



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.11.2.006>
УДК 616.155.392.1-036.11:576.385.5



Мовчан Л.В.✉, Шман Т.В., Ивуть У.С., Капуза Д.Р.

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

Иммунофенотипические особенности опухолевых клеток у пациентов с острым Т-лимфобластным лейкозом

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. – формирование базы данных, обзор литературы; Капуза Д.Р. – сбор данных, обзор литературы.

Подана: 13.02.2025

Принята: 21.04.2025

Контакты: movchan-l@mail.ru

Резюме

Цель. Определить количество потенциальных лейкозных стволовых клеток и оценить их содержание в зависимости от иммунофенотипических особенностей опухолевых клеток у детей и молодых взрослых при остром Т-лимфобластном лейкозе.

Материалы и методы. В исследование были включены 170 пациентов с первично установленным диагнозом «острый Т-лимфобластный лейкоз» (Т-ОЛЛ). Анализ количественного содержания лейкозных стволовых клеток по фенотипу CD34⁺CD38⁻ проводили в образцах костного мозга с помощью 7-цветной проточной цитофлуориметрии на момент диагностики заболевания.

Результаты. Выявлено, что на опухолевых клетках при Т-ОЛЛ у детей присутствует aberrantная экспрессия таких дифференцировочных маркеров, как CD3, CD34, TdT, маркеров В-линии и миелоидной линии гемопоэза: cyCD79a, CD10, CD117, CD13, CD33. Выявлено, что CD34⁺CD38⁻ больше при Т-ОЛЛ с ЕТР-иммунофенотипическим субвариантом по сравнению с TII- и TIII-вариантами ОЛЛ. Содержание лейкозных стволовых клеток значимо выше у пациентов с наличием экспрессии на опухолевых клетках маркера ранней стадии дифференцировки CD34.

Закключение. Метод многоцветной проточной цитометрии позволяет идентифицировать лейкозные стволовые клетки у пациентов с Т-ОЛЛ. Выявлено различие в содержании лейкозных стволовых клеток в связи с иммунологическими вариантами лейкоза, с экспрессией на опухолевых клетках дифференцировочного маркера CD34.

Ключевые слова: острый Т-лимфобластный лейкоз, лейкозные стволовые клетки, проточная цитометрия, иммунофенотипирование

Movchan L., Shman T., Ivuts U., Kapuza D.

Republican Scientific and Practical Center for Children's Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Immunophenotypic Features of Tumor Cells in Patients with Acute T-Lymphoblastic Leukemia

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Movchan L. – concept and design of the study, data processing, text writing; Shman T. – concept and design of the study, data processing, editing; Ivuts U. – database formation, literature review; Kapuza D. – data collection, literature review.

Submitted: 13.02.2025

Accepted: 21.04.2025

Contacts: movchan-l@mail.ru

Abstract

Purpose. To determine the number of potential leukemic stem cells and evaluate their content depending on the immunophenotypic features of tumor cells in T-lymphoblastic leukemia in pediatric patients.

Materials and methods. The study included 170 patients with a primary diagnosis of acute T- lymphoblastic leukemia (T-ALL). Analysis of the quantitative content of leukemic stem cells by the CD34⁺CD38⁻ phenotype was performed in bone marrow samples using 7 color flow cytometry at the time of diagnosis of the disease.

Results. It was revealed that tumor cells in T-ALL in children have aberrant expression of such differentiation markers as CD3, CD34, TdT, markers of B-lineage and myeloid lineage of hematopoiesis: cyCD79a, CD10, CD117, CD13, CD33. It was revealed that the amount of CD34⁺CD38⁻ is significantly higher in T-ALL with ETP immunophenotypic subvariant compared to TII and TIII ALL. The content of leukemic stem cells is significantly higher in patients with expression of the early differentiation marker CD34 on tumor cells.

Conclusion. The multicolor flow cytometry method allows to identify leukemic stem cells in patients with T-ALL. A difference in the content of leukemic stem cells was revealed in connection with immunological variants of leukemia, with the expression of the differentiation marker CD34 on tumor cells.

Keywords: acute T-lymphoblastic leukemia, leukemic stem cells, flow cytometry, immunophenotyping

■ ВВЕДЕНИЕ

Детский острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) – наиболее распространенный детский рак, который является гетерогенным заболеванием, состоящим из различных подтипов. Т-линейный острый лейкоз составляет примерно 12–15% случаев ОЛЛ среди пациентов детского возраста [1–3]. Несмотря на современные протоколы полихимиотерапии, в том числе с использованием аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, исход заболевания остается плохим [4]. Основными проблемами выживаемости пациентов являются резистентность к проводимой терапии и рецидивы заболевания, исход которых крайне неблагоприятный [3, 4].



