

Д.Ф. Глузман
Л.М. Скляренко
Т.С. Ивановская
А.А. Фильченков
М.П. Завелевич
С.В. Коваль
А.С. Полищук

Институт экспериментальной
патологии, онкологии
и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого
НАН Украины, Киев, Украина

Ключевые слова:

лейкемическая стволовая
клетка, полипотентная
гемопоэтическая стволовая
клетка, иммунофенотип,
острые миелоидные лейкозы.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ МИЕЛОИДНЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ

В статье приводятся краткие данные об истории открытия полипотентных гемопоэтических стволовых клеток (ПГСК), роли зарубежных и отечественных исследователей в создании унипотентной схемы нормального кроветворения. Освещены вопросы, связанные с идентификацией лейкемических стволовых клеток (ЛСК) у человека, сравнительным изучением иммунофенотипических особенностей ЛСК и бластных лейкозных клеток при различных формах острых миелоидных лейкозов (ОМЛ), выделяемых в соответствии с ФАБ-классификацией и новой классификацией ВОЗ (2016). Исследования с использованием методов проточной цитометрии и панели моноклональных антител к новым дифференцировочным антигенам позволили выявить иммунофенотипические отличия ЛСК, ПГСК и ранних гемопоэтических клеток-предшественников, трансформация которых лежит в основе возникновения различных форм ОМЛ. Согласно современным представлениям, большинство лейкозных бластных клеток у пациентов с ОМЛ неспособны к самоподдержанию и не обладают пролиферативной активностью. Клональные свойства присущи только ЛСК, преимущественно содержащимся в основной фракции CD34⁺CD38⁻-клеток и составляющим до 1% количества всех лейкозных клеток. Новая концепция таргетной терапии предусматривает создание средств, избирательно направленных против ЛСК, которые бы не оказывали действия на ПГСК, участвующие в восстановлении нормального кроветворения. Рассматриваются возможные пути создания новых лекарственных препаратов для терапии с использованием в качестве мишеней специфических маркеров поверхностной мембраны ЛСК, а также препаратов, действие которых направлено на молекулы сигнальных путей в клетке и компоненты микроокружения ЛСК.

Диагностика гемобластозов — клональных опухолевых заболеваний — в настоящее время основывается на изучении цитоморфологических, цитохимических, иммунофенотипических, цитогенетических и молекулярно-генетических признаков основной массы лейкемических клеток, инфильтрирующих костный мозг (КМ) и определяющихся в периферической крови (ПК).

Согласно доминирующей концепции, многообразии форм и цитологических вариантов, острых миелоидных (ОМЛ) и лимфоидных лейкозов, миелолипролиферативных новообразований миелодиспластических синдромов определяется генетическими изменениями в одной клетке, получившей наименование лейкоз-иницирующей, или лейкемической стволовой клетки (ЛСК). Полагают, что трансформация нормальных полипотентных гемопоэтических стволовых клеток (ПГСК) в ЛСК происходит в результате аккумуляции генетических изменений в онкогенах, супрессорных генах, генах, ответственных за репарацию поврежденной ДНК,

эпигенетических нарушений (аномальное метилирование, модификация гистонов и др.).

Трансформированная ПГСК или ее ближайшие потомки — морфологически нераспознаваемые кроветворные клетки-предшественники, представленные в современной иерархической схеме нормального гемопоэза, дают начало коммитированным бластам, составляющим основную массу лейкозных клеток при различных формах острых лейкозов [1].

Наблюдающийся в последние десятилетия повышенный интерес к изучению ЛСК, характеризующихся высокой способностью к самоподдержанию, нестабильностью генома, усиленной пролиферативной активностью, во многом обусловлен тем, что именно ЛСК и экспрессированные в них гены, а не основная масса (bulk) субстратных лейкозных клеток должны стать основной мишенью новой таргетной терапии. Чрезвычайно важен при этом выбор препаратов, которые бы избирательно воздействовали на ЛСК и при этом не влияли на ПГСК. В этом плане представляет несомненный интерес сравне-

ние иммунологического фенотипа и функциональных свойств ЛСК и сохраняющихся у больных с различными формами лейкозов нормальных ПГСК, являющихся источником восстановления костномозгового кроветворения и достижения ремиссии.

ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ ПГСК

Теоретические представления о существовании стволовой кроветворной клетки, отождествлявшейся А.А. Максимовым с «лимфоидоцитом», были сформулированы еще в начале XX века [2]. В 1961 г. J.E. Till и E.A. McCulloch [3], разработавшие метод клонирования клеток в селезенке летально облученных мышей-реципиентов, впервые привели экспериментальные доказательства существования ПГСК.

Содержание ПГСК в КМ человека в постнатальный период невелико. Оно составляет несколько долей процента от общего количества миелокариоцитов. Основная масса ПГСК обычно находится в стадии G_0 -клеточного цикла. Количество пролиферирующих ПГСК увеличивается при восстановлении костномозгового кроветворения после лучевых повреждений или действия цитостатических препаратов.

