



Мовчан Л.В.✉, Шман Т.В., Ивуть У.С.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Содержание лейкозных стволовых клеток в костном мозге пациентов с различными вариантами острого миелоидного лейкоза

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Мовчан Л.В. – концепция и дизайн исследования, обработка данных, написание текста; Шман Т.В. – концепция и дизайн исследования, обработка данных, редактирование; Ивуть У.С. – сбор данных, обзор литературы.

Подана: 03.10.2023

Принята: 09.01.2024

Контакты: movchan-l@mail.ru

Резюме

Цель. Определить количество потенциальных лейкозных стволовых клеток и оценить их содержание в зависимости от клинических факторов и биологических особенностей острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) у пациентов детского возраста.

Материалы и методы. В исследование были включены 63 пациента с первично установленным диагнозом ОМЛ, получавших лечение в рамках протокола ОМЛ-ММ-2014 и ОМЛ-ММ-2021. Анализ количественного содержания лейкозных стволовых клеток по фенотипу CD34⁺CD38⁻ проводили в образцах костного мозга с помощью 7–10-цветной проточной цитофлуориметрии на момент диагностики заболевания.

Результаты. Выявлено, что количество CD34⁺CD38⁻ значительно выше при ОМЛ, относящихся к M0, M1, M2 FAB-вариантам, по сравнению с M7, M5. Содержание лейкозных стволовых клеток значительно выше у пациентов с наличием экспрессии на опухолевых клетках таких маркеров, как CD34, CD123, CD13, HLA-DR, CD25, CD200. Установлено, что статистически значительно выше количество CD34⁺CD38⁻ клеток у пациентов с наличием молекулярно-генетических перестроек AML1/ETO, CBFB-MYH11 в лейкоэмических клетках по сравнению с перестройкой FLT3-ITD и отсутствием исследуемых перестроек.

Заключение. Метод многоцветной проточной цитометрии позволяет идентифицировать лейкозные стволовые клетки у пациентов с ОМЛ. Установлена взаимосвязь содержания лейкозных стволовых клеток с морфологическими FAB-вариантами лейкоза, с экспрессией на опухолевых клетках определенных линейно-специфичных и aberrантных маркеров, а также с молекулярно-генетическими перестройками.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, лейкозные стволовые клетки, проточная цитометрия, иммунофенотипирование, молекулярно-генетические перестройки, FAB-классификация



Liudmila V. Movchan✉, Tatsiana V. Shman, Ulyana S. Ivuts

Republican Scientific and Practical Center for Pediatric Oncology, Hematology
and Immunology, Minsk, Belarus

Leukemic Stem Cell Content in the Bone Marrow of Patients with Various Types of Acute Myeloid Leukemia

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Liudmila V. Movchan – study concept and design, data processing, text writing; Tatsiana V. Shman – study concept and design, data processing, editing; Ulyana S. Ivuts – data collection, literature review.

Submitted: 03.10.2023

Accepted: 09.01.2024

Contacts: movchan-l@mail.ru

Abstract

Purpose. To determine potential leukemic stem cell number and evaluate their content in relation to clinical factors and biological features of acute myeloid leukemia (AML) in pediatric patients.

Materials and methods. The study included 63 patients with newly diagnosed AML who were treated under the AML-MM-2014 and AML-MM-2021 protocols. Leukemic stem cell quantification by CD34+CD38 phenotype was performed in bone marrow samples using 7–10-color flow cytometry at the time of disease diagnosing.

Results. It was revealed that the number of CD34+CD38– was significantly higher in AML related to M0, M1, M2 FAB variants compared to M7, M5. Leukemic stem cell content was significantly higher in patients exhibiting expression of such markers as CD34, CD123, CD13, HLA-DR, CD25, and CD200 on tumor cells. It was found that the number of CD34+CD38– cells was statistically significantly higher in patients presenting molecular genetic rearrangements AML1/ETO, CBFb-MYH11 in leukemic cells compared to the FLT3-ITD rearrangement and the absence of the studied rearrangements.

