

**ОЦЕНКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА CD34+
ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ**

Пашкина Е. А.¹,
Актанова А. А.¹,
Быкова М. В.¹,
Скачков И. П.¹,
Пронкина Н. В.¹,
Денисова В. В.¹,
Козлов В. А.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Лаборатория клинической иммунопатологии.

EVALUATION OF THE SUBPOPULATION COMPOSITION OF CD34+ PLURIPOTENT HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN BLOOD CANCERS

Pashkina E. A.^a,
Aktanova A. A.^a,
Bykova M. V.^a,
Skachkov I. P.^a,
Pronkina N. V.^a,
Denisova V. V.^a,
Kozlov V. A.^a

^a Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology", Laboratory of Clinical Immunopathology.

Резюме

Введение. В течение последних десятилетий заболеваемость злокачественными заболеваниями крови неуклонно возрастает. В отличие от многих других видов злокачественных новообразований, гемобластозы часто встречаются в молодом возрасте, а также являются основной причиной смертей среди всех патологий кроветворной ткани у пациентов детского возраста. Причиной гемобластоза является мутационный процесс в гемопоэтических стволовых клетках, приводящий в дальнейшем к росту численности опухолевого клона и вытеснению здоровых клеток в занимаемых ими нишах, что приводит к ряду изменений в крови и костном мозге, в том числе необратимых.

Целью данного исследования была оценка субпопуляционного состава плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток при гемобластозах и у условно-здоровых доноров.

Материалы и методы. В исследование были включены пациенты с гемобластозами (n=13), проходящие лечение в Клинике иммунопатологии НИИФКИ, в том числе пациенты с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) n=3, острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) n=3 и пациенты с множественной миеломой (ММ) n=7, а также условно-здоровые доноры (n=4). Оценка фенотипического состава гемопоэтических CD34⁺CD38⁻ плюрипотентных клеток проводилась с помощью проточной цитометрии, использовались следующие моноклональные антитела: CD34 APC (BioLegend, США), CD38 PE-Cy7 (ElabScience, Китай), CD45RA PerCP (ElabScience, Китай), CD90 APC-Cy7 (Cloud-Clone Corp., США), Lin- (коктейль CD3/14/16/19/20/56) FITC (BioLegend, США). Проводилась оценка следующих популяций: гемопоэтические стволовые клетки (Lin-CD34+CD38-CD45RA-CD90+) и плюрипотентные предшественники (Lin-CD34+CD38-CD45RA-CD90-).

Результаты. Было показано, что у пациентов со всеми исследуемыми вариантами гемобластозов по сравнению с донорами возрастает относительное количество клеток с фенотипом Lin-CD34+CD38-CD45RA-CD90+, что соответствует гемопоэтическим стволовым клеткам, а не плюрипотентным клеткам-предшественникам. При этом количество плюрипотентных клеток-предшественников имеет тенденцию к снижению при остром миелоидном лейкозе.

Выводы. Обнаружено, что у пациентов с гемобластозами при сравнении с условно-здоровыми донорами наблюдаются изменения в субпопуляционном составе плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток.

Ключевые слова: Гемобластозы, множественная миелома, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, гемопоэтическая стволовая клетка.

Abstract

Introduction. Over the past decades, the incidence of malignant blood diseases has been steadily increasing. Unlike many other types of malignant neoplasms, blood cancers often occur at a young age, and are also the main cause of death among all pathologies of the hematopoietic tissue in pediatric patients. The cause of blood cancers is a mutation process in hematopoietic stem cells, which subsequently leads to an increase in the number of tumor clones and the displacement of healthy cells in the niches they occupy, which leads to a number of changes in the blood and bone marrow, including irreversible ones.

