

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

УДК 616-006.4: 616-092.12

DOI 10.59598/ME-2305-6053-2025-114-1-105-115

К. Б. Досыбаева<sup>1</sup>, Г. С. Жубанова<sup>1</sup>, А. А. Мусаева<sup>1</sup>, А. Ж. Аблаева<sup>1</sup>, Д. Ж. Нургалиев<sup>2</sup>, З. Н. Кыздарбекова<sup>2</sup>, К. Г. Шайхызада<sup>2</sup>, Ж.М. Ермагамбетова<sup>2</sup>, Г. М. Наурызбаева<sup>3</sup>, У. Л. Орумбаева<sup>3</sup>, К. Т. Нургалиева<sup>3</sup>, М. Танко<sup>1,3</sup>, Д. Поддиге<sup>1,4</sup>, Л. Л. Ахмалтдинова<sup>1,5</sup>

## ДВОЙНЫЕ НЕГАТИВНЫЕ Т-КЛЕТКИ ПРИ ОСТРОМ ЛИМФОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НА ПЕДИАТРИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТАХ

<sup>1</sup>Кафедра медицины, Школа медицины Назарбаев Университета (020000, Республика Казахстан, г. Астана, ул. Керей, Жанибек хандар 5; e-mail: umc@umc.org.kz)

<sup>2</sup>Программа детской онкологии, Клинический академический департамент педиатрии, University Medical Center (Z05K7A4, Республика Казахстан, г. Астана, ул. Сыганак, 46; e-mail: umc@umc.org.kz)

<sup>3</sup>Клинический академический департамент лабораторной медицины, Республиканский диагностический центр, University Medical Center (Z05K7A4, Республика Казахстан, г. Астана, ул. Сыганак, 46; e-mail: umc@umc.org.kz)

<sup>4</sup>Клинический академический департамент педиатрии, University Medical Center (Z05K7A4, г. Астана, Республика Казахстан, ул. Сыганак, 46; e-mail: bgnncmd@bk.ru)

<sup>5</sup>ТОО «Центр гематологии» (100019, Республика Казахстан, г. Караганда, пр-т С. Сейфуллина, 17; e-mail: info@hemcenter.kz)

**\*Людмила Леонидовна Ахмалтдинова** – Кафедра медицины, Школа медицины Назарбаев Университета; 020000, Республика Казахстан, г. Астана, ул. Керей, Жанибек хандар 5; ТОО «Центр гематологии»; 100019, Республика Казахстан, г. Караганда, пр-т С. Сейфуллина, 17; e-mail: immunol.lab@gmail.com

**Цель.** Двойные негативные Т-клетки участвуют в различных неопластических процессах, включая гематологические злокачественные заболевания, такие как острый лимфобластный лейкоз. Эти нетипичные лимфоциты не экспрессируют ни CD4, ни CD8 и играют роль в иммунной модуляции при раке, особенно в микроокружении костного мозга. Однако их специфическое участие при остром лимфобластном лейкозе и других лейкозах, особенно у педиатрических пациентов, остается малоизученным. Настоящее пилотное исследование направлено на характеристику двойных негативных Т-клеток у детей с острым лимфобластным лейкозом и их сравнение со здоровыми контрольными группами.

**Материалы и методы.** Было проведено проспективное, поперечное исследование 20 детей с диагнозом острый лимфобластный лейкоз и 9 здоровых, подобранных по возрасту и полу контрольных участников. Для оценки субпопуляций лимфоцитов, включая двойные негативные Т-клетки, использовалась проточная цитометрия.

**Результаты и обсуждение.** Общее количество двойных негативных Т-клеток было статистически значимо увеличено у пациентов с острым лимфобластным лейкозом по сравнению с контрольной группой. В частности,  $\alpha\beta$ +DNT клетки были заметно увеличены у пациентов с острым лимфобластным лейкозом как в процентном соотношении, так и в абсолютных значениях. В то же время  $\gamma\delta$ +DNT клетки были значительно снижены у пациентов с острым лимфобластным лейкозом по абсолютному количеству и доле от CD3+ лимфоцитов.

**Выводы.**  $\alpha\beta$ +DNT клетки значительно повышены у детей с острым лимфобластным лейкозом, что может свидетельствовать о их возможной роли в иммунном ответе на лейкоз. Тем не менее, это увеличение может отражать более широкую иммунную дисрегуляцию, а не быть специфичным для острого лимфобластного лейкоза. Требуется дальнейшие исследования для уточнения их роли в лейкозе и изучения их терапевтического потенциала.