Conclusion. Multicolor flow cytometry allows identifying leukemic stem cells in AML patients. A correlation was established between leukemic stem cell content and morphological FAB variants of leukemia, the expression of certain lineage-specific and aberrant markers on tumor cells, as well as molecular and genetic rearrangements.

Keywords: acute myeloid leukemia, leukemic stem cells, flow cytometry, immunophenotyping, molecular-genetic rearrangements, FAB classification

■ ВВЕДЕНИЕ

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) – это гетерогенная группа злокачественных заболеваний гемопоэтической ткани, характеризующаяся пролиферацией и накоплением миелоидных клеток-предшественников в костном мозге, периферической крови, печени, селезенке, реже в некроветворных органах. ОМЛ составляют около 20% среди всех острых лейкозов детского возраста и отличаются тяжелым и агрессивным течением [1, 2].

Основными проблемами выживаемости пациентов с ОМЛ являются резистентность к проводимой терапии, а также рецидивы заболевания, исход которых крайне

неблагоприятный [2]. Считается, что причиной рецидивов и резистентности к применяемым химиотерапевтическим препаратам является наличие среди общего пула опухолевых клеток популяции лейкозных стволовых клеток (ЛСК), которая способна инициировать и поддерживать рост опухоли [3–5].

В случае с ОМЛ потенциальные ЛСК с фенотипом CD34⁺CD38⁻ могут экспрессировать различные вариации aberrантных маркеров, позволяющие отличить их от нормальных стволовых клеток. К таким маркерам относятся CLL-1, CD25, CD123, CD25, CD96, Tim-3, CD200 [7–16]. Определение количества ЛСК проводят с целью достоверного прогноза исхода заболевания, выбора тактики терапии и непосредственного поиска мишеней для таргетной терапии, которая в первую очередь будет направлена на уничтожение пула ЛСК [7, 8, 14, 18, 21, 26, 27].

Несмотря на большое количество экспериментальных исследований относительно ЛСК при острых лейкозах, на сегодняшний день мало работ, посвященных оценке прогностического значения инициального содержания этой популяции клеток при остром лимфобластном лейкозе и остром миелоидном лейкозе у детей. В то же время существует ряд инициальных клинических и биологических факторов, различных критериев оценки ответа на терапию, связь которых с количеством ЛСК остается неизученной в детской онкогематологии.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить количество потенциальных лейкозных стволовых клеток и оценить их содержание в зависимости от клинических факторов и биологических особенностей острого миелоидного лейкоза у пациентов детского возраста.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 63 пациента с первично установленным диагнозом ОМЛ, получавших лечение в рамках протокола ОМЛ-ММ-2014 и ОМЛ-ММ-2021. Диагноз был установлен в соответствии с ВОЗ-классификацией на основании оценки иммунофенотипической характеристики опухолевых клеток, морфологической FAB-классификации, а также по наличию специфических цитогенетических и молекулярно-генетических перестроек. Среди исследованной группы у пациентов были диагностированы следующие варианты ОМЛ согласно FAB-классификации: M0 – 1% (1/63), M1 – 14% (9/63), M2 – 35% (22/63), M4 – 13% (8/63), M5 – 24% (15/63), M7 – 13% (8/63). Медиана возраста пациентов составила 9 лет (от 0 до 23 лет). В группе исследованных пациентов мальчики составляли 62% (39/63), девочки – 38% (24/63).

Определение количества ЛСК в образцах КМ по фенотипу CD34⁺CD38⁻ и оценку экспрессии на них таких маркеров, как CLL-1, CD25, CD123, CD25, CD96, Tim-3, CD200, CD117, проводили с помощью 7–10-цветной проточной цитофлуориметрии на момент диагностики заболевания. Для этого использовали моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромными метками в соответствии с используемой панелью:

1. Tim-3 FITC/CD200 PE/CD34 ECD/CD25 PE-Cy5/CD96 PE-Cy7/CD38 APC-AF750/CD45 KrO.
2. CD38 FITC/CD99 PE/ CD34 ECD/CD33 PE-Cy5/CD117 PE-Cy7/CLL-1 APC/CD123 APC-AF700/CD45 APC-AF750/HLA-DR PB/CD45 KrO.



