et al. Effect of cytokine genes in the pathogenesis and on the

- S. O. Balci, S. Pehlivan et al. *Immunol. Invest.* 2017. Vol. 46, no. 1. P. 10-21. doi: 10.1080/08820139.2016.1208219
11. Yan H., Zheng G., Qu J. et al. Identification of key candidate genes and pathways in multiple myeloma by integrated bioinformatics analysis. *J. Cell Physiol.* 2019. Vol. 234, no. 12. P. 23785-23797. doi: 10.1002/jcp.28947.
 12. Heterogeneity of radiation- and TNF-alpha-induced programmed cell death in carcinoma, sarcoma and lymphoma cell lines / T. Bolling, A. Kolkmeier, B. Greve et al. *Anticancer Res.* 2010. Vol. 30, no. 7. P. 2857-2861.
 13. Chauhan D., Pandey P., Ogata A. Dexamethasone induces apoptosis of multiple myeloma cells in a JNK/SAP kinase independent mechanism. *Oncogene.* 1997. Vol. 15, no. 7. P. 837-843. doi: 10.1038/sj.onc.1201253
 14. Cyclopamine sensitizes multiple myeloma cells to circularly permuted TRAIL-induced apoptosis/ H. Wang, C. H. Geng, H. Zhou et al. *Oncol. Lett.* 2021. Vol. 4. P. 295. doi: 10.3892/ol.2021.12556.
 15. Long-chain polyunsaturated omega-3 fatty acids reduce multiple myeloma exosome-mediated suppression of NK cell cytotoxicity / M. Moloudizargari, F. Redegeld, M. H. Asghari et al. *Daru.* 2020. Vol. 28, no. 2. P. 647-659. doi: 10.1007/s40199-020-00372-7.
 16. Interferon-gamma in mobilized stem cells: A possible prognostic marker in early post-transplant management in multiple myeloma / L. N. G. F. Martins, A. A. Morita, G. E. Broto et al. *Cytokine.* 2018. Vol. 108. P. 127-135. doi: 10.1016/j.cyto.2018.03.006.
 17. Anti-multiple myeloma activity of nanobody-based anti-CD38 chimeric antigen receptor T cells / N. An, Y. N. Hou, Q. X. Zhang et al. *Mol. Pharm.* 2018. Vol. 15, no. 10. P. 4577-4588. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00584.
 18. Armored BCMA CAR T cells eliminate multiple myeloma and are resistant to the suppressive effects of TGF- β / L. M. Alabanza, Y. Xiong, B. Vu et al. *Front. Immunol.* 2022. Vol. 13. P. 832645. doi: 10.3389/fimmu.2022.832645.
 19. Garcia-Guerrero E., Sierro-Martinez B., Perez-Simon J. A. Overcoming chimeric antigen receptor (CAR) modified T-cell therapy limitations in multiple myeloma. *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 1128. doi: 10.3389/fimmu.2020.01128.
 20. T cells genetically modified to express an anti-B-cell maturation chimeric antigen receptor cause remissions of poor-prognosis relapsed multiple myeloma / J. N. Brudno, I. Maric, S. D. Hartman et al. *J. Clin. Oncol.* 2018. Vol. 36, no. 22. P. 2267-2280. doi: 10.1200/JCO.2018.77.8084.
 21. B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma / A. D. Cohen, A. L. Garfall, E. A. Stadtmauer et al. *J. Clin. Invest.* 2019. Vol. 129, no. 6. P. 2210-21. doi: 10.1172/JCI126397.
 22. T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma / S. A. Ali, V. Shi, I. Maric et al. *Blood.* 2016. Vol. 128, no. 13. P. 1688-1700. doi: 10.1182/blood-2016-04-711903.
 - clinical parameters for the treatment of multiple myeloma. *Immunol. Invest.* 2017;46(1):10-21. doi: 10.1080/08820139.2016.1208219.
 11. Yan H, Zheng G, Qu J, Liu Y, Huang X, Zhang E, Cai Z. Identification of key candidate genes and pathways in multiple myeloma by integrated bioinformatics analysis. *J Cell Physiol.* 2019;234(12):23785-23797. doi: 10.1002/jcp.28947.
 12. Bolling T, Kolkmeier A, Greve B, Ernst I, Willich N, Konemann S. Heterogeneity of radiation- and TNF-alpha-induced programmed cell death in carcinoma, sarcoma and lymphoma cell lines. *Anticancer Res.* 2010;30(7):2857-2861.
 13. Chauhan D, Pandey P, Ogata A, Teoh G, Treon S, Urashima M, et al. Dexamethasone induces apoptosis of multiple myeloma cells in a JNK/SAP kinase independent mechanism. *Oncogene.* 1997; 15(7):837-843. doi: 10.1038/sj.onc.1201253.
 14. Wang H, Geng CH, Zhou H, Zhang Z, Chen W. Cyclopamine sensitizes multiple myeloma cells to circularly permuted TRAIL-induced apoptosis. *Oncol Lett.* 2021;4:295. doi: 10.3892/ol.2021.12556.
 15. Moloudizargari M, Redegeld F, Asghari MH, Mosaffa N, Mortaz E. Long-chain polyunsaturated omega-3 fatty acids reduce multiple myeloma exosome-mediated suppression of NK cell cytotoxicity. *Daru.* 2020;28(2):647-659. doi: 10.1007/s40199-020-00372-7.
 16. Martins LNGF, Morita AA, Broto GE, Takakura E, da Silva SS, Tomiotto-Pellissier F, et al. Interferon-gamma in mobilized stem cells: A possible prognostic marker in early post-transplant management in multiple myeloma. *Cytokine.* 2018;108:127-135. doi: 10.1016/j.cyto.2018.03.006.
 17. An N, Hou YN, Zhang QX, Li T, Zhang QL, Fang C, et al. Anti-multiple myeloma activity of nanobody-based anti-CD38 chimeric antigen receptor T cells. *Mol Pharm.* 2018;15(10):4577-4588. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00584.
 18. Alabanza LM, Xiong Y, Vu B, Webster B, Wu D, Hu P, et al. Armored BCMA CAR T cells eliminate multiple myeloma and are resistant to the suppressive effects of TGF- β . *Front Immunol.* 2022;13:832645. doi: 10.3389/fimmu.2022.832645.
 19. Garcia-Guerrero E, Sierro-Martinez B, Perez-Simon JA. Overcoming chimeric antigen receptor (CAR) modified T-cell therapy limitations in multiple myeloma. *Front Immunol.* 2020;11:1128. doi: 10.3389/fimmu.2020.01128.
 20. Brudno JN, Maric I, Hartman SD, Rose JJ, Wang M, Lam N, et al. T cells genetically modified to express an anti-B-cell maturation chimeric antigen receptor cause remissions of poor-prognosis relapsed multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2018;36(22):2267-2280. doi: 10.1200/JCO.2018.77.8084.
 21. Cohen AD, Garfall AL, Stadtmauer EA, Melenhorst JJ, Lacey SF, Lancaster E, et al. B cell maturation antigen-specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. *J Clin Invest.* 2019;129(6): 2210-2221. doi: 10.1172/JCI126397.
 22. Ali SA, Shi V, Maric I, Wang M, Stroncek DF, Rose JJ, et al. T cells expressing an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of multiple myeloma. *Blood.* 2016; 128(13):1688-1700. doi: 10.1182/blood-2016-04-711903.