**Ключевые слова:** дважды негативные Т-лимфоциты; острый лейкоз; иммунофенотипирование; проточная цитометрия; острый лимфобластный лейкоз

## ВВЕДЕНИЕ

Двойные негативные Т-клетки (DNT) представляют собой нетипичную субпопуляцию Т-клеток, которые не экспрессируют оба поверхностных маркера CD4 и CD8, что отличает их от классических Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов. Среди популяции DNT-клеток особое внимание привлекают DNT-клетки экспрессирующие Т-клеточный рецептор типа  $\alpha\beta$  ( $\alpha\beta$ +DNT) из-за их

вовлеченности в аутоиммунные заболевания, иммунную регуляцию и гематологические злокачественные новообразования. Эти клетки играют диагностическую роль при таких заболеваниях, как аутоиммунный лимфопролиферативный синдром, при котором их количественная экспансия считается диагностическим критерием [13]. Помимо аутоиммунных расстройств, DNT-клетки всё больше изучаются за их иммунологические функции в онкологии, особенно в опухолевом ми-

крооужении, где они модулируют иммунные ответы, что может влиять на прогрессию заболевания и исходы у пациентов [18].

Острый лейкоз является самым распространенным видом рака у детей, причем острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) является наиболее частым его подтипом. ОЛЛ характеризуется неконтролируемой пролиферацией лимфобластов в костном мозге, что нарушает нормальное кроветворение [1]. Несмотря на достижения в лечении, включая химиотерапию, таргетную терапию и иммунотерапию, прогноз для некоторых педиатрических пациентов остается неблагоприятным, и болезнь может рецидивировать. Таким образом, дальнейшее изучение иммунного ландшафта при ОЛЛ, в частности роли DNT-клеток, имеет решающее значение для разработки новых терапевтических стратегий.

DNT-клетки участвуют в ряде неопластических процессов, включая как гематологические злокачественные новообразования, так и солидные опухоли. Например, исследования на животных моделях продемонстрировали сильную противоопухолевую активность DNT-клеток, которая опосредуется через рецепторы клеток-киллеров, такие как NKG2D и DNAM-1, позволяющие им распознавать и уничтожать раковые клетки [6]. В случае лейкемии эта цитотоксическая активность особенно актуальна, так как DNT-клетки могут атаковать и устранять лейкоэмические клетки через неантиген-специфические механизмы, обходя некоторые ограничения, связанные с традиционными цитотоксическими Т-клетками, которые зависят от распознавания специфических антигенов. Их способность атаковать различные популяции лейкоэмических клеток делает DNT-клетки перспективными кандидатами для клеточной терапии, например, с использованием химерных антигенных рецепторов (CAR-T) [5].

Помимо цитотоксических свойств, было показано, что DNT-клетки играют двойную роль в иммунитете при раке. С одной стороны, они могут оказывать противоопухолевое действие, а с другой – участвовать в иммунной регуляции, что может способствовать иммунному подавлению в определенных контекстах, таких как опухолевое микроокружение при колоректальном раке и метастатической меланоме [11, 17]. В случае лейкемии наблюдается взаимодействие DNT-клеток с регуляторными Т-клетками и другими компонентами иммунной системы, что потенциально модулирует истощение Т-клеток и иммунный ответ на лейкоэмические клетки [1]. Эта двойственная роль усложняет наше понимание DNT-клеток, так как они могут одновременно способствовать как прогрессии, так и подавлению рака в зависимости от иммунного окружения.

ОЛЛ нарушает микроокружение костного мозга, которое является основным местом взаимодействия иммунных клеток и гемопоэза. В этом окружении DNT-клетки могут влиять на прогрессию лейкемии, взаимодействуя с другими иммунными клетками или непосредственно атакуя лейкоэмические клетки. Предклинические исследования на животных моделях лейкемии показали, что DNT-клетки могут ингибировать рост

лейкоэмических клеток через секрецию цитокинов и цитотоксические пути, что открывает возможность использования их в качестве терапевтических агентов [9]. Более того, роль  $\alpha\beta$ +DNT-клеток в модуляции иммунной динамики в костном мозге остается в значительной степени неизученной у педиатрических пациентов с ОЛЛ, что делает это важной областью для исследований. Понимание поведения этих клеток в контексте лейкемии может дать ценные данные о их возможной роли в патогенезе заболевания и разработке новых иммунотерапий.