Весомый вклад в изучение проблемы ПГСК в 70–90-х годах XX века внесли отечественные ученые И.Л. Чертков и А.Я. Фриденштейн [4].

В Украине исследования по характеристике ПГСК и их роли в лейкогенезе проводились в Институте проблем онкологии (сейчас Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого Национальной академии наук (НАН) Украины (ИЭПОР им. Р.Е. Кавецкого)) под руководством академика НАН Украины З.А. Бутенко [5]. В том числе были выполнены цитоморфологические и цитохимические исследования ПГСК и кроветворных клеток-предшественников человека и мышей различных линий [6].

Наряду с анализом клеточного состава селезеночных колоний, возникавших у летально облученных мышей после трансплантации клеток КМ, наименее дифференцированных клеток в составе гранулоцитарных, моноцитарно/макрофагальных колоний и кластеров при культивировании на полутвердых средах *in vitro*, весьма плодотворным оказалось исследование ранних этапов эмбрионального кроветворения у человека и мышей. Особенно микроскопическое изучение первых кроветворных клеток в желточном мешке, мигрировавших затем в печень и заселявших КМ, селезенку, тимус, лимфатические узлы.

Результаты исследований показали, что считающиеся морфологически нераспознаваемыми кроветворные клетки-предшественники III–IV класса (в схеме кроветворения И.Л. Черткова и А.И. Воробьева) уже обладают маркерными цитохимическими признаками, присущими зрелым клеткам различных линий. Некоторые из этих клеток-предшественников, как показано позже, подвергаясь

злокачественной трансформации, могут приобретать свойства, присущие ЛСК, в то время как подавляющее большинство определяющихся в крови и КМ при ОМЛ бластных клеток обладают низким клоногенным потенциалом [7].

В табл. 1 представлены наиболее значимые достижения в изучении ПГСК и ЛСК.

Таблица 1
Основные этапы изучения ПГСК и ЛСК [1, 3, 7–14]

| Хронология, годы | Основные этапы | Авторы открытия |
|------------------|--|------------------------------|
| 1961 | Получение экспериментальных доказательств существования ПГСК | J.E. Till, E.A. McCulloch |
| 1967–1981 | Установление клональной природы хронического миелолейкоза и ОМЛ | P.J. Fialkow |
| 1972–1973 | Создание современной унипотентной схемы кроветворения | И.Л. Чертков, А.И. Воробьев |
| 1980–1990 | Получение моноклональных антител (МкАт) к линейно-специфическим и дифференцировочным антигенам лейкоцитов | J. Kohler, C. Milstein |
| 1988 | Использование мышей с выраженным комбинированным иммунодефицитом (SCID) для изучения гемопоэтических стволовых клеток человека | I. Weissman |
| 1989–1994 | Использование мышей со SCID, неточных диабетических (NOD/SCID) и NOD/SCID/L2-R _g -pull мышей для изучения ЛСК | J. Dick, I. Weissman, M. Jan |
| 1997 | Впервые идентифицирована ЛСК | J. Dick |
| 2003–2009 | Идентифицированы стволовые клетки при раке молочной железы и других солидных новообразованиях | J.E. Dick, Sh. Bepad |

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПГСК И КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В НОРМЕ

В большинстве современных схем кроветворения признается существование ПГСК, дающей начало мультипотентным клеткам-предшественникам (МПКП), которые продуцируют миелоидные клетки-потомки с более ограниченным дифференцировочным потенциалом — миеломоноцитарные клетки-предшественники (КОЕ-ГМ). КОЕ-ГМ, в свою очередь, ответственны за выработку клеток-предшественников гранулоцитов (КОЕ-Г) и моноцитов (КОЕ-М).

Из МПКП возникают также общие клетки-предшественники эритронобластов и мегакариоцитопоэза (КОЕ-ЭМег), а затем непосредственные предшественники морфологически распознаваемых бластных клеток эритробластического (БОЕ-Э, КОЕ-Э) и мегакариоцитарного ряда (КОЕ-Мег).

С помощью методов проточной цитометрии с использованием широкой панели МкАт удалось изучить иммунофенотипические маркеры ПГСК и различных категорий миелоидных клеток-предшественников. Представляется важным в сравнительном плане с ЛСК привести накопленные к настоящему времени обобщенные данные (табл. 2).