Пробоподготовка и анализ количества лейкозных стволовых клеток по характерному иммунофенотипу CD34⁺CD38⁻ осуществлялись согласно ранее описанной методике [6].

Учет и анализ результатов проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter) в программе CXP. Учитывали не менее 500 тысяч клеток.

Анализ содержания клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ среди CD45^{low} клеток также провели в 15 образцах костного мозга здоровых доноров (доноры для трансплантации гемопоэтических стволовых клеток).

Для математической обработки и статистического анализа данных использовали программу Statistica 6.0. Результаты представляли в процентных показателях, в виде значений медианы и диапазона данных (25–75 перцентили). Оценку достоверности различий между независимыми группами проводили с использованием теста Манна – Уитни. Результаты считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ количественного содержания клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ у пациентов с ОМЛ

В образцах костного мозга здоровых доноров медиана количества клеток с иммунофенотипом CD34⁺CD38⁻ среди CD45^{low} клеток составила 0,49% (0,41–0,5). Для пациентов с ОМЛ установлено, что медиана количества CD34⁺CD38⁻ клеток составила 5,3% (0,8–9,1), $p < 0,05$. Однако на сегодняшний день известно, что иммунофенотип CD34⁺CD38⁻ характерен как для ЛСК, так и для нормальных стволовых кроветворных клеток [3–5]. Поэтому для подтверждения принадлежности клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ при ОМЛ к опухолевому клону необходимо использовать дополнительные маркеры, отличающие их от нормальных аналогов [25]. К таким маркерам относятся CLL-1, CD25, CD123, CD25, CD96, Tim-3 [9–16].

Показано, что среди популяции CD34⁺CD38⁻ позитивная экспрессия CD123 наблюдалась в 37% (23/58) случаев. Наличие экспрессии какого-либо из таких аберрантных антигенов, как CLL-1, CD25, CD96, Tim-3, CD200, на CD34⁺CD38⁻ популяции установлено в 79% (50/56) случаев. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что в случае с ОМЛ популяцию клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ можно рассматривать именно как ЛСК.

Анализ количественного содержания клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ у пациентов с ОМЛ в зависимости от клинических факторов

В работе был проведен анализ количества ЛСК в зависимости от пола, инициального содержания лейкоцитов в периферической крови, поражения центральной нервной системы, FAB-классификации у пациентов с ОМЛ.

Не было выявлено достоверных различий в содержании CD34⁺CD38⁻ популяции в зависимости от пола, инициального содержания лейкоцитов в ПК ($>/<50\,000$ кл/мкл), поражения центральной нервной системы.

В зависимости от установленной при диагностике FAB-классификации мы разделили пациентов на 4 группы. Группу 1 составили пациенты с минимальной дифференцировкой бластных клеток M0, M1 и M2, группу 2 – пациенты с M7, группу 3 – пациенты с M4 и группу 4 – пациенты с M5 морфологическими вариантами ОМЛ.

Таблица 1
Содержание ЛСК в группах пациентов с ОМЛ в зависимости от FAB-варианта
Table 1
LSC content in groups of AML patients depending on FAB-variant

Признак	N=63	CD34 ⁺ CD38 ⁻ Медиана (25–75), % n=63	P
1-я группа (M0, M1 и M2)	32	7,2 (4,5–12,3)	–
2-я группа (M7)	8	0,58 (0,08–5,35)	0,006
3-я группа (M4)	8	4,4 (1,2–7,4)	>0,05
4-я группа (M5)	15	1,25 (0,3–5,1)	0,003

Анализ содержания клеток с фенотипом ЛСК среди выделенных групп показал, что статистически значимо большее количество CD34⁺CD38⁻ клеток наблюдалось в группе 1 по сравнению с группой 2 и группой 4 (табл. 1). Разницы в содержании ЛСК между 1-й и 3-й группами не выявлено.