**Цель работы** – характеристика DNT-клеток у педиатрических пациентов с острым лимфобластным лейкозом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Дизайн исследования и популяция.** Данное пилотное исследование является кросс-секционным, наблюдательным исследованием, целями которого является оценка уровня циркулирующих двойных отрицательных Т (DNT) клеток у пациентов детского возраста с ОЛЛ. Исследование проводилось с 15 ноября 2023 года по 31 марта 2024 года. Участники исследования были набраны из программы детской онкологии Клинического академического департамента Педиатрии Центра Материнства и Детства University Medical Center (УМЦ), аффилированного со Школой Медицины Назарбаев Университета.

В исследование включались педиатрические пациенты в возрасте от 2 до 17 лет, которым был поставлен диагноз ОЛЛ на основании клинических, морфологических и иммунофенотипических критериев. Критерии исключения включали наличие коморбидных состояний (в дополнение к ОЛЛ), сопутствующих хронических или острых инфекционных заболеваний. Контрольную группу составили здоровые дети, сопоставимые по возрасту и полу, набранные из общего педиатрического отделения, без аутоиммунных и гематологических заболеваний в анамнезе.

Педиатрические пациенты с диагнозом ОЛЛ в этом исследовании были классифицированы согласно Французско-Американско-Британской (FAB) морфологической системе и иммунофенотипическим вариантам Европейской группы по иммунологической характеристике лейкозов (EGIL). У 20 пациентов (код МКБ-10 C91.0) были представлены различные подтипы вариантов лейкозов по FAB (L1 и L2), варианты В-клеточной (В I, В II, В III) и Т-клеточной линии (Т III). У нескольких пациентов наблюдались специфические хромосомные транслокации, включая транслокацию TEL-AML t (12;21), и позитивность по CD33. Эти диагнозы отражают гетерогенность педиатрической ОЛЛ, охватывая как пре-В-клеточные, так и пре-Т-клеточные лейкозы и подчеркивая разнообразные биологические характеристики в этой когорте.

**Этическое положение.** Исследование проводилось в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации. Оно было одобрено Коми-

тетом институциональной этики научных исследований Назарбаев Университета (заявка N644/14112022, одобрена 10.01.2023) и Локальным Комитетом по Биоэтике УМС (заявка п.8, одобрена 14.11.2023). Письменное информированное согласие было получено от опекунов всех участников исследования.

**Сбор данных.** Клинические и демографические данные, включая возраст, пол, основной диагноз и результаты лабораторных исследований (общий анализ крови, лейкоцитарная формула) были получены из медицинских карт пациентов. Для обеспечения целостности данных были использованы стандартизированные формы сбора информации. Лабораторные данные были собраны в базу данных Microsoft Excel 2022 (версия 16.68) для дальнейшего анализа.

**Проточная цитометрия и анализ субпопуляции лимфоцитов.** Образцы периферической крови (3–4 мл) собирались в пробирки с этилендиаминтетрауксусной кислотой и после обрабатывались в течение двух часов. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделялись с помощью градиентного центрифугирования по плотности Ficoll-Paque PLUS (Cytiva). Для проточного цитометрического анализа  $1 \times 10^6$  клеток/мл ресуспендировались в круглодонных пробирках объемом 5 мл и окрашивались моноклональными антителами, конъюгированными флуорохромом в соответствии с инструкцией производителя: CD3-PB (UCHT1), CD4-APC (13B8.2), CD8-PC5.5 (B9.11),

CD19-PE (J3-119), CD56-APC-A700 (N901), TCR $\gamma\delta$ -PC7 (IMMU510) от Beckman Coulter (США) и анти-TCR $\alpha\beta$ -FITC от BD™ (США).

Окрашенные образцы промывались и ресуспендировались в 300 мкл окрашивающего буфера перед получением данных на проточной системе Dx FLEX FACS (модель BE50232, Beckman Coulter, 2021). Данные анализировались с помощью программного обеспечения Kaluza Analysis (версия 2.1, Beckman Coulter, 2020). DNT клетки были классифицированы как CD3+TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8- ( $\alpha\beta$ +DNT-клетки) или CD3+TCR $\gamma\delta$ +CD4-CD8- ( $\gamma\delta$ +DNT-клетки). Была разработана стратегия гейтирования для идентификации субпопуляций двойных негативных Т-клеток (DNT) среди других популяций лимфоцитов (рис. 1).