Считается, что причина рецидивов и резистентности к применяемым химиотерапевтическим препаратам состоит в наличии среди общего пула опухолевых клеток популяции лейкозных стволовых клеток (ЛСК), которая способна инициировать и поддерживать рост опухоли [5–7].

Установлено, что основной фенотип нормальных и лейкозных стволовых клеток – $CD34^+CD38^-$ [7], однако в зависимости от линейной направленности лейкоза на поверхности ЛСК присутствует экспрессия линейно-специфических маркеров. В экспериментальных работах на мышах по изучению характеристики лейкоз-инициирующих клеток при острых лейкозах из предшественников Т-лимфоцитов Sox C. с соавт. показано, что клетки с фенотипом $CD34^+CD4^-/CD7^-$ наиболее способны к долгосрочной пролиферации *in vitro* и *in vivo*, демонстрируя свои возможности к самообновлению и самоподдержанию [8]. При оценке же функциональных возможностей лейкозных клеток в зависимости от экспрессии маркеров CD34 и CD99 установлено, что все 4 варианта субпопуляций ($CD34^+CD99^+$, $CD34^+CD99^-$, $CD34^-CD99^+$, $CD34^-CD99^-$) обладают пролиферативной способностью и могут инициировать лейкоз у иммунодефицитных мышей [9].

Несмотря на большое количество экспериментальных исследований ЛСК при острых лейкозах, на сегодняшний день имеется 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 иммунофенотипических особенностей опухолевых клеток у детей и молодых взрослых при остром Т-лимфобластном лейкозе.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 170 пациентов с первично установленным диагнозом «Т-ОЛЛ». Медиана возраста пациентов составила 9,1 года (от 0 до 29 лет). В группе исследованных пациентов мальчики составляли 75% (127/170), девочки – 25% (43/170). Диагноз был установлен в соответствии с классификацией ВОЗ и на основании оценки иммунофенотипической характеристики опухолевых клеток и морфологической FAB-классификации. Согласно современной иммунофенотипической классификации ОЛЛ, в исследованной группе в 1,2% (2/170) случаев был диагностирован T1 (про-Т) ОЛЛ, в 31,1% (53/170) – TII (пре-Т) ОЛЛ, в 55,3% (94/170) – TIII (кортикальный Т) ОЛЛ, в 7,1% (12/170) – TIV (зрелый Т) ОЛЛ, и в 5,3% (9/170) случаев установлен отдельный подтип Т-ОЛЛ – ОЛЛ из ранних Т-клеточных предшественников (ETP-ОЛЛ, от англ. early T-precursor) [3, 4].

Определение количества ЛСК в образцах КМ по фенотипу $CD34^+CD38^-$ и оценку экспрессии на них таких маркеров, как CD7, CD99, CD5, проводили с помощью 7-цветной проточной цитофлуориметрии на момент диагностики заболевания. Для этого использовали моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромными

метками в соответствии с используемой панелью CD99 FITC/CD34 PE/CD5 PE-Cy7/CD7 APC-AF700/CD38 APC-AF750/CD3 PB/CD45 KrO.

Пробоподготовку и анализ количества ЛСК по характерному иммунофенотипу CD34⁺CD38⁻ проводили согласно ранее описанной методике [11].

Учет и анализ результатов осуществляли на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter) в программе CXP. Учитывали не менее 500 000 клеток.

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

Для математической обработки и статистического анализа данных применяли программу Statistica 6.0. Результаты представляли в процентных показателях, в виде значений медианы и диапазона данных (25–75-й 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

Особенности экспрессии антигенов на опухолевых клетках у пациентов с Т-ОЛЛ

В ходе работы были оценены особенности экспрессии иммунофенотипических маркеров на опухолевых клетках исследуемой группы пациентов.

На рис. 1 представлены особенности экспрессии дифференцировочных и Т-линейных маркеров. Выявлено, что на опухолевых клетках в большинстве случаев наблюдалась положительная экспрессия таких маркеров, как CD2 – 80,0% (136/169), CD7 – 98,2% (167/170), CD5 – 94,7% (161/170) случаев. Для иммунофенотипа опухолевых клеток исследуемых пациентов с Т-ОЛЛ была характерна aberrантная экспрессия Т-линейных дифференцировочных маркеров. Так, на опухолевых клетках положительная экспрессия маркера CD3, характерного для зрелых Т-лимфоцитов, была выявлена в 35,3% (60/169) случаев. За исключением пациентов с TIV-субвариантом острого лейкоза, aberrантная экспрессия данного маркера была характерна в 28% случаев Т-ОЛЛ. В 33,5% (57/170) случаев была выявлена экспрессия маркера ранних стадий дифференцировки CD34. Экспрессия цитоплазматического TdT наблюдалась у 64,1% (109/169) исследованных пациентов. Также среди пациентов в 6,5% (11/168) случаев установлена атипичная экспрессия HLA-DR (рис. 1).