Таблица 2

Маркерные антигены для идентификации родоначальных кроветворных клеток в норме [15–18]

| |
|---|
| Полипотентные гемопоэтические стволовые клетки (ПГСК) CD34, CD90, CD117, CD123, CD164, CD166 HLA-DR, CD172, CD173, CD174, CD175, CD176 CD224, CD227, CD239 |
| Мультипотентные клетки-предшественники (КОЕ-ГМЭ-Mer) CD34, CD38, HLA-DR, CD45RA, CD33, CD117, CD123, CD213, CD230 |
| Клетки-предшественники гранулоцитарно-моноцитарного ряда (КОЕ-ГМ) CD34, CD38, HLA-DR, CD45RA, CD33, CD13, CD15, CD64, CD115, CD116, CD123, CD131, CD183, CD213, CD230 |
| Клетки-предшественники гранулоцитарного ряда (КОЕ-Г) CD13, CD15, CD32, CD33, CD35, CD66, CD89, CD116, CD123 |
| Клетки-предшественники моноцитарного ряда (КОЕ-М) CD13, CD15, CD33, CD115, CD116, CD123, CD213, CD230 |
| Ранние эритроидные клетки-предшественники (КОЕ-Э) CD34, CD38, HLA-DR, CD33, CD45RO, CD71, CD36, CD38, CD41a, CD41b, CD238 |
| Ранние клетки-предшественники мегакариоцитарного ряда (КОЕ-Mer) CD34, CD38 ^{low} , HLA-DR, CD33, CD61 |

Из представленных (см. табл. 2) данных наибольшее внимание онкогематологов привлекают антигены CD34, CD38, HLA-DR. В настоящее время антиген CD34 признан в качестве одного из важнейших маркеров ПГСК и широко используется главным образом для выделения стволовых клеток и гемопоэтических клеток-предшественников из КМ и ПК для последующей ауто- и аллогенной трансплантации.

ПГСК в норме, как и ЛСК, являются CD38-отрицательными. Линейная коммитация ПГСК ассоциируется со снижением экспрессии антигена CD34 и повышением уровня выявления CD38. Антигены гистосовместимости II класса (HLA-DR) не определяются на ПГСК. Материалы, касающиеся других маркерных антигенов ПГСК и кроветворных клеток-предшественников, приведены в подготовленном авторами статьи пособии «Дифференцировочные антигены клеток человека (система CD)», отражающем материалы 10 Международных рабочих совещаний, проводившихся в разных странах мирах в 1982–2014 гг. [19].

ИММУНОФЕНОТИП ЛСК И БЛАСТНЫХ КЛЕТОК ПРИ ОМЛ

Знаменательным является факт, что несомненные экспериментальные доказательства существования опухолевой стволовой клетки (cancer stem cell), из которой возникают новообразования человека различной локализации и гистогенеза, были получены при изучении злокачественных заболеваний кроветворной ткани (ОМЛ, хронического миелозейкоза, миелодиспластических синдромов) [10]. Стволовые клетки ряда солидных опухолей (рак молочной железы, легкого, поджелудочной железы, меланомы, новообразований центральной нервной системы) были идентифицированы несколько позднее [14].

Для изучения ЛСК проводили опыты по гетеротрансплантации лейкозных клеток, выделенных из КМ и ПК человека, мышам с тяжелым комбиниро-

ванным иммунодефицитом SCID и NOD/SCID [10, 11]. Последние были получены путем спаривания не-тучных диабетических мышей (NOD) и мышей SCID. Мыши SCID не имеют В- и Т-лимфоцитов, а у мышей NOD не определяется активность естественных клеток-киллеров и выявляются другие признаки иммунодефицита — врожденные дефекты активности макрофагов и активации системы комплемента. В опытах по гетеротрансплантации лейкемических клеток КМ и ПК больных всеми формами ОМЛ, определяемыми в соответствии с франко-американско-британской классификацией (ФАБ-классификация), исключая вариант ОМЛ М3, большинство лейкозных бластных клеток оказались неспособными к самоподдержанию и не обладали пролиферативной активностью. Четко установлено, что клональные свойства присущи преимущественно способным к самоподдержанию ЛСК, которые содержатся в основной фракции CD34⁺CD38⁻-клеток. Содержание ЛСК у больных разными формами ОМЛ, как установлено методом лимитирующих разведений, колеблется от 0,2 до 1,0%.

ЛСК, которые вызывают образование лейкемических инфильтратов у мышей NOD/SCID, характеризуются высокой способностью к самоподдержанию, о чем свидетельствовали результаты их серийной трансплантации. Они обладают пролиферативной активностью, образуя большое количество лейкемических клеток-предшественников и непролиферирующих бластов. В образованном трансплантате, основная масса бластных клеток которого неспособна инициировать развитие лейкоза, повторялись иммунофенотип и функциональная гетерогенность, которые были свойственны соответствующей исходной форме ОМЛ. Эти данные свидетельствуют о том, что ОМЛ, подобно процессу нормального кроветворения, характеризуются иерархической организацией, которая включает функционально разные классы клеток, рост которых поддерживается немногочисленными ЛСК [20–29].

При изучении антигенов поверхностных мембран ЛСК при основных формах ОМЛ (исключая острый промиелоцитарный лейкоз, ОМЛ М3) выявлены особенности, которые отличают их от нормальных ПГСК. Как оказалось, они имеют следующий фенотип: CD34⁺, CD38⁻, HLA-DR⁺, CD25⁺, CD26⁺, CD32⁺, CD36⁺, CD44⁺, CD45RA, CD47⁺, CD117⁺, CD123⁺, CD133⁺, IL-1RAP⁺, CD184⁺, CD366⁺, CD371⁺.