Исходя из полученных результатов, очевидно, что более высокое содержание CD34⁺CD38⁻ клеток характерно для ОМЛ с минимальной дифференцировкой по сравнению с ОМЛ с выраженной линейной направленностью.

Анализ количественного содержания клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ у пациентов с ОМЛ в зависимости от особенностей иммунофенотипа опухолевых клеток

На первом этапе данной части работы мы оценили взаимосвязь между содержанием клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ и особенностями экспрессии миелоидных дифференцировочных маркеров, таких как CD34, CD117, CD123, CD13, CD33, CD65, HLA-DR, CLL-1, на опухолевых клетках у детей с ОМЛ.

Достоверные различия в содержании исследуемой популяции ЛСК наблюдались в группах пациентов в зависимости от наличия или отсутствия экспрессии на поверхности опухолевых клеток ранних дифференцировочных маркеров. Так, в группе пациентов, на лейкозных клетках которых присутствовала экспрессия CD34 (рис. 1А), содержание CD34⁺CD38⁻ клеток было достоверно выше и медиана составила 6,9% (5,3–10,9) по сравнению с группой пациентов, у которых экспрессия CD34 отсутствовала, медиана равна 0,4% (0,1–1,5), $p<0,001$. Статистически значимо выше количество ЛСК было у пациентов, у которых на бластах экспрессировался маркер CD123 (рис. 1В), медиана составила 6,3% (2,2–10,1), по сравнению с пациентами, у которых экспрессия данного антигена отсутствовала, медиана 3,9% (0,3–7,1), $p=0,029$.

Также достоверные различия в содержании ЛСК наблюдались в группах пациентов в зависимости от наличия или отсутствия экспрессии на поверхности лейкозных клеток маркеров CD13 и HLA-DR (рис. 2).

Выявлено, что в группе пациентов, на опухолевых клетках которых присутствовала экспрессия антигена CD13 (рис. 2А), содержание CD34⁺CD38⁻ клеток было достоверно выше по сравнению с таковым в группе пациентов, у которых экспрессия данного маркера отсутствовала: 6,3% (2,7–9,7) и 2,0% (0,3–5,3) ($p=0,01$). Аналогично в случаях позитивной экспрессии HLA-DR (рис. 2В) содержание ЛСК было значимо

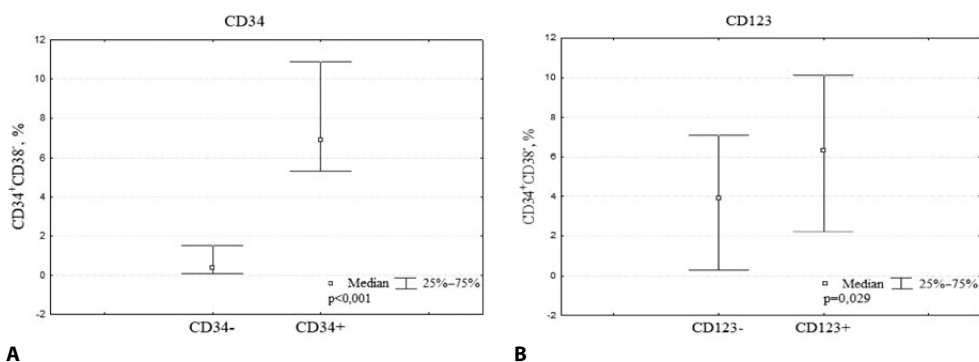


Рис. 1. Содержание CD34⁺CD38⁻ клеток в зависимости от экспрессии маркеров CD34 (А) и CD123 (В) на опухолевых клетках
Fig. 1. Content of CD34⁺CD38⁻ cells depending on CD34 (A) and CD123 (B) markers expression on tumor cells