Экспрессия CD4 наблюдалась в 14,7% (25/168) случаев, маркера CD8 – в 49,4% (84/170). Одномоментная экспрессия CD4⁺CD8⁺ была выявлена у 44,1% (75/169) пациентов. Положительная экспрессия маркера CD1a, характерного для кортикальных тимоцитов, отмечена в 55,3% (94/170) случаев Т-ОЛЛ (рис. 1).

Среди пациентов с TIV-субвариантом ОЛ на опухолевых клетках чаще всего наблюдалась экспрессия Т-клеточного рецептора с гамма-/дельта-цепями – 83% (10/12) (не представлено на рисунке).

В ходе работы мы оценили наличие на опухолевых клетках пациентов с Т-ОЛЛ aberrантной экспрессии маркеров В-клеточной и миелоидной линии гемопоэза (рис. 2). Выявлено, что в цитоплазме опухолевых клеток исследуемых пациентов в 14,7% (25/168) случаев присутствует aberrантная экспрессия В-линейного маркера суCD79a. Экспрессия CD10-антигена наблюдалась в 29,4% (50/170) случаев.

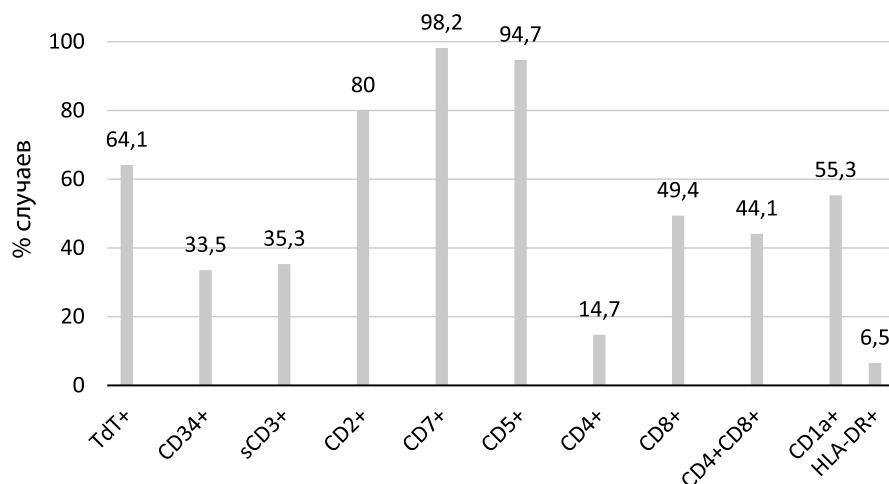


Рис. 1. Характеристика особенностей экспрессии дифференцировочных и Т-линейных маркеров на опухолевых клетках у пациентов с Т-ОЛЛ
Fig. 1. Characteristics of the expression features of differentiation and T-lineage markers on tumor cells in patients with T-ALL

На опухолевых клетках Т-ОЛЛ также была выявлена экспрессия маркеров миелоидной линии гемопоэза, таких как CD117, CD13 и CD33, отмечена в 14,7% (25/169), 8,2% (14/170), 8,8% (15/169) случаев соответственно (см. рис. 2).