The aim of this study was to assess the subpopulation composition of pluripotent hematopoietic stem cells in patients with blood cancers and healthy donors. **Materials and methods.** The study included patients blood cancers (n = 13), including patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) n=3, acute myeloid leukemia (AML) n=3 and patients with multiple myeloma (MM) n=7, and healthy donors (n = 4). The phenotypic composition of hematopoietic CD34+CD38- pluripotent cells was assessed by flow cytometry using the following monoclonal antibodies: CD34 APC (BioLegend, USA), CD38 PE-Cy7 (ElabScience, China), CD45RA PerCP (ElabScience, China), CD90 APC-Cy7 (Cloud-Clone Corp., USA), Lin- (cocktail CD3/14/16/19/20/56) FITC (BioLegend, USA). The following populations were assessed: hematopoietic stem cells (Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺) and pluripotent progenitors (Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁻).

Results. It was shown that in patients with hemoblastoses, the relative number of cells with the Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺ phenotype increases, which corresponds to hematopoietic stem cells, but not pluripotent progenitor cells. At the same time, the number of pluripotent progenitor cells tends to decrease in acute myeloid leukemia.

Conclusions. It was found that in patients with blood cancers, when compared with healthy donors, changes in the subpopulation composition of pluripotent hematopoietic stem cells are observed.

Keywords: Hemoblastoses, multiple myeloma, acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, hematopoietic stem cell.

1 Введение

Гемобластозы являются одним из распространенных видов онкологии, заболеваемость которыми неуклонно возрастает в последние десятилетия [1]. В отличие от многих других видов злокачественных новообразований, гемобластозы часто встречаются в молодом возрасте, а также являются основной причиной смертей среди всех патологий кроветворной ткани у пациентов детского возраста [2]. Все гемобластозы – это результат мутационного процесса в гемопоэтических клетках, вследствие чего происходит неограниченный рост пула опухолевых клеток. Основной нишей, где может осуществляться злокачественное преобразование, является костный мозг, он же будет в дальнейшем играть ключевую роль в формировании опухолевого микроокружения при ряде гемобластозов [3,4]

Тем не менее, влияние как самого заболевания, так и различных вариантов терапии изучено мало. Немногочисленные данные свидетельствуют об изменениях, наблюдаемых при оценке состава различных ростков кроветворения, было показано, что при хроническом лимфолейкозе отмечалось повышение количества CD34⁺CD38⁻ плюрипотентных клеток у пациентов [5]. В то же время, изменение субпопуляционного состава гемопоэтических стволовых клеток у пациентов может влиять на баланс между различными ростками кроветворения, что может в дальнейшем иметь важное прогностическое значение при восстановлении иммунной системы в ходе терапии и оценке риска развития рецидива.

2 Материалы и методы

В качестве материала исследования служили образцы гемопоэтические стволовые клетки пациентов с гемобластозами и условно-здоровых доноров. Критерии включения лиц в исследование: пациенты с гемобластозами обоего пола в возрасте 18–65 лет, проходящие лечение в клинике иммунопатологии НИИФКИ, либо здоровые лица обоего пола, выступающие в качестве доноров при проведении аллогенной трансплантации стволовых кроветворных клеток 18-65 лет без аутоиммунных, онкологических и хронических рецидивирующих вирусных инфекций; наличие письменного информированного согласия (пациенты и доноры). Всего в исследование вошло 4 донора и 13 пациентов, в том числе пациенты с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) n=3, острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) n=3 и пациенты с множественной миеломой (ММ) n=7. На момент проведения исследования пациенты находились в практически полной ремиссии либо очень хорошей ремиссии, при этом минимальная остаточная болезнь не наблюдалась у пациентов с ОЛЛ, но при этом присутствовала у всех пациентов с ОМЛ и 6 пациентов с ММ. Мононуклеарные клетки костного мозга либо сепарат CD34⁺ клеток окрашивали конъюгированными с флуорохромами моноклональными антителами к поверхностным маркерам в рекомендуемом производителем количестве в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. Использовались следующие моноклональные антитела: коктейль к линейным маркерам: CD34 APC (BioLegend, США), CD38 PE-Cy7

(ElabScience, Китай), CD45RA PerCP (ElabScience, Китай), CD90 APC-Cy7 (Cloud-Clone Corp., США), Lin⁻ (коктейль CD3/14/16/19/20/56) FITC (BioLegend, США). Далее клетки отмывали 1 мл раствора PBS с 0,02% EDTA и 0,5% FCS (Staining Buffer) при 1200 об/мин. в течение 5 минут. Анализ проб проводили в 200 мкл Staining Buffer. Методом проточной цитометрии проводилась оценка следующих популяций: гемопоэтические стволовые клетки (Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺) и плюрипотентные предшественники (Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁻).