МАРКЕРНЫЕ АНТИГЕНЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛСК

Общим признаком для всех форм ОМЛ является блок дифференцировки клеток, что приводит к накоплению в КМ более чем 20% бластных клеток. Наиболее распространенной в мире является ФАБ-классификация ОМЛ, которая базируется на учете цитоморфологических и цитохимических признаков. При этом каждый из вариантов ОМЛ (M0–M7)

соответствует определенному уровню дифференцировки бластных клеток (рис. 1, 2). Учитывая, что более чем у 80% больных ОМЛ при цитогенетическом исследовании выявляется хотя бы одна из многих известных транслокаций хромосом, экспертами ВОЗ (2016) была предложена новая классификация ОМЛ. Она учитывает специфические хромосомные аномалии, характерные для определенных вариантов ОМЛ. Наиболее часто транслокации происходят в генах, которые кодируют факторы транскрипции. Чаще всего при ОМЛ наблюдается транслокация (8;21) с образованием химерного (слитного) гена *AML1-ETO*, который определяется у 12–15% больных, в основном при варианте ОМЛ М2. Белковый продукт гена *AML1-ETO* является доминантным отрицательным ингибитором регуляции транскрипции *CBF* (Core Binding Factor). Подобным же образом действует продукт гена *MPL1-CBFB*, образующийся *inv(16)* или *t(16;16)*, который определяется у 8–10% больных ОМЛ М4Эо. Сегодня известно более 10 разных хромосомных транслокаций, результатом которых является изменение функции *CBF* (регулирует структуру и функционирование хроматина), что указывает на его важную роль в лейкемогенезе.

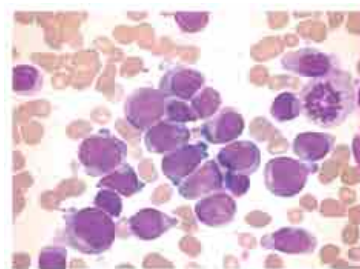
С учетом отмеченных выше аномалий хромосом и данных молекулярно-генетического анализа представляется важным сравнение спектра дифференцированных антигенов на поверхностных мембранах ПГСК в норме, клеток, входящих в гетерогенную популяцию ЛСК ($CD34^+$, $CD38^-$) и выявляемых с различной частотой при основных цитологических вариантах ОМЛ (исключая ОМЛ М3, ОМЛ М6 и ОМЛ М7) (табл. 3).

Таблица 3

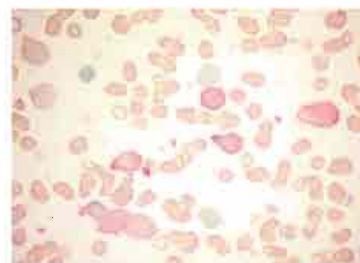
Экспрессия дифференцировочных антигенов на поверхностных мембранах гемопоэтических клеток в норме, на бластах при ОМЛ, на ПГСК и ЛСК [26, 29–31]

| Маркеры | Экспрессия на клетках | | | |
|---------|-------------------------------------|---------|------|-----------------------------|
| | Норма | ОМЛ (%) | ПГСК | ЛСК ($CD34^+$, $CD38^-$) |
| IL-1RAP | T-клетки | 79 | - | + |
| CD366 | Активированные T-клетки, ЕК-клетки | 91 | - | + |
| CD371 | Миелоидные клетки | 70 | - | + |
| CD2 | T-клетки, ЕК-клетки | 87 | - | + |
| CD7 | T-клетки | 43 | - | + |
| CD11b | Миелоидные клетки | 55 | - | + |
| CD22 | B-клетки | 51 | - | + |
| CD25 | Активированные B- и T-клетки | 25 | - | + |
| CD33 | Миелоидные клетки, ЕК-клетки | 82 | + | ++ |
| CD44 | Молекула адгезии | 100 | + | ++ |
| CD45RA | T-клетки, миелоидные клетки | 65 | - | + |
| CD47 | Белок, ассоциированный с интегрином | 100 | + | ++ |
| CD56 | ЕК-клетки, активированные T-клетки | 32 | - | + |
| CD96 | Активированные T-клетки | 33 | - | + |
| CD99 | Миелоидные клетки | 83 | - | + |
| CD123 | Миелоидные клетки | 82 | + | ++ |

К сожалению, в панель *McAt* к дифференцировочным антигенам лейкоцитов, рекомендуемую экспертами ВОЗ для классификации и диагностики