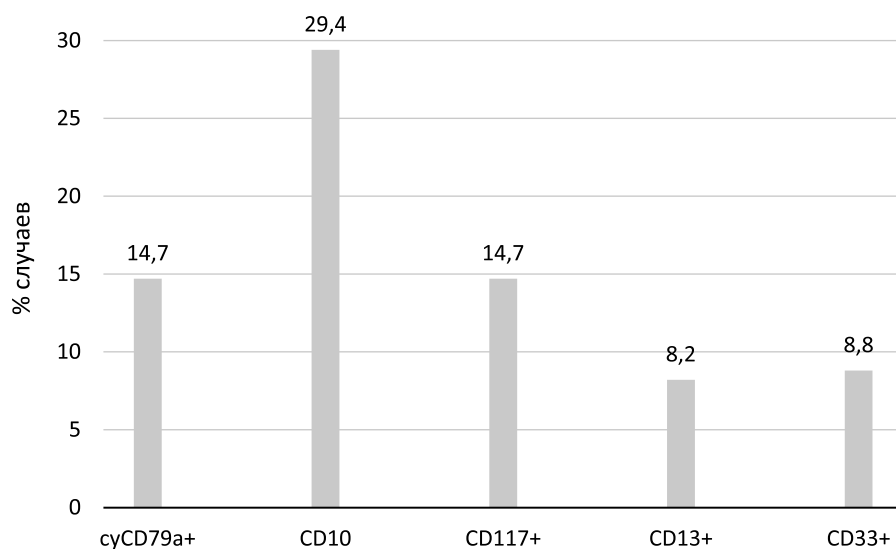


Рис. 2. Характеристика экспрессии маркеров других линий дифференцировки на опухолевых клетках у пациентов с Т-ОЛЛ
Fig. 2. Characterization of expression of markers of other differentiation lines on tumor cells in patients with T-ALL

Анализ количественного содержания клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ у пациентов с Т-ОЛЛ

В рамках работы мы провели оценку количества клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ как потенциальных ЛСК среди опухолевых клеток 34 пациентов с Т-ОЛЛ на этапе диагностики.

Для пациентов с Т-ОЛЛ установлено, что медиана количества CD34⁺CD38⁻-клеток составила 0,1% (0,07–0,5). Однако на сегодняшний день известно, что иммунофенотип CD34⁺CD38⁻ характерен как для ЛСК, так и для нормальных стволовых кроветворных клеток [10–12]. Поэтому для подтверждения принадлежности клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ при острых лейкозах к опухолевому клону рекомендуется использовать дополнительные маркеры, отличающие их от нормальных аналогов [12]. В случае с Т-ОЛЛ такими маркерами могут служить Т-ассоциированные антигены, такие как CD7, CD5, CD4, а также CD99 [8, 9, 13].

В нашей работе показано, что среди популяции CD34⁺CD38⁻ позитивная экспрессия Т-ассоциированных маркеров CD7 была выявлена в 91% (30/33) и CD5 – в 63% (10/16) случаев. Экспрессия антигена CD99 на CD34⁺CD38⁻-популяции установлена в 82% (28/34) случаев. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что в случае с Т-ОЛЛ популяцию клеток с фенотипом CD34⁺CD38⁻ можно рассматривать как ЛСК.

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

Группу пациентов с Т-ОЛЛ, которым был проведен анализ содержания CD34⁺CD38⁻-клеток, составили пациенты с TII, TIII и ЕТР-иммунологическими субвариантами.

Между иммунофенотипическими вариантами Т-ОЛЛ TII, TIII не выявлено достоверных отличий в количестве CD34⁺CD38⁻-клеток (см. таблицу). Однако очевидно высокое содержание ЛСК у пациентов с ЕТР по сравнению с группой вариантов лейкоза

Содержание CD34⁺CD38⁻-клеток в зависимости от иммунофенотипа опухолевых клеток и экспрессии aberrantных маркеров у пациентов с Т-ОЛЛ
Content of CD34⁺CD38⁻ cells depending on the immunophenotype of tumor cells and expression of aberrant markers in patients with T-ALL

Признак	CD34 ⁺ CD38 ⁻ Медиана (25–75), %	P
TII (пре-Т), n=15	0,1 (0,08–0,5)	>0,05
TIII (кортикальный Т), n=17	0,1 (0,07–0,3)	
ЕТР, n=2	7,9 (2,0–13,8)	*
cyCD79a ⁻	0,14 (0,08–0,2)	>0,05
cyCD79a ⁺	0,1 (0,07–0,5)	
My ^{**}	0,1 (0,01–0,2)	>0,05
My ⁺	0,1 (0,07–0,5)	
CD34 ⁻	0,1 (0,06–0,3)	0,05
CD34 ⁺	0,4 (0,1–2,6)	

Примечания: * не показано статистических данных, так как мало пациентов в группе с ЕТР; ** экспрессия любого миелоидного антигена (CD117, CD13, CD33).



TII и TIII (однако статистическую значимость считать некорректно в связи с малым количеством пациентов группы ЕТР – $n=2$).

Не выявлена достоверная разница в количестве клеток с фенотипом ЛСК в зависимости от экспрессии на опухолевых клетках исследованных В-клеточных и миелоидных антигенов.