**Статистический анализ.** Демографические и клинические данные были представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (IQR) для непрерывных переменных и в процентах для категориальных переменных. Поскольку распределение количества лимфоцитов и их субпопуляций не соответствовало нормальному распределению (подтвержденное тестом Шапиро-Уилка), сравнение групп для непрерывных данных проводилось с помощью критерия суммы рангов Уилкоксона, а для категориальных переменных использовался точный тест Фишера. р-значения < 0,05 считались статистически значимыми. Статистический анализ проводился с помощью программы GraphPad Prism 9 for MacOS.

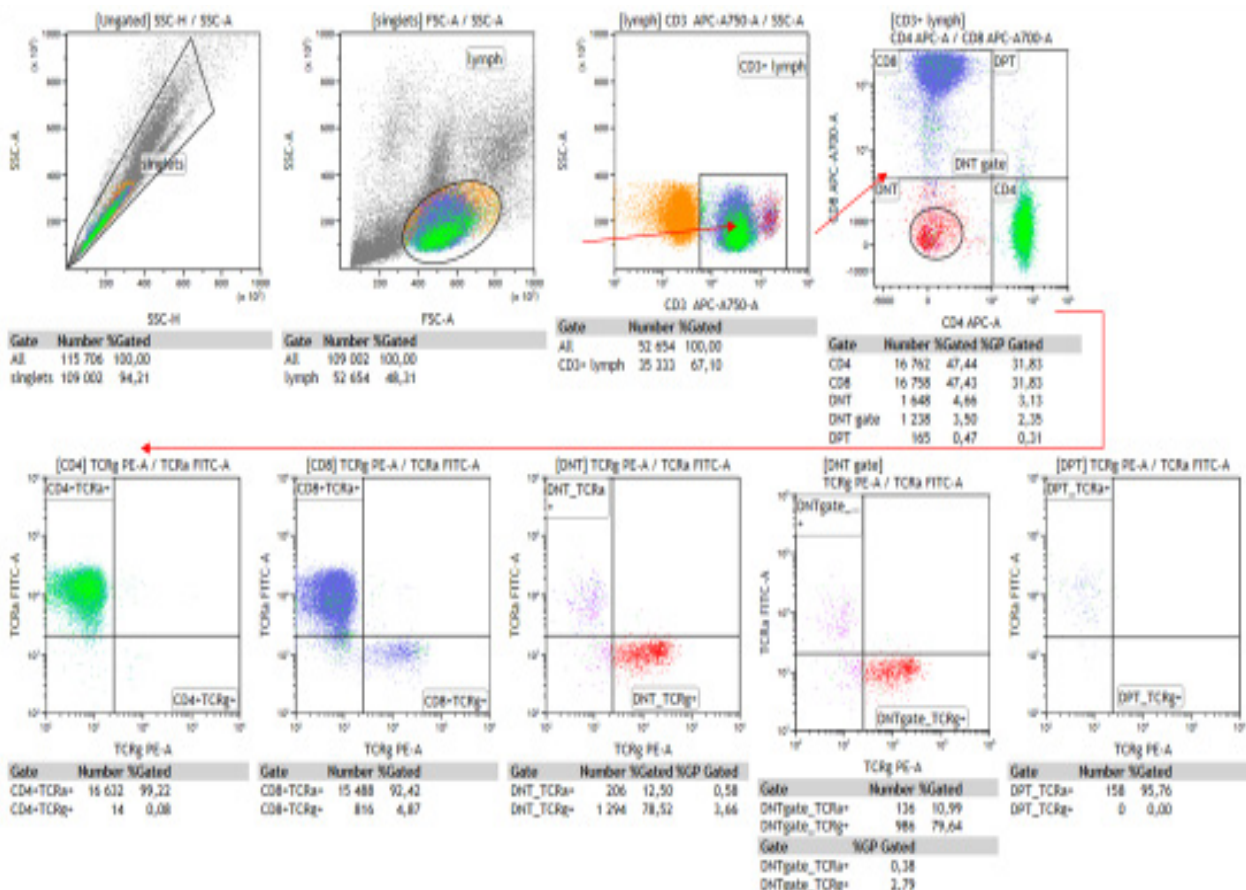


Рисунок 1 – Стратегия гейтирования популяции Т-лимфоцитов

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Демографические и клинические характеристики.** В исследование было включено 20 детей с ОЛЛ и 9 здоровых детей из контрольной группы, сопоставимых по возрасту и полу (табл. 1). Медианный возраст в группе ОЛЛ составил 5,95 лет (IQR: 4,53, 7,00) по сравнению с 7,90 годами (IQR: 3,10, 10,70) в контрольной группе, без статистически значимой разницы по возрасту ( $p = 0,7$ ). Распределение по полу показало, что в группе ОЛЛ 30% составляли девочки и 70% мальчики, в то время как в контрольной группе было 56% девочек и 44% мальчиков, при этом значимой разницы в распределении по полу между двумя группами не наблюдалось ( $p=0,2$ ).