Анализ проводили на проточном цитофлуориметре на проточном цитофлуориметре LongCyte (Challenbio, Китай) в программном обеспечении ModelFlower (Challenbio, Китай).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.0.0. Тест Фридмана использовали для оценки различий между группами, где значение $p < 0,05$ считали статистически значимым.

3 Результаты и обсуждение

Нами была проведена оценка субпопуляционного состава Lin⁻CD34⁺CD38⁻ клеток, которые, как известно, среди CD34⁺ обладают плюрипотентностью. В первую очередь нами было обнаружено, что у пациентов с ММ, ОМЛ и ОЛЛ повышено количество истинных гемопоэтических стволовых клеток по сравнению с донорами (рис.1).

Согласно литературным данным, популяция Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺ обладает повышенной способностью к самообновлению [5]. Следовательно, при гемобластозах клетки в большей степени сохраняют фенотип данных клеток, а не стремятся к дифференцировке в том или ином направлении.

Далее мы оценивали относительное количество Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁻ плюрипотентных клеток-предшественников у пациентов с гемобластозами и у здоровых доноров (рис. 2) среди популяции Lin⁻CD34⁺CD38⁻.

Было обнаружено, что у пациентов с ОМЛ наблюдалось статистически значимое снижение количества плюрипотентных предшественников. При этом у пациентов с ОЛЛ снижение указанных клеток носило характер тенденции ($p < 0,09$). Предположительно, данная популяция может содержать в своем составе стволовые клетки лейкемии (СКЛ) при ОМЛ [5,6,7]. Также следует отметить, что при В-клеточном ОЛЛ в качестве СКЛ рассматривают CD19⁺CD34⁺CD38⁻ клетки, обладающие схожим фенотипом [8].

Было показано, что среди CD34⁺CD38⁻ клеток у доноров значительно преобладают плюрипотентные предшественники, тогда как при гемобластозах данное преобладание сглаживается, и при ОМЛ доли гемопоэтических стволовых клеток и плюрипотентных клеток-предшественников, начавших дифференцировку, практически равны. Возможно, подобное изменение соотношения является следствием проводимой терапии либо формированием

опухолевого микроокружения в тканях костного мозга, либо изначально измененным балансом в гемопоэзе у пациентов.

4 Выводы

Таким образом, было продемонстрировано, что у пациентов с гемобластозами при сравнении со здоровыми донорами наблюдаются изменения в субпопуляционном составе плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток.

Благодарности

Выполнено при финансовой поддержке от Правительства Новосибирской области, соглашение № МЛ-1 от 26 октября 2023 г.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Плюрипотентные предшественники.

Figure 1. Pluripotent progenitors.

