Российский иммунологический журнал
2025, Т. 28, № 3, стр. 805-810

Краткие сообщения
Short communications

Russian Journal of Immunology / Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal
2025, Vol. 28, № 3, pp. 805-810

ОЦЕНКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА CD34$^+$ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ

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

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

Резюме. 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. 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$^-$). 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. Обнаружено, что у пациентов с гемобластозами при сравнении с ус-

Адрес для переписки:
Пашкина Екатерина Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
E-mail: pashkina.e.a@yandex.ru

Address for correspondence:
Ekaterina A. Pashkina
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaya St
Novosibirsk,
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 227-01-35.
E-mail: pashkina.e.a@yandex.ru

Образец цитирования:
Е.А. Пашкина, А.А. Актанова, М.В. Быкова, И.П. Скачков, Н.В. Пронкина, В.В. Денисова, В.А. Козлов «Оценка субпопуляционного состава CD34$^+$ плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток при гемобластозах» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 805-810. doi: 10.46235/1028-7221-17198-SPO

© Пашкина Е.А. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:
E.A. Pashkina, A.A. Aktanova, M.V. Bykova, I.P. Skachkov, N.V. Pronkina, V.V. Denisova, V.A. Kozlov "Subpopulation profile of CD34$^+$ pluripotent hematopoietic stem cells in blood malignancies", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 805-810. doi: 10.46235/1028-7221-17198-SPO

© Pashkina E.A. et al., 2025
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17198-SPO

ловно- 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

SUBPOPULATION PROFILE OF CD34$^+$ PLURIPOTENT HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN BLOOD MALIGNANCIES

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

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The incidence of malignant blood diseases has been steadily increasing over past decades. Unlike many other types of malignant neoplasms, blood cancers often occur at a young age, being also the main cause of death among all hematopoietic disorders in pediatric patients. Mutation events in hematopoietic stem cells are the cause of blood cancers which subsequently lead to increasimg number of tumor clones and displacement of healthy cells in the niches they occupy thus leading to a number of changes in 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. The study included patients with blood cancers (n = 13), including acute lymphoblastic leukemia (ALL; n = 3), acute myeloid leukemia (AML; n = 3), and multiple myeloma (MM; n = 7), as well as 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$^-$). In patients with hemoblastoses, the relative number of cells with Lin$^-$CD34$^+$CD38$^-$CD45RA$^-$CD90$^+$ phenotype proved to be increased, thus corresponding to hematopoietic stem cells, but not pluripotent progenitor cells. At the same time, the number of pluripotent progenitor cells tended to decrease in acute myeloid leukemia. We have observed some changes in the subpopulation composition of pluripotent hematopoietic stem cells in patients with blood cancers, when compared with healthy donors.

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

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

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 оценки риска развития рецидива.

Материалы и методы

В качестве материала исследования служили образцы гемопоэтических стволовых клеткок 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 (CloudClone Corp., США), Lin^- (коктейль CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) 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.

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.

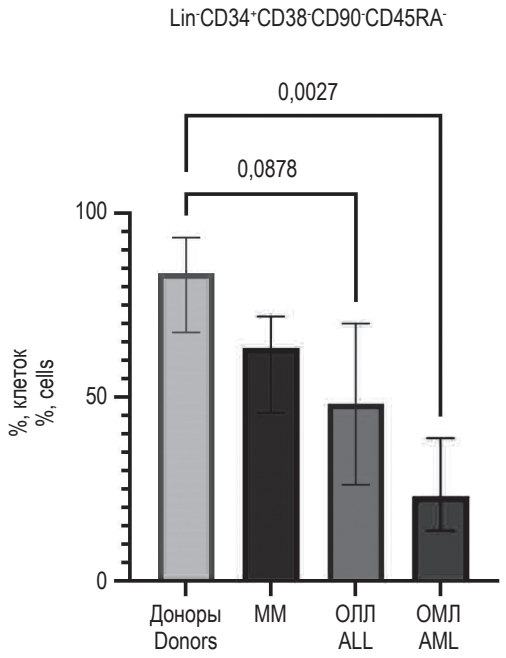

Рисунок 1. Плюрипотентные предшественники

Figure 1. Pluripotent progenitors

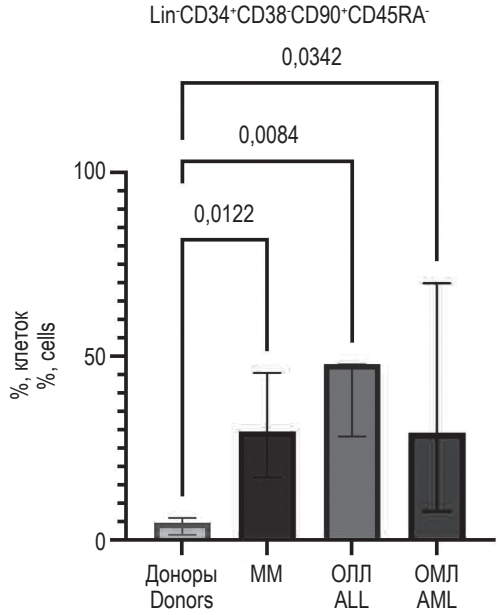

Рисунок 2. Плюрипотентные гемопоэтические стволовые клетки

Figure 2. Pluripotent hematopoietic stem cells

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.