**Гематологические параметры.** Анализ крови выявил значительные различия между пациентами с ОЛЛ и здоровыми контрольными участниками (табл. 2). Медианное значение количества лейкоцитов (WBC) было значительно ниже у пациентов с ОЛЛ ( $3,45 \times 10^9/\text{л}$ ) по сравнению с контрольной группой ( $6,98 \times 10^9/\text{л}$ ;  $p<0,001$ ), что указывает на лейкопению у пациентов с ОЛЛ. У пациентов с ОЛЛ уровень гемоглобина был значительно снижен (97,00 г/л против 133,00 г/л;  $p<0,001$ ), что указывает на анемию. Средний объем эритроцитов (MCV) был выше (92,20 фл против 80,30 фл;  $p=0,003$ ), а количество тромбоцитов ниже ( $166,50 \times 10^9/\text{л}$  против  $285,00 \times 10^9/\text{л}$ ;  $p=0,021$ ), что отражает тромбоцитопе-

нию. Также наблюдалось снижение нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов и базофилов (все  $p<0,05$ ), свидетельствующие об угнетении костного мозга и лейкоэмической инфильтрации.

**CD4+ и CD8+ Т-клеточные субпопуляции.** Анализ субпопуляций CD4+ и CD8+ Т-клеток выявил значительные изменения в соотношении цитотоксических и Th-лимфоцитов между педиатрическими пациентами с ОЛЛ и контрольной группой (рис. 2). В частности, доля CD4+ лимфоцитов была значительно снижена у пациентов с ОЛЛ (32,22% [28,95, 40,10]) по сравнению со здоровыми пациентами контроля (43,33% [39,62, 46,49]), что оказалось статистически значимым ( $p=0,017$ ). Аналогично, среди популяции CD3+ лимфоцитов процент CD4+ клеток был существенно ниже в группе с ОЛЛ (39,91% [34,31, 58,23]) по сравнению с контролем (61,41% [53,58, 66,27];  $p = 0,009$ ). Это снижение также отразилось на абсолютных значениях, где количество CD4+ лимфоцитов было значительно ниже у пациентов с ОЛЛ (348,60 клеток/мкл [170,65, 612,74]) по сравнению с контролем (1 216,33 клеток/мкл [1 092,68, 1 422,70];  $p<0,001$ ).

В то же время наблюдалась противоположная тенденция в отношении CD8+ лимфоцитов. Доля CD8+ клеток была значительно выше в группе с ОЛЛ (50,64% [36,39, 59,89]) по сравнению с контролем (23,47% [17,57, 28,05];  $p<0,001$ ). Однако среди популяции CD3+ лимфоцитов не было значимых различий в процент-

Таблица 1 – Демографические характеристики пациентов

| Характеристика | ОЛЛ (n=20) <sup>1</sup> | Контроль (n=9) <sup>1</sup> | p-значение <sup>2</sup> |
|----------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Возраст        | 5,95 (4,53, 7,00)       | 7,90 (3,10, 10,70)          | 0,7                     |
| Пол            |                         |                             | 0,2                     |
| женский        | 6 (30%)                 | 5 (56%)                     |                         |
| мужской        | 14 (70%)                | 4 (44%)                     |                         |

<sup>1</sup>Медиана (IQR); n (%); <sup>2</sup>тест суммы рангов Вилкоксона; точный критерий Фишера