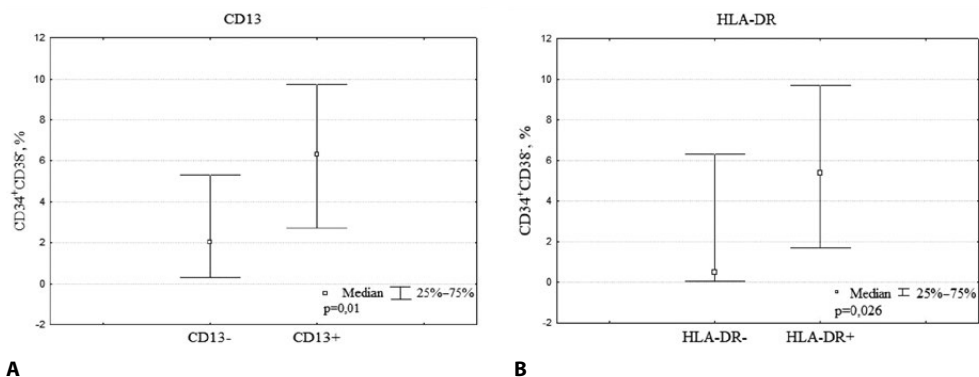


Рис. 2. Содержание CD34⁺CD38⁻ клеток в зависимости от экспрессии маркеров CD13 (А) и HLA-DR (В) на опухолевых клетках
Fig. 2. Content of CD34⁺CD38⁻ cells depending on CD13 (A) and HLA-DR (B) markers expression on tumor cells

выше в противоположность отсутствию его на опухолевых клетках: 5,4% (1,7–9,7) и 0,5% (0,06–6,3) ($p=0,026$).

Различия в содержании количества клеток с фенотипом ЛСК в зависимости от экспрессии на лейкозных клетках таких антигенов, как CD117, CD65, CLL1 (CD371), не выявлены.

В ходе анализа взаимосвязи aberrантной экспрессии на бластах при ОМЛ маркеров других линий дифференцировки установлено статистически значимое высокое содержание популяции ЛСК у пациентов с положительной экспрессией маркеров CD25 и CD200 (рис. 3).

Так, медиана количества CD34⁺CD38⁻ клеток у пациентов с положительной экспрессией антигена CD25 была достоверно выше и составляла 6,3% (5,1–9,7), тогда как в случае его отсутствия – 2,9% (0,3–7,3) ($p=0,02$). Также и для маркера CD200 медиана

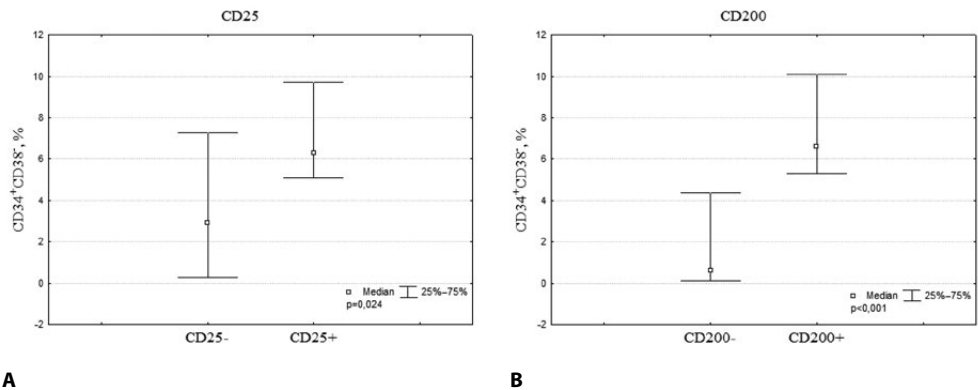


Рис. 3. Содержание CD34⁺CD38⁻ клеток в зависимости от экспрессии маркеров CD25 (А) и CD200 (В) на опухолевых клетках
Fig. 3. Content of CD34⁺CD38⁻ cells depending on CD25 (A) and CD200 (B) markers expression on tumor cells

количества CD34⁺CD38⁻ клеток составляла 6,6% (5,3–10,1) в случае его позитивной экспрессии на бластах и 0,6% (0,1–4,4) при отсутствии экспрессии (p<0,001). Однако разницы в содержании количества клеток с фенотипом ЛСК в зависимости от экспрессии aberrантных антигенов CD56, CD7, Tim-3 (CD366) и CD96 не выявлено.