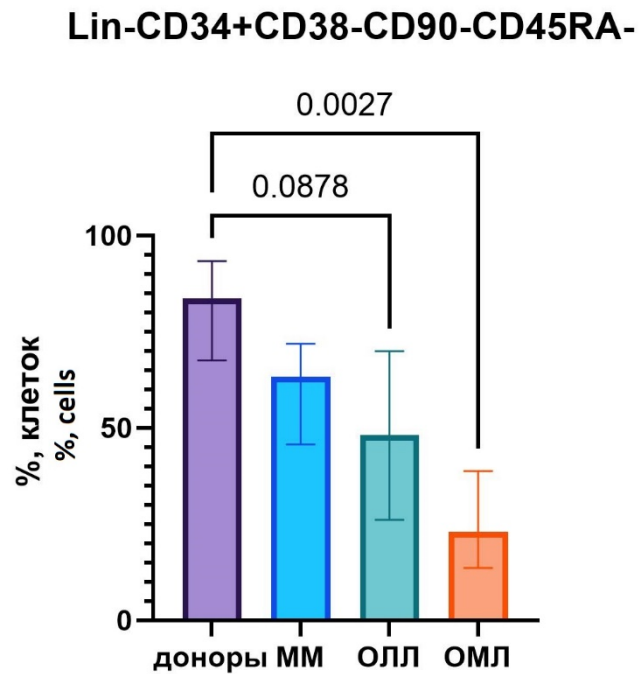
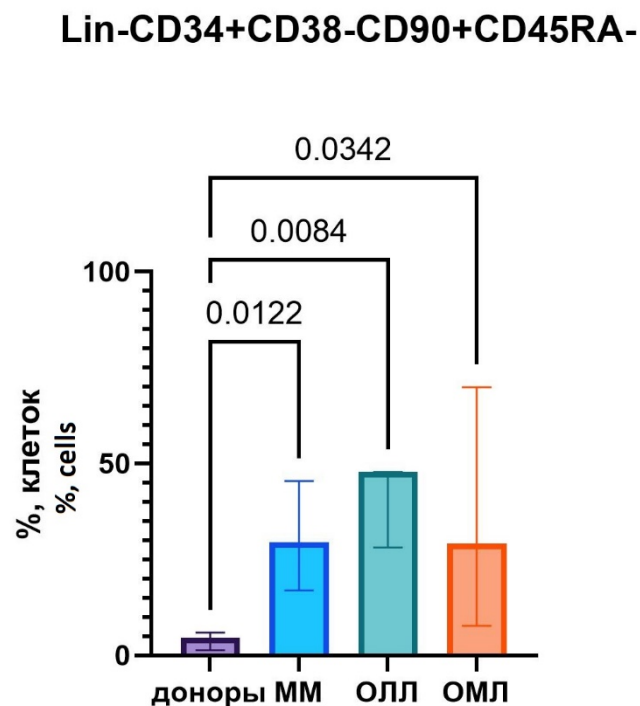


Рисунок 2. Плюрипотентные гемопоэтические стволовые клетки.

Figure 2. Pluripotent hematopoietic stem cells.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Пашкина Екатерина Александровна, к.б.н., заведующий лабораторией;

адрес: 630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14;

телефон: 8(383)227-01-35;

e-mail: pashkina.e.a@yandex.ru

Pashkina Ekaterina Aleksandrovna, PhD, Head of Laboratory;

address: 630099, Russia, Novosibirsk, Yadrintsevskaya st., 14;

telephone: 8(383)227-01-35;

e-mail: pashkina.e.a@yandex.ru

Блок 2. Информация об авторах

Актанова Алина Александровна, научный сотрудник;

Aktanova Alina Aleksandrovna, Researcher;

Быкова Мария Владимировна, младший научный сотрудник;

Bykova Maria Vladimirovna, Junior Researcher;

Скачков Иван Павлович, лаборант-исследователь;

Skachkov Ivan Pavlovich, Laboratory Assistant;

Пронкина Наталья Викторовна, к.м.н., заведующий лабораторией;

Pronkina Natalya Viktorovna, PhD, Head of Laboratory;

Денисова Вера Васильевна, к.м.н., заведующий отделением;

Denisova Vera Vasilievna, PhD, Head of Department;

Козлов Владимир Александрович, д.м.н., проф., академик РАН, научный руководитель НИИФКИ;

Russian Journal of Immunology (Russia)

ISSN 1028-7221 (Print)

ISSN 2782-7291 (Online)

Kozlov Vladimir Aleksandrovich, MD, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Scientific Director.

Блок 3. Метаданные статьи

ОЦЕНКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА CD34+ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ

EVALUATION OF THE SUBPOPULATION COMPOSITION OF CD34+ PLURIPOTENT HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN BLOOD CANCERS

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

CD34+CD38- КЛЕТКИ ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ

CD34+CD38- CELLS IN HEMOBLASTOSES

Ключевые слова: Гемобластозы, множественная миелома, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, гемопоэтическая стволовая клетка.