Таблица 2 – Гематологические параметры пациентов с ОЛЛ и контрольной группы

| Характеристика              | ОЛЛ (n=20) <sup>1</sup> | Контроль (n=9) <sup>1</sup> | p-значение <sup>2</sup> |
|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Лейкоциты, $10^9/\text{л}$  | 3,45 (2,13, 4,71)       | 6,98 (5,89, 7,28)           | <0,001                  |
| Гемоглобин, г/л             | 97,00 (91,00, 102,25)   | 133,00 (129,00, 136,00)     | <0,001                  |
| MCV, фл                     | 92,20 (88,38, 95,28)    | 80,30 (78,30, 84,80)        | 0,003                   |
| Тромбоциты, $10^9/\text{л}$ | 166,50 (102,50, 260,50) | 285,00 (265,00, 295,00)     | 0,021                   |
| MPV, фл                     | 10,90 (9,60, 11,75)     | 10,00 (9,20, 10,70)         | 0,11                    |
| Нейтрофилы (%), %           | 52,05 (30,53, 70,63)    | 44,30 (41,10, 51,00)        | 0,3                     |
| Нейтрофилы, $10^9/\text{л}$ | 1,84 (0,84, 2,44)       | 3,09 (2,85, 3,16)           | 0,036                   |
| Лимфоциты (%), %            | 29,30 (17,95, 62,10)    | 44,50 (38,60, 46,60)        | 0,4                     |
| Лимфоциты, $10^9/\text{л}$  | 1,00 (0,68, 1,41)       | 3,07 (2,59, 3,17)           | <0,001                  |
| Моноциты (%), %             | 4,85 (3,50, 7,58)       | 7,30 (6,70, 8,90)           | 0,038                   |
| Моноциты, $10^9/\text{л}$   | 0,17 (0,08, 0,29)       | 0,54 (0,46, 0,66)           | 0,006                   |
| Эозинофилы (%), %           | 0,00 (0,00, 0,23)       | 2,40 (1,70, 4,20)           | <0,001                  |
| Эозинофилы, $10^9/\text{л}$ | 0,00 (0,00, 0,01)       | 0,18 (0,12, 0,29)           | <0,001                  |
| Базофилы (%), %             | 0,20 (0,00, 0,30)       | 0,60 (0,40, 0,70)           | 0,002                   |
| Базофилы, $10^9/\text{л}$   | 0,01 (0,00, 0,01)       | 0,04 (0,025, 0,05)          | <0,001                  |

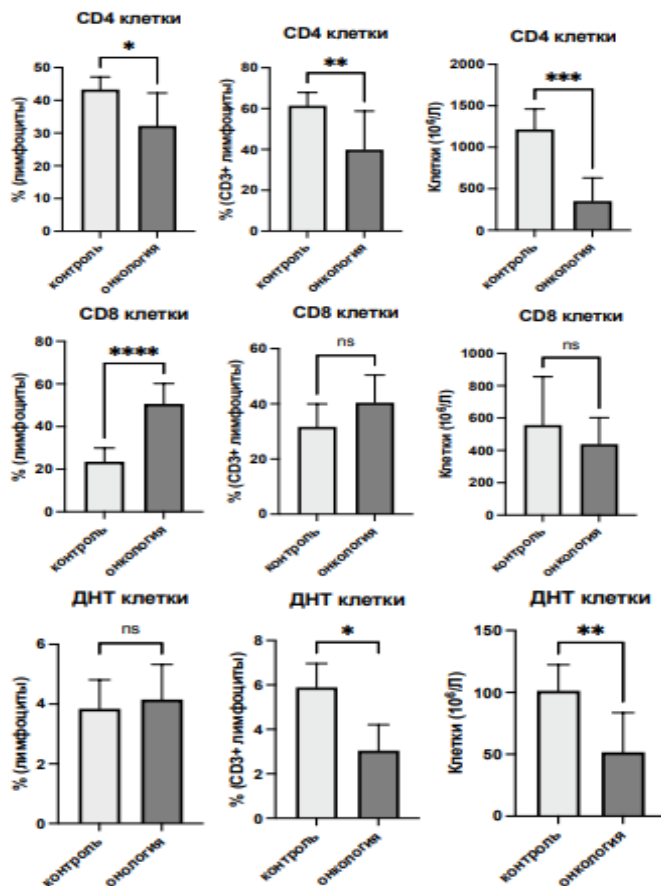


Рисунок 2 – CD4+ и CD8+ Т-клеточные субпопуляции

ном содержании CD8+ клеток между пациентами с ОЛЛ (40,44% [25,57, 48,80]) и контролем (31,67% [27,20, 39,24];  $p=0,2$ ). Абсолютное количество CD8+ лимфоцитов также было сопоставимо между двумя группами (438,89 клеток/мкл [314,38, 599,30] у пациентов с ОЛЛ против 556,97 клеток/мкл [438,72, 733,52] у контрольной группы;  $p=0,2$ ).