Анализ количественного содержания клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ у пациентов с ОМЛ в зависимости от молекулярно-генетических перестроек

Также в работе мы проанализировали содержание клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ во всей выборке пациентов с ОМЛ в зависимости от наличия молекулярно-генетических перестроек. Для исследуемой группы пациентов были проанализированы наиболее часто встречаемые при ОМЛ у пациентов детского возраста перестройки, такие как AML1/ETO, CBFb-MYH11, FLT3-ITD, реаранжировки с участием гена MLL (табл. 2).

Таблица 2
Содержание CD34⁺CD38⁻ клеток у пациентов с ОМЛ в зависимости от молекулярно-генетических перестроек
Table 2
Content of CD34⁺CD38⁻ cells in AML patients depending on molecular genetic rearrangements

Признак	N=63	CD34 ⁺ CD38 ⁻ Медиана (25–75), %	P*	P [#]
AML1/ETO	11	9,1 (5,3–13)	–	>0,05
CBFb-MYH11	5	9,7 (5,4–12)	>0,05	–
MLL	6	0,8 (0,4–10)	>0,05	>0,05
FLT3-ITD	8	3,3 (1,9–6,1)	0,03	0,03
Нет перестр. / др.	33	4,4 (0,3–7,3)	0,01	0,01

Примечание: значение p по сравнению с группой пациентов с перестройками AML1/ETO (*), CBFb-MYH11 ([#]).



В ходе анализа выявлено, что содержание ЛСК достоверно не различается между группами пациентов с перестройками AML1/ETO и CBFb-MYH11. Таким образом, согласно табл. 2 статистически значимое более высокое содержание клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ было характерно для пациентов с наличием молекулярно-генетических перестроек AML1/ETO и CBFb-MYH11 по сравнению с пациентами, у которых была выявлена перестройка FLT3-ITD, а также по сравнению с пациентами, у которых не было выявлено исследуемых перестроек (или присутствуют неисследованные перестройки). Медиана содержания клеток с фенотипом ЛСК также была выше в группах пациентов с AML1/ETO и CBFb-MYH11 по сравнению с группой пациентов, где были выявлены реаранжировки с участием гена MLL, однако различия не достигли показателей достоверности.

Схожие результаты были получены и другими исследовательскими группами при изучении иммунофенотипа ЛСК у взрослых пациентов с ОМЛ [22, 25]. Исследования показали, что по сравнению с нормальными гемопоэтическими стволовыми клетками ЛСК демонстрируют на своей поверхности экспрессию какого-либо одного или нескольких одновременно aberrантных маркеров: CD25 [9, 15], CD32 [9], CD44 [10, 15], CD96 [11, 15], CD123 [12–15], CLL-1 [15, 21, 24, 25], Tim-3 [15], CD200 [16]. В работе Chavez-Gonzalez A. и соавторов описана высокая экспрессия маркеров CD123 и CD96 на популяции CD34⁺CD38⁻ и CD34⁺CD38⁺ у пациентов детского возраста с ОМЛ по сравнению с нормальными клетками-предшественниками [17]. Согласно полученным данным, а также результатам зарубежных исследований, высокая гетерогенность экспрессии ЛСК-специфичных маркеров у пациентов с ОМЛ не позволяет использовать какой-то единственный поверхностный маркер для выявления ЛСК [3–11, 16, 19]. Использование в иммунофенотипической панели именно вариации aberrантных маркеров позволяет с высокой специфичностью оценивать содержание ЛСК как на момент диагностики, так и на этапах проводимой химиотерапии. Специфичная идентификация ЛСК и их дискриминация от нормальных гемопоэтических клеток могли бы быть использованы для стратификации пациентов на группы риска, а также для прогноза развития рецидива заболевания [23]. Помимо специфичности исследования ЛСК, оценка экспрессии данных маркеров имеет большое значение для возможности разработки и применения антителозависимой таргетной терапии, которая будет направлена на уничтожение популяции этих высокорезистентных клеток [18, 21]. Отдельные зарубежные исследования также показали, что положительная экспрессия некоторых ЛСК-специфичных маркеров на момент диагностики ассоциируется с плохим прогнозом исхода заболевания у взрослых пациентов с ОМЛ. Например, экспрессия CD123 коррелирует с плохим ответом на проводимую химиотерапию [19]. А aberrантная экспрессия CD25 также ассоциируется с плохим прогнозом при ОМЛ [20]. Исследователи из Японии под руководством Т. Yabushita показали в своей работе, что одномоментная экспрессия на бластах при ОМЛ трех или двух маркеров из CD25, CD96, CD123 достоверно ассоциируется с плохим ответом на терапию, а также с короткой 3-летней общей выживаемостью по сравнению с отсутствием экспрессии данных маркеров или экспрессией только одного из них [26].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод многоцветной проточной цитометрии позволяет идентифицировать ЛСК у пациентов с ОМЛ. Установлено, что количество ЛСК достоверно выше при ОМЛ,