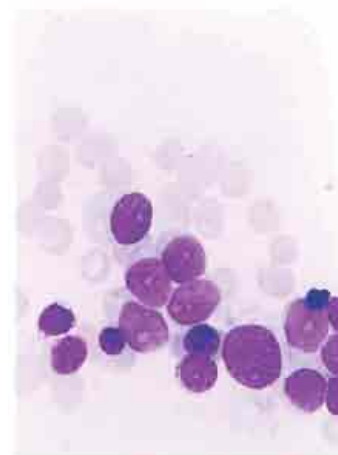


а

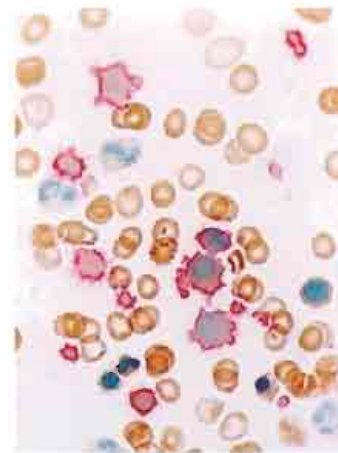


б

Рис. 1. Бластные клетки в КМ при ОМЛ М5 ($CD34^+CD117-HLA-DR^+CD33^+$). Ув. 900: а — окраска по Паппенгейму; б — экспрессия антигена $CD34^+$ на бластных клетках



а



б

Рис. 2. Бластные клетки в КМ при ОМЛ М7 ($CD34^+CD38^{low}HLA-DR^+CD33^+CD41^+CD61^+$). Ув. 900: а — окраска по Паппенгейму; б — экспрессия антигена $CD34^+$ на бластных клетках

ОМЛ, не входит часть маркеров, по которым определяются четкие различия между ПГСК в норме и ЛСК (табл. 4).

Таблица 4
Панель МкАт для диагностики и классификации острых лейкозов (ВОЗ, 2016)

| | |
|---|--|
| Маркеры гемопоэтических клеток-предшественников | CD34, CD38, HLA-DR, TdT, CD117, CD71 |
| ОМЛ | CD34, CD38, HLA-DR, CD33, CD7, CD11b, CD11c, CD14, CD15, CD65, CD64, CD36, CD68, CD163 |
| Острый эритролейкоз | CD71, CD36, Gly-A |
| Острый мегакариобластный лейкоз | CD61, CD41, CD42 |

После Международного рабочего совещания в Бостоне (1993) панель была дополнена лишь одним антигеном CD163 (Кобэ, Япония, 1966). Весьма желательно было бы дополнить спектр выявляемых на ЛСК маркеров новыми выявленными антигенами CD366, CD371, МкАт к IL-1RAP (белку, ассоциированному с рецептором ИЛ-1).

Нельзя не отметить, что в диагностических исследованиях, проводимых как зарубежными [17, 18], так и отечественными [16] исследователями, в том числе сотрудниками отдела онкогематологии ИЭПОР им. Р.Е. Кавецкого (за период с декабря 2017 г. по июль 2019 г. обследовано 123 больных с ОМЛ), не используются МкАт к антигену CD38. Между тем, определение количества (процентного содержания) лейкоэмических CD34⁺CD38⁻ бластов в КМ и ПК при установлении диагноза, в какой-то мере коррелирующего с содержанием ЛСК, может быть использовано с целью прогноза, мониторинга, оценки минимальной резидуальной болезни, раннего выявления рецидивов заболевания [29, 32–34].

ТЕРАПИЯ, НАПРАВЛЕННАЯ НА ЭЛИМИНАЦИЮ ЛСК

Современные методы лечения больных ОМЛ направлены на эрадикацию основной массы лейкозных бластных клеток, определяющихся в ПК и КМ. Нередко при этом удается добиться временного эффекта — достичь ремиссии и увеличения продолжительности жизни больных. ЛСК, как правило, остаются нечувствительными к действию применяющихся лекарственных средств. Концепция таргетной терапии основывается на иммунофенотипических и других отличительных признаках ЛСК и нормальных ПГСК. Она предусматривает создание средств, избирательно направленных против ЛСК, которые бы не оказывали действия на ПГСК, участвующие в восстановлении нормального кроветворения. В частности, учитывается, что опухолеассоциированные свойства ЛСК могут быть связаны с мутациями в доменах киназ, факторов транскрипции, опухолевых генов-супрессоров, изменениями в механизмах роста и выживаемости, связанными с активацией киназы PI3 и ядерного фактора NF-каппа В (NF-κB) в CD34⁺CD38⁻CD123⁺-клетках при ОМЛ. Благо-

даря этому становится возможным поиск терапевтических препаратов избирательного влияния на ЛСК. Например, обработка клеток при ОМЛ *in vitro* партенолидом (ингибитором NF-κB) приводит к быстрой гибели бластных клеток и потере способности вызывать образование лейкоэмических инфильтратов при трансплантации мышам NOD/SCID. При этом нормальные CD34⁺CD38⁻ ПГСК не повреждаются.

Подобно нормальным ГСК, для сохранения свойств ЛСК также необходимо взаимодействие с поддерживающими «нишами», которые могут быть использованы в качестве определенной терапевтической мишени.