Дальнейший анализ субпопуляций  $\alpha\beta$ + и  $\gamma\delta$ + Т-клеток в составе CD4+ и CD8+ популяций предоставил дополнительные данные. Доля CD4+  $\alpha\beta$ + лимфоцитов была ниже у пациентов с ОЛЛ (30,83% [27,39, 38,72]) по сравнению с контролем (42,96% [38,39, 46,15];  $p=0,017$ ), что также сопровождалось значительным снижением абсолютного числа клеток (320,86 клеток/мкл [167,26, 602,17] у пациентов с ОЛЛ против 1 178,69 клеток/мкл [1 062,74, 1 379,60] у контрольной группы;  $p<0,001$ ). Напротив, CD8+  $\alpha\beta$ + лимфоциты были более многочисленны у пациентов с ОЛЛ (36,66% [25,21, 45,77]) по сравнению с контролем (21,35% [15,91, 26,06];  $p=0,013$ ), хотя абсолютное количество CD8+  $\alpha\beta$ + клеток было значительно ниже у пациентов с ОЛЛ (308,70 клеток/мкл [209,09, 426,14]) по сравнению с контролем (504,22 клеток/мкл [415,69, 712,21];  $p=0,028$ ).

В свою очередь,  $\gamma\delta$ + Т-клеточные популяции показали разноплановые изменения. Хотя процент CD4+  $\gamma\delta$ + клеток не различался существенно между группами ( $p=0,085$ ), абсолютное число этих клеток было значительно ниже у пациентов с ОЛЛ ( $p=0,003$ ). Аналогично, у CD8+  $\gamma\delta$ + Т-клеток не было значимых различий в

проценте ( $p=0,14$ ), но их абсолютное число было значительно снижено у пациентов с ОЛЛ (3,65 клеток/мкл [1,98, 7,65]) по сравнению с контролями (29,52 клеток/мкл [12,51, 37,58],  $p<0,001$ ). Эти результаты подчеркивают значительное снижение количества CD4+ Т-клеток, особенно в субпопуляции  $\alpha\beta$ +, у педиатрических пациентов с ОЛЛ, что сопровождается увеличением доли CD8+ Т-клеток. Эти изменения в Т-клеточных популяциях отражают глубокую дисрегуляцию иммунной системы, потенциально влияя на иммунный надзор. Отличия в  $\gamma\delta$ + Т-клетках, особенно в абсолютных количествах, подчеркивают сложный иммунологический ландшафт у пациентов с ОЛЛ.

**Субпопуляции DNT-клеток.** Анализ DNT-клеток показал значительные различия между пациентами с ОЛЛ и здоровыми контрольными участниками (табл. 4). Доля DNT-клеток в общей популяции лимфоцитов была сопоставима между двумя группами (4,15% у пациентов с ОЛЛ против 3,84% у контрольной группы;  $p=0,3$ ). Однако, если рассматривать DNT-клетки как процент от CD3+ лимфоцитов, то у контрольной группы наблюдалась значительно более высокая доля (5,89% против 3,04%;  $p=0,013$ ). Абсолютное количество DNT-клеток было значительно ниже у пациентов с ОЛЛ (51,66 клеток/мкл) по сравнению с контрольной группой (101,27 клеток/мкл;  $p=0,003$ ).

При фокусировании на  $\alpha\beta$ + субпопуляции DNT-клеток было отмечено значительное увеличение в группе пациентов с ОЛЛ по отношению к проценту от лимфоцитов (0,92% против 0,31%;  $p<0,001$ ) и проценту от CD3+ лимфоцитов (1,14% против 0,46%;  $p=0,003$ ). Однако абсолютное количество  $\alpha\beta$ +DNT-клеток не различалось существенно между группами (10,21 клеток/мкл у пациентов с ОЛЛ против 9,42 клеток/мкл у контрольной группы;  $p=0,8$ ). Напротив,  $\gamma\delta$ +DNT-клетки были более многочисленны у контрольной группы как по проценту от CD3+ лимфоцитов (4,01% против 2,56%;  $p=0,040$ ), так и по абсолютному количеству (83,36 клеток/мкл у контрольной группы против 24,33 клеток/мкл у пациентов с ОЛЛ;  $p<0,001$ ). Эти результаты подчеркивают значительное увеличение  $\alpha\beta$ +DNT-клеток у пациентов с ОЛЛ, что может указывать на их возможную роль в иммунной картине заболевания, в то время как  $\gamma\delta$ +DNT-клетки были более выражены у здоровых контрольных участников.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В данном пилотном исследовании мы выявили значительное увеличение количества  $\alpha\beta$ + двойных негативных Т-клеток (DNT) у детей с ОЛЛ по сравнению со здоровыми контрольными участниками. Это увеличение  $\alpha\beta$ +DNT-клеток может указывать на их потенциальную роль в патогенезе ОЛЛ или иммунной дисрегуляции, связанной с этим гематологическим злокачественным заболеванием. Наши результаты дополняют растущее количество доказательств, свидетельствующих о том, что DNT-клетки, особенно подгруппа  $\alpha\beta$ +, могут выполнять иммуномодулирующие функции в лейкоэмическом микроокружении. Это согласуется с