относящихся к M0, M1, M2 FAB-вариантам, по сравнению с M7, M5. Выявлено статистически значимо высокое содержание ЛСК у пациентов с наличием экспрессии на опухолевых клетках таких маркеров, как CD34, CD123, CD13, HLA-DR и CD25, CD200. В зависимости от молекулярно-генетических перестроек показано, что содержание ЛСК достоверно выше у пациентов с перестройками AML1/ETO, CBFB-MYH11 по сравнению с перестройкой FLT3-ITD и отсутствием исследуемых перестроек.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Khwaja A., Björkholm M., Gale R.E. Acute myeloid leukemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:1–22. doi: 10.1038/nrdp.2016.10
2. Antoniou E., Waack K. Pediatric Acute Myeloid Leukemia – Past, Present, and Future. *J Clin Med*. 2022;11:1–16. doi: 10.3390/jcm11030504
3. Lapidot T., Sirard C., Vormoor J. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367:645–648. doi: 10.1038/367645a0
4. Bonnet D., Dick J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3:730–737. doi: 10.1038/nm0797-730
5. Becker M.W., Jordan C.T. Leukemia stem cells in 2010: current understanding and future directions. *Blood Rev*. 2011;25:75–81. doi: 10.1016/j.blre.2010.11.001
6. Movchan L.V., Shman T.V., Aleynikova O.V. Content of immature CD34+CD38– and CD34+CD38–CD19+ subpopulations in acute lymphoblastic leukemia in children. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Medical series*. 2012;4:69–74. (in Russian)
7. Xu X., Wang J., Tong T. A self-assembled leucine polymer sensitizes leukemic stem cells to chemotherapy by inhibiting autophagy in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2022;1:2344–2355. doi: 10.3324/haematol.2021.280290
8. Pollyea D.A., Jordan C.T. Therapeutic Targeting of Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Blood*. 2017;129:1627–1635. doi: 10.1182/blood-2016-10-696039
9. Saito Y., Kitamura H., Hijikata A., Tomizawa-Murasawa M., Tanaka S., Takagi S. Identification of Therapeutic Targets for Quiescent, Chemotherapy-Resistant Human Leukemia Stem Cells. *Sci Transl Med*. 2010;2. doi: 10.1126/scitranslmed.3000349
10. Jin L., Hope K.J., Zhai Q., Smadja-Joffe F., Dick J.E. Targeting of CD44 Eradicates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells. *Nat Med*. 2006;12:1167–1174. doi: 10.1038/nm1483
11. Hosen N., Park C.Y., Tatsumi N., Oji Y., Sugiyama H., Gramatzki M. CD96 is a Leukemic Stem Cell-Specific Marker in Human Acute Myeloid Leukemia. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007;104. doi: 10.1073/pnas.0704271104
12. Jordan C.T., Upchurch D., Szilvassy S.J., Guzman M.L., Howard D.S., Pettigrew A.L. The Interleukin-3 Receptor Alpha Chain is a Unique Marker for Human Acute Myelogenous Leukemia Stem Cells. *Leukemia*. 2000;14:1777–1784. doi: 10.1038/sj.leu.2401903
13. Jin L., Lee E.M., Ramshaw H.S., Busfield S.J., Peoppl A.G., Wilkinson L. Monoclonal Antibody-Mediated Targeting of CD123, IL-3 Receptor Alpha Chain, Eliminates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2009;5:31–42. doi: 10.1016/j.stem.2009.04.018