Известно, что экспрессированные на поверхностных мембранах большинства типов клеток изоформы антигена CD44 являются молекулами адгезии, которые играют ключевую роль в «хоминге» и трасплантации ЛСК при ОМЛ и ХМЛ, но не нормальных ГСК. Передача сигнала через CD44 приводит к секреции цитокинов и активации Т-лимфоцитов. Обработка клеток при ОМЛ МкАт Н90, активирующими CD44, индуцирует дифференцировку лейкоэмических клеток *in vitro* и изменяет свойства ЛСК, уменьшая их способность к «хомингу» в КМ и селезенку. При этом они утрачивают способность к инициации лейкоза при серийной трансплантации на мышах.

Более полно некоторые данные о попытках создания препаратов с различным механизмом действия, направленных непосредственно на ЛСК, представлены в табл. 5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Немногим более 20 лет прошло с тех пор, как впервые в экспериментальных исследованиях (гетеротрансплантации на мышях с выраженным комбинированным иммунодефицитом) была идентифицирована ЛСК. Исследования с использованием методов проточной цитометрии и панели МкАт к новым дифференцировочным антигенам позволили выявить иммунофенотипические отличия ЛСК, ПГСК и ранних гемопоэтических клеток-предшественников, трансформация которых лежит в основе возникновения различных форм ОМЛ. Полученные данные не только способствуют раскрытию отдельных звеньев лейкогенеза, но и имеют важное клиническое значение в плане прогнозирования минимальной резидуальной болезни, возможных рецидивов, продолжительности жизни больных. Предпринимаются попытки создания лекарственных препаратов, которые, действуя на ЛСК, не вызывают повреждения ПГСК, обеспечивающих в последующем восстановление нормального кроветворения. Некоторые из этих препаратов успешно проходят клинические испытания и в скором времени, вероятно, позволят повысить эффективность лечения ряда категорий больных ОМЛ.

Новые лекарственные препараты, избирательно действующие на ЛСК

| Мишени | Антитела/ малые молекулы | Механизм действия | Стадия клинических испытаний | Источник |
|---|---------------------------|---|------------------------------|--------------|
| Терапия с использованием в качестве мишени специфических поверхностных маркеров стволовых клеток | | | | |
| CD33 | Гемтузумаб Озогамицин | Избирательно «убивает» CD34 ⁺ CD38 ⁻ CD123 ⁺ -клетки, не «затрагивает» ПГСК | I–III | [35] |
| IL-1RAP | IgG МкАТ 81.2 | Антагонист рецептора ИЛ-2. Избирательно «убивает» IL-1RAP ⁺ лейкоэмические бласты и популяции клеток, обогащенные ЛСК | | [36] |
| CD366 | АТК2а | Избирательно блокирует трансплантацию/развитие ЛСК, «не затрагивая» ПГСК | | [37] |
| CD371 | CLLI-CD3 BITE | Интернализация, ведущая к гибели стволовых клеток, индукции клеточно-зависимой (CDC) и антителозависимой клеточно-обусловленной цитотоксической активности (ADCC) | I | [35] |
| CD123 | SL-101 | Избирательно подавляет лейкоэмические клетки-предшественники, не затрагивая их нормальные аналоги | I–II | [35] |
| CD47 | Hu5F9-G4, ТТ1-621 | Анти-CD47 МкАТ – антитело против домена CD47, взаимодействующего с рецептором α регулирующих сигналы белка SIRP α | | [38] |
| CD25 | APCT-301 LMB-2 | Конъюгат МкАТ и α -цепи рецептора ИЛ-2 с лекарственным препаратом. Химерный белок с использованием экзотоксина <i>Pseudomonas</i> | | [39] |
| Таргетная терапия, направленная на сигнальные пути, связанные с ЛСК | | | | |
| NF- κ B | Бортезомиб | Ингибитор NF- κ B, преимущественно влияет на клетки-предшественники при ОМЛ | I–II | [40] |
| Гистондеацетилаза | Чидамид | Индукцирует апоптоз в ЛСК-подобных клетках и прежде всего в CD34 ⁺ -клетках при ОМЛ | I–II | [41] |
| Протеасомы | Карфилзомиб Бортезомиб | Уменьшает долговременную выживаемость CD34 ⁺ -клеток при ОМЛ. Значительное уменьшение популяции лейкоз-иницирующих клеток | I I–III | [42] [43] |
| Таргетная терапия, направленная на микроокружение ЛСК | | | | |
| CXCR4 | Преликсафор (AMD 3100) | Антагонист CXCR4, уменьшает присущий КМ хоминг-эффект | I–II | [44] |