23. A Phase 1, open-label study of LCAR-B38M, a chimeric antigen receptor T cell therapy directed against B cell maturation antigen, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma / W. H. Zhao, J. Liu, B. Y. Wang et al. *J. Hematol. Oncol.* 2018. Vol. 11, no. 1. P. 141. doi: 10.1186/s13045-018-0681-6.
24. Anti-BCMA CAR T-cell therapy Bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma / N. Raje, J. Berdeja, Y. Lin et al. *New Engl. J. Med.* 2019. Vol. 380, no. 18. P. 1726-37. doi: 10.1056/NEJMoa1817226.
23. Zhao WH, Liu J, Wang BY, Chen YX, Cao XM, Yang Y, et al. A Phase 1, open-label study of LCAR-B38M, a chimeric antigen receptor T cell therapy directed against B cell maturation antigen, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *J Hematol Oncol.* 2018; 11(1):141. doi: 10.1186/s13045-018-0681-6.
24. Raje N, Berdeja J, Lin Y, Siegel D, Jagannath S, Madduri D, et al. Anti-BCMA CAR T-cell therapy Bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma. *New Engl J Med.* 2019;380(18):1726-37. doi: 10.1056/NEJMoa1817226.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

Тетяна Федорівна Любарець – доктор медичних наук, професор, професор кафедри загальної практики (сімейної медицини) Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, Київ, Україна, ORCID: 0000-0002-3804-6106

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Tetiana F. Liubarets – Doctor of Medical Sciences, Professor, Professor of the Department of General Practice (Family Medicine) of the Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine, ORCID ID: 0000-0002-3804-6106

Стаття надійшла до редакції 02.05.2023

Received: 02.05.2023