Выводы

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

Список литературы / References

1. Литвицкий П.Ф., Жевак Т.Н. Гемобластозы. Лейкозы лимфоидного происхождения // Вопросы современной педиатрии. 2016. Т. 15, № 5. С. 457-470. [Litvitsky P.F., Zhevak T.N. Hematological malignancies. lymphocytic leukaemia. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics, 2016, Vol. 15, no. 5, pp. 457-470.* (In Russ.)]

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 // Проблемы здоровья и экологии, 2011. №2S. С. 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. *Problemy zdorovya i ekologii = Health and Ecology Issues, 2011, no. 2S, pp. 66-69.* (In Russ.)]

3. Ругаль В.И., Бессмельцев С.С., Семенова Н.Ю., Грицаев С.В., Кострома И.И., Енукашвили Н.И., Чубарь А.В., Иволгин Д.А. Характеристика микроокружения костного мозга при множественной миеломе до и после терапии // Сибирский научный медицинский журнал, 2019. Т. 39, № 1. С. 112-118. [Rugal V.I., Bessmeltsev S.S., Semenova N.Yu., Gritsaev S.V., Kostroma I.I., Enukashvili N.I., Chubar A.V., Ivolgin D.A. Characteristics of bone marrow microenvironment in multiple myeloma before and after treatment. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal, 2019, Vol. 39, no. 1, pp. 112-118.* (In Russ.)]

4. Christopherson K.W., Paganessi L.A., Rhoades D.R., Dillon H.M., Gezer S., Larson M.L., Fung H.C., Gregory S.A. 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. *Blood, 2007, Vol. 110, no. 11, 4711.* doi: 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 to overt leukemia. *Int. J. Mol. Sci., 2021, Vol. 22, no. 9, 4426.* doi: 10.3390/ijms22094426.

6. Reuvekamp T., Ngai L.L., den Hartog D., Carbaat-Ham J., Fayed M.M.H.E., Scholten W.J., Mocking T.R., Chitu D.A., Pabst T., Klein S.K., Stussi G., Griskevicius L., Breems D., van Lammeren-Venema D., Boersma R., Ossenkoppele G.J., van de Loosdrecht A.A., Bachas C., Huls G., de Leeuw D.C., Cloos J. CD34+CD38- leukemia stem cells predict clinical outcomes in acute myeloid leukemia patients treated non-intensively with hypomethylating agents. *Leukemia, 2025, Vol. 39, no. 4. pp. 972-975.*

7. Zeijlemaker W., Grob T., Meijer R., Hanekamp D., Kelder A., Carbaat-Ham J.C., Oussoren-Brockhoff Y.J.M., Snel A.N., Veldhuizen D., Scholten W.J., Maertens J., Breems D.A., Pabst T., Manz M.G., van der Velden V.H.J., Slomp J., Preijers F., Cloos J., van de Loosdrecht A.A., Löwenberg B., Valk P.J.M., Jongen-Lavrencic M., Ossenkoppele G.J., Schuurhuis G.J. CD34+CD38- leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia, 2019, Vol. 33, no. 5. pp. 1102-1112.*

8. Zhang N., Wu J., Wang Q., Liang Y., Li X., Chen G., Ma L., Liu X., Zhou F. Global burden of hematologic malignancies and evolution patterns over the past 30 years. *Blood Cancer J., 2023, Vol. 13, no. 1. 82.* doi: 10.1038/s41408-023-00853-3.

Авторы:

Пашкина Е.А. *— к.б.н., заведующая лабораторией клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия*

Актанова А.А. *— научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия*

Быкова М.В. *— младший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия*

Authors:

Pashkina E.A., *PhD (Biology), Head, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

Aktanova A.A., *Researcher, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

Bykova M.V., *Junior Researcher, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

Скачков И.П. *— лаборант-исследователь лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия*

Пронкина Н.В. *— к.м.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия*

Денисова В.В. *— к.м.н., заведующая отделением гематологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия*

Козлов В.А. *— д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия*

Skachkov I.P., *Laboratory Assistant, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

Pronkina N.V., *PhD (Medicine), Head, Laboratory of Clinical Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

Denisova V.V., *PhD (Medicine), Head, Department of Hematology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

Kozlov V.A., *PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Scientific Director, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

Поступила 30.03.2025
Принята к печати 11.05.2025

Received 30.03.2025
Accepted 11.05.2025