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Chertkov IL, Vorobiov AI. Modern scheme of hematopoiesis. Probl Hematol Blood Transfusion 1973; 10: 3–13 (in Russian).
- Maximov AA. Über die Entwicklung der Blut- und Bindegewebszellen beim Säugetierembryo. Folia Haematologica (Leipzig) 1907; 4: 611–26.
- Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res 1961; 14 (2): 213–22.
- Chertkov IL, Fridenstein AYa. Cell Basis of Hematopoiesis. M: Meditsina, 1977. 272 p. (in Russian).
- Butenko ZA. Stem Hematopoietic Cells and Leukemia. Kiev: Naukova Dumka, 1978. 482 p. (in Russian).
- Gluzman DF, Bebesheko VG, Nadgornaya VA. Embryonic hematopoiesis and hemoblastosis in children (immunocytology and cytochemistry). Kiev: Naukova Dumka, 1988. 200 p. (in Russian).
- Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. Proc Natl Acad Sci USA 1967; 58 (4): 1468–71.
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256 (5517): 495–7.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 2001; 414 (6859): 105–11.
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 1997; 3 (7): 730–7.
- Passequé E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100 (Suppl 1): 11842–9.
- Jan M, Chao MP, Cha AC, et al. Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108 (12): 5009–14.
- Dick JE. Breast cancer stem cells revealed. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100 (7): 3547–9.
- Cancer Stem Cell: Identification and Targets. Sh. Bapat (ed). New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. 245 p.
- Baryshnikov AYu, Kadagidze ZG, Makhonova LA, Tupitsyn NN. Immunological Phenotype of Leukemia Cell. M: Meditsina, 1989. 240 p. (in Russian).
- Lugovskaya SA, Pochtar ME, Tupitsyn NN. Immunophenotyping in Diagnosis of Hematoblastoses. M: Triada, 2005. 168 p. (in Russian).
- Bene MCh, Porwit A. Examples of Immunophenotypic Features in Various Categories of Acute Leukaemia Chapter 5. In: Multiparameter Flow Cytometry in the Diagnosis of Hematologic Malignancies A. Porwit, M.Ch. Bene, eds. Cambridge University Press 2018: 75–88.
- Bain BJ. Leukemia Diagnosis, 5th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2017. 524 p.
- Gluzman DF, Philchenkov AA, Sklyarenko LM, et al. Differentiation Antigens of Homan Cells. Kyiv 2019 (in press) (in Russian).
- Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. Nat Rev Cancer 2005; 5 (4): 311–21.
- Chan WI, Huntly BJ. Leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. Semin Oncol 2008; 35 (4): 326–35.
- Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, et al. Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. Sci Transl Med 2010; 2 (17): 17ra9.
- Jan M, Chao MP, Cha AC, et al. Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108 (12): 5009–14.
- Hwang K, Park CJ, Jang S, et al. Flow cytometric quantification and immunophenotyping of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. Ann Hematol 2012; 91 (10): 1541–6.

25. Wang X, Huang S, Chen JL. Understanding of leukemic stem cells and their clinical implications. *Mol Cancer* 2017; **16** (1): 2.
26. Hanekamp D, Cloos J, Schuurhuis GJ. Leukemic stem cells: identification and clinical application. *Int J Hematol* 2017; **105** (5): 549–57.
27. Kersten B, Valkering M, Wouters R. CD45RA, a specific marker for leukaemia stem cell sub-populations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2016; **173** (2): 219–35.
28. Thomas D, Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood* 2017; **129** (12): 1577–85.
29. Zeijlemaker W, Grob T, Meijer R, et al. CD34⁺CD38⁻ leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2019; **33** (5): 1102–12.
30. 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** (8): 1700–7.
31. Witte KE, Ahlers J, Schäfer I, et al. High proportion of leukemic stem cells at diagnosis is correlated with unfavorable prognosis in childhood acute myeloid leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2011; **28** (2): 91–9.
32. Terwijn M, Zeijlemaker W, Kelder A, et al. Leukemic stem cell frequency: a strong biomarker for clinical outcome in acute myeloid leukemia. *PLoS One*. 2014; **9** (9): e107587.
33. Zeijlemaker W, Kelder A, Oussoren-Brockhoff YJ, et al. A simple one-tube assay for immunophenotypical quantification of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2016; **30** (2): 439–46.
34. Cloos J, Harris JR, Janssen JJWM, et al. Comprehensive protocol to sample and process bone marrow for measuring measurable residual disease and leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *J Vis Exp* 2018; (133): 56386.
35. Ball B, Stein EM. Which are the most promising targets for minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia prior to allogeneic stem cell transplant? *Haematologica* 2019; **104** (8): 1521–31.
36. Askmyr M, Ågerstam H, Hansen N, et al. Selective killing of candidate AML stem cells by antibody targeting of IL1RAP. *Blood* 2013; **121** (18): 3709–13.
37. Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, et al. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; **7** (6): 708–17.
38. Gerber JM, Smith BD, Ngwang B, et al. A clinically relevant population of leukemic CD34⁺CD38⁻ cells in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; **119** (15): 3571–7.
39. Bachas C, Schuurhuis GJ, Assaraf YG, et al. The role of minor subpopulations within the leukemic blast compartment of AML patients at initial diagnosis in the development of relapse. *Leukemia* 2012; **26** (6): 1313–20.
40. Guzman ML, Rossi RM, Karnischky L, et al. The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood* 2005; **105** (11): 4163–9.
41. Li Y, Chen K, Zhou Y, Xiao Y, et al. A new strategy to target acute myeloid leukemia stem and progenitor cells using chidamide, a histone deacetylase inhibitor. *Curr Cancer Drug Targets* 2015; **15** (6): 493–503.
42. van der Helm LH, Bosman MC, Schuringa JJ, Vellenga E. Effective targeting of primitive AML CD34⁺ cells by the second-generation proteasome inhibitor carfilzomib. *Br J Haematol* 2015; **171** (4): 652–5.
43. Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, et al. Positive feedback between NF- κ B and TNF- α promotes leukemia-initiating cell capacity. *J Clin Invest* 2014; **124** (2): 528–42.
44. Rashidi A, DiPersio JF. Targeting the leukemia-stroma interaction in acute myeloid leukemia: rationale and latest evidence. *Ther Adv Hematol* 2016; **7** (1): 40–51.