Keywords: Hemoblastoses, multiple myeloma, acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, hematopoietic stem cell.

Иммунологические чтения в Челябинске.

Количество страниц текста – 3,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 2.

30.03.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Литвицкий П. Ф., Жевак Т. Н. Гемобластозы. Лейкозы лимфоидного происхождения. Вопросы современной педиатрии. 2016; 15 (5): 457–470.	Litvitsky P.F., Zhevak T.N. HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES. LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA. <i>Current Pediatrics</i> . 2016;15(5):457-470. (In Russ.)	doi: 10.15690/vsp.v15i5.1620
2	Мовчан Л.В., Шман Т.В. АНАЛИЗ КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК С ФЕНОТИПОМ CD34+CD38- И CD34+CD38-CD19+ В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ОСТРОМ ЛИМФОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ. <i>Проблемы здоровья и экологии</i> . 2011;(2S):66-69	Movchan L.V., Shman T.V. ANALYSIS OF THE NUMBER OF CELLS WITH CD34+CD38- AND CD34+CD38-CD19+ PHENOTYPES AS POTENTIAL LEUKEMIC STEM CELLS IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA IN CHILDREN. <i>Health and Ecology Issues</i> . 2011;(2S):66-69. (In Russ.)	https://doi.org/10.15372/SSMJ20190116
3	Ругаль В.И., Бессмельцев С.С., Семенова Н.Ю., Грицаев С.В.,	Rugal V.I., Bessmeltsev S.S., Semenova N.Yu., Gritsaev S.V.,	https://doi.org/10.15372/SSMJ20190116

	Кострома И.И., Енукашвили Н.И., Чубарь А.В., Иволгин Д.А. (2019). Характеристика микроокружения костного мозга при множественной миеломе до и после терапии. Сибирский научный медицинский журнал, 39 (1), 112-118.	Kostroma I.I., Enukashvili N.I., Chubar A.V., Ivolgin D.A. CHARACTERISTICS OF BONE MARROW MICROENVIRONMENT IN MULTIPLE MYELOMA BEFORE AND AFTER TREATMENT. <i>Сибирский научный медицинский журнал</i> . 2019;39(1):112-118. (In Russ.)	
4	KW. Christopherson, LA. Paganessi, DR. Rhoades, HM. Dillon, S Gezer, ML. Larson, H C. Fung, S A. Gregory; Abnormally High Levels of Circulating CD34 ⁺ CD38 ⁻ , CD34 ⁺ CD38 ⁺ , and CD10 ⁺ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells in the Peripheral Blood of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL) Patients Suggest the Presence of Additional Therapeutic Target Cells.. <i>Blood</i> 2007; 110 (11): 4711.	-	doi: https://doi.org/10.1182/blood.V110.11.4711.4711
5	Dander E, Palmi C, D'Amico G, Cazzaniga G. The Bone Marrow Niche in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: The Role of Microenvironment from Pre-Leukemia	-	doi: 10.3390/ijms22094426

	to Overt Leukemia. Int J Mol Sci. 2021 Apr 23;22(9):4426.		
6	Reuvekamp T, Ngai LL, den Hartog D, Carbaat-Ham J, Fayed MMHE, Scholten WJ, et al. CD34+CD38- leukemia stem cells predict clinical outcomes in acute myeloid leukemia patients treated non-intensively with hypomethylating agents. Leukemia. 2025 Apr;39(4):972-975.	-	https://doi.org/10.1038/s41375-025-02539-0
7	Zeijlemaker W, Grob T, Meijer R, Hanekamp D, Kelder A, Carbaat-Ham JC, et al. CD34 ⁺ CD38 ⁻ leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. Leukemia. 2019 May;33(5):1102-1112.	-	doi: 10.1038/s41375-018-0326-3.
8	Zhang, N., Wu, J., Wang, Q. et al. Global burden of hematologic malignancies and evolution patterns over the past 30 years. Blood Cancer J. 13, 82 (2023).	-	https://doi.org/10.1038/s41408-023-00853-3