14. Vergez F., Nicolau-Travers M.L., Bertoli S., Rieu J.B., Tavition S., Bories P. CD34(+)CD38(-)CD123(+) Leukemic Stem Cell Frequency Predicts Outcome in Older Acute Myeloid Leukemia Patients Treated by Intensive Chemotherapy But Not Hypomethylating Agents. *Cancers*. 2020;12. doi: 10.3390/cancers12051174
15. Goyama S., Wunderlich M., Mulloy J.C. Xenograft models for normal and malignant stem cells. *Blood*. 2015;125:2630–2640. doi: 10.1182/blood-2014-11-570218
16. Herbrich S., Baran N., Cai T. Overexpression of CD200 is a stem cell-specific mechanism of immune evasion in AML. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2021;9. doi: 10.1136/jitc-2021-002968
17. Chavez-Gonzalez A., Dorantes-Acosta E., Moreno-Lorenzana D. Expression of CD90, CD96, CD117, and CD123 on Different Hematopoietic Cell Populations from Pediatric Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Archives of Medical Research*. 2014;45:343–350. doi: 10.1016/j.arcmed.2014.04.001
18. Pollyea D.A., Jordan C.T. Therapeutic targeting of acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*. 2017;129:1627–1635. doi: 10.1182/blood-2016-10-696039
19. Riccioni R., Rossini A., Calabro L. Immunophenotyping features of acute myeloid leukemias overexpression The interleukin 3 receptor alpha chain. *Leuk Lymphoma*. 2004;45:1511–1517. doi: 10.1080/104281090310001646031
20. Cerny J., Yu H., Ramanathan M. Expression of CD25 independently predict early treatment failure of acute myeloid leukemia (AML). *Br J Haematol*. 2013;160:262–266. doi: 10.1111/bjh.12109
21. Hongbing Ma, Iyer Swaminathan Padmanabhan. Targeting CLL-1 for acute myeloid leukemia therapy. *Journal of Hematology & Oncology*. 2019;12. doi: 10.1186/s13045-019-0726-5
22. Marchand T., Pinho S. Leukemic Stem Cells: From Leukemic Niche Biology to Treatment Opportunities. *Front Immunol*. 2021;12. doi: 10.3389/fimmu.2021.775128
23. Terwijn M., Zeijlmaker W., Kelder A. Leukemic Stem Cell Frequency: A Strong Biomarker for Clinical Outcome in Acute Myeloid Leukemia. *PLoS One*. 2014;9. doi: 10.1371/journal.pone.0107587
24. Van Rhenen A., Van Dongen G.A., Kelder A., Rombouts E.J., Feller N. The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood*. 2007;110:2659–2666. doi: 10.1182/blood-2007-03-083048
25. Van Rhenen A., Moshaver B., Kelder A., Feller N., Nieuwint A.W. Aberrant marker expression patterns on the CD34+ CD38– stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission. *Leukemia*. 2007;21:1700–1707. doi: 10.1038/sj.leu.2404754
26. Yabushita T., Satake H., Maruoka H. Expression of multiple leukemic stem cell markers is associated with poor prognosis in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia&Lymphoma*. 2017;59:2144–2151. doi: 10.1080/10428194.2017.1410888
27. Zeijlmaker W., Grob T., Meijer R. CD34+CD38– leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2019;33:1102–1112. doi: 10.1038/s41375-018-0326-3