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЛЕЙКЕМІЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ДЛЯ ТАРГЕТНОЇ ТЕРАПІЇ ХВОРИХ НА ГОСТРІ МІЕЛОЇДНІ ЛЕЙКОЗИ

Д.Ф. Глузман, Л.М. Склярєнко, Т.С. Іванівська,
О.О. Фільченков, М.П. Завєлєвич, С.В. Коваль,
А.С. Поліщук

Інститут експериментальної патології, онкології
і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України,
Київ, Україна

Резюме. У статті наведено стислі дані про історію відкриття поліпотентних гемопоетичних стовбурових клітин (ПГСК), ролі зарубіжних і вітчизняних дослідників у створенні уніпотентної схеми нормального кровотворення. Висвітлено питання, пов'язані з ідентифікацією лейкемічних стовбурових клітин (ЛСК) у людини, порівняльним вивченням імунофенотипових особливостей ЛСК і бластних лейкозних клітин при різних формах гострих мієлоїдних лейкозів (ГМЛ), що виділяються відповідно до ФАБ-класифікації і нової класифікації ВООЗ (2016). Дослідження з використанням методів проточної цитометрії та панелі моноклональних антитіл до нових диференціальних антигенів дозволили виявити імунофенотипові відмінності ЛСК, ПГСК і ранніх гемопоетичних клітин-попередників, трансформація яких лежить в основі виникнення різних форм ГМЛ. Відповідно до сучасних уявлень, більшість лейкозних бластних клітин у хворих на ГМЛ нездатні до самопідтримання і не володіють проліферативною активністю. Клональні властивості притаманні тільки ЛСК, які переважно містяться в основній фракції CD34⁺CD38⁻-клітин і становлять до 1% кількості всіх лейкозних клітин. Нова концепція таргетної терапії передбачає створення засобів, вибірково спрямованих проти ЛСК, які б не діяли на ПГСК, що беруть участь у відновленні нормального кровотворення. Розглядаються можливі шляхи створення нових лікарських препаратів для терапії з використанням як мішеней специфічних маркерів поверхневої мембрани ЛСК, а також препаратів, дія яких спрямована на молекули сигнальних шляхів та компоненти мікрооточення ЛСК.

Ключові слова: лейкемічна стовбура клітина, поліпотентна гемопоетична стовбура клітина, імунофенотип, гострі мієлоїдні лейкози.

IDENTIFICATION OF LEUKEMIC STEM CELLS FOR TARGETED THERAPY OF PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

D.F. Gluzman, L.M. Sklyarenko, T.S. Ivanivska,
A.A. Philchenkov, M.P. Zavelevich, S.V. Koval,
A.S. Polishchuk

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology
and Radiobiology, the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. The review summarizes briefly the data on the history of the discovery of the pluripotent stem he-

matopoietic cells (PSHC), the role of the foreign and national scientists in the development of the unipotent scheme of the normal hematopoiesis. The issues related to the identification of the human leukemic stem cells (LSC) are spotlighted with the emphasis on the comparison of the immunophenotypes of LSC and leukemic blasts in different types of the acute myeloid leukemia delineated according to FAB classification and the modernized WHO classification (2016). The use of flow cytometry and panels of monoclonal antibodies against new differentiation antigens allowed elucidating the distinct immunophenotypic features of LSC, PSHC and early hematopoietic progenitor cells having been at the origin of different forms of acute myeloid leukemias (AML). According to modern concepts, the bulk of leukemic cells in AML patients are not capable of self-renewal and active proliferation. Only LSC representing mostly CD34⁺CD38⁻ cell fraction and accounting for less than 1% of total leukemic cells possess the clonal properties. The novel concept of target-

ed therapy provides for designing the agents affecting selectively LSC and not PSHC participating in the recovery of normal hematopoiesis. The possible developments leading to the elaboration of novel selective medicinal products directed against specific markers of the surface membrane of LSC, intracellular signaling pathways and microenvironment of LSC are also reviewed.

Key Words: leukemic stem cell, pluripotent stem hematopoietic cell, immunophenotype, acute myeloid leukemia

Адрес для переписки:

Глузман Д.Ф.
03022, Киев, ул. Васильковская, 45
Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины
E-mail: gluzman@onconet.kiev.ua

Получено: 19.08.2019