Однако различия в количестве популяции $CD34^+CD38^-$ наблюдались в группах пациентов в зависимости от наличия или отсутствия экспрессии на поверхности опухолевых клеток дифференцировочного маркера CD34 (см. таблицу).

Т-ОЛЛ – это вариант острого лейкоза, который ассоциируется с высоким риском развития рецидива заболевания, однако его биологическая основа на сегодняшний день плохо изучена. Существует мало публикаций об изучении ЛСК при Т-ОЛЛ и их фенотипа, и в основном они связаны с экспериментами на мышах. Так, Сох С. и соавт. из Великобритании провели исследование субфракций опухолевых клеток, полученных от пациентов с Т-ОЛЛ и сортированных по вариациям экспрессии маркеров CD34, CD4, CD7. Ученые пришли к выводу, что опухолевые клетки Т-ОЛЛ с долгосрочным пролиферативным потенциалом в культуральном эксперименте *in vitro* и лучшей способностью к приживлению после трансплантации иммунодефицитным мышам (NOD/SCID) имели более ранний иммунофенотип $CD34^+/CD4^-$ и $CD7^-$ по сравнению с клетками $CD34^+/CD4^+$ и $CD7^+$. В эксперименте показано, что незрелые $CD34^+/CD4^-$ и $CD7^-$ -опухолевые клетки способны к самообновлению и расширению пула таких же клеток. Также было выявлено, что данные популяции клеток после трансплантации проходили некоторую степень дифференцировки в организме мышей и впоследствии воссоздавали иммунофенотип, соответствующий диагностированному острому лейкозу, что было подтверждено методом проточной цитометрии и цитогенетическим методом [8, 9].

Исследователи из Торонто Priscilla P.L. Chiu и соавт. в своей работе показали, что субфракции опухолевых клеток с фенотипом $CD34^+/CD7^-/CD1a^-$ и $CD34^+/CD7^-/CD1a^+$ способны к приживлению при трансплантации иммунодефицитным мышам. Однако было установлено, что клетки $CD34^+/CD1a^-$ Т-ОЛЛ функционально отличаются от клеток $CD34^+/CD1a^+$. Именно более дифференциально ранняя субпопуляция $CD34^+/CD7^-/CD1a^-$ обладает свойствами ЛСК, которые являются причиной развития рецидива заболевания после проведенной терапии [13].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод многоцветной проточной цитометрии позволяет идентифицировать ЛСК у пациентов с Т-ОЛЛ. Выявлено, что клеток с фенотипом ЛСК больше у пациентов с ЕТР-иммунологическим субвариантом Т-ОЛЛ по сравнению с группой с вариантами TII и TIII.

Установлено, что у пациентов с Т-ОЛЛ в зависимости от aberrантной экспрессии иммунофенотипических маркеров различия в содержании популяции ЛСК наблюдались только относительно экспрессии антигена CD34.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Pui C.H., Relling M.V., Downing J.R. Mechanisms of disease: Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004;350:1535–1548. doi: 10.1056/NEJMra023001
2. Plasschaert S.L.A., Kamps W.A., Vellenga E., et al. Prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukaemia: a question of maturation? *Cancer Treatment Reviews.* 2004;30:37–51.
3. Vrooman L.M., Silverman L.B. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. *Curr Opin Pediatr.* 2009;21:1–8.
4. Raetz E.A., Teachey D.T. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016;1:580–588. doi: 10.1182/asheducation-2016.1.580
5. Antoniou E., Waack K. Pediatric Acute Myeloid Leukemia – Past, Present, and Future. *J Clin Med.* 2022;11:1–16. doi: 10.3390/jcm11030504
6. Lapidot T., Sirard C., Vormoor J., et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994;367:645–648. doi: 10.1038/367645a0
7. 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
8. Cox Ch.V., Martin H.M., Kearns P.R., et al. Characterization of a progenitor cell population in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2007;109(2):674–82. doi: 10.1182/blood-2006-06-030445
9. Cox Ch.V., Diamanti P., Moppett J.P., et al. Investigating CD99 Expression in Leukemia Propagating Cells in Childhood T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS One.* 2016;11(10):e0165210.
10. 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)
11. Van Rhenen A., Moshaver B., Kelder A., et al. 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
12. Movchan L.V., Shman T.V., Ivuts U.S. The content of leukemic stem cells in the bone marrow of patients with various types of acute myeloid leukemia. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe.* 2024;13(2):244–252.
13. Chiu P.P.L., Jiang H., Dick J.E. Leukemia-initiating cells in human T-lymphoblastic leukemia exhibit glucocorticoid resistance. *Blood.* 2010;116(24):5268–5279.