Таблица 3 – Анализ субпопуляций CD3+, CD4+, CD8+ у всех пациентов с онкологическими заболеваниями и в контрольной группе

| Характеристика                 | Контроль (n=9)        | ОЛЛ (n=20)            | p-значение <sup>1</sup> |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| CD3                            |                       |                       |                         |
| CD3_лимф, %                    | 66,94 (62,52, 76,90)  | 79,56 (67,43, 87,52)  | 0,0617                  |
| CD3_абс, 10 <sup>6</sup> /л    | 2 047 (1 676, 2 264)  | 857,7 (463,6, 1 042)  | 0,0005                  |
| CD3 αβ_лимф, %                 | 91,87 (88,88, 93,70)  | 94,3 (90,31, 97,10)   | 0,1155                  |
| CD3 αβ_абс, 10 <sup>6</sup> /л | 2 666 (2 175, 2 955)  | 914,7 (584,3, 1 453)  | 0,0001                  |
| CD3 γδ_лимф, %                 | 5,59 (3,20, 7,90)     | 2,865 (2,188, 4,358)  | 0,0231                  |
| CD3 γδ_абс, 10 <sup>6</sup> /л | 144,8 (92,47, 219,5)  | 32,44 (19,71, 54,68)  | <0,0001                 |
| CD4                            |                       |                       |                         |
| CD4_лимф, %                    | 43,33 (37,27, 47,17)  | 32,22 (26,69, 42,24)  | 0,0152                  |
| CD4_CD3+лимф, %                | 61,41 (52,16, 67,41)  | 39,91 (34,30, 58,80)  | 0,0071                  |
| CD4_абс, 10 <sup>6</sup> /л    | 1 216 (1 062, 1 461)  | 348,6 (165,4, 628,7)  | 0,0001                  |
| CD4 αβ_лимф, %                 | 42,96 (36,35, 46,56)  | 30,83 (25,82, 40,51)  | 0,0152                  |
| CD4 αβ_CD3+лимф, %             | 60,97 (50,73, 65,78)  | 37,67 (33,01, 56,10)  | 0,0060                  |
| CD4 αβ_абс, 10 <sup>6</sup> /л | 1 179 (1 044, 1 433)  | 320,9 (161,7, 620,6)  | 0,0001                  |
| CD4 γδ_лимф, %                 | 0,026 (0,02, 0,1185)  | 0,0175 (0,009, 0,051) | 0,0829                  |
| CD4 γδ_CD3+лимф, %             | 0,04 (0,03, 0,15)     | 0,025 (0,01, 0,0575)  | 0,0855                  |
| CD4 γδ_абс, 10 <sup>6</sup> /л | 0,819 (0,5025, 3,358) | 0,238 (0,069, 0,5813) | 0,0016                  |
| CD8                            |                       |                       |                         |
| CD8_лимф, %                    | 23,47 (16,97, 29,93)  | 50,64 (36,22, 60,19)  | <0,0001                 |
| CD8_CD3+лимф, %                | 31,67 (26,73, 39,98)  | 40,44 (22,69, 50,43)  | 0,2342                  |
| CD8_абс, 10 <sup>6</sup> /л    | 557 (435,1, 855,0)    | 438,9 (303,5, 601,8)  | 0,1674                  |
| CD8 αβ_лимф, %                 | 21,35 (14,91, 27,35)  | 36,67 (22,09, 46,40)  | 0,0113                  |
| CD8 αβ_CD3+лимф, %             | 30,75 (23,48, 37,24)  | 46,05 (33,85, 55,21)  | 0,0071                  |
| CD8 αβ_абс, 10 <sup>6</sup> /л | 504,2 (394,3, 795,7)  | 308,7 (200,1, 442,1)  | 0,0264                  |
| CD8 γδ_лимф, %                 | 1,14 (0,395, 1,205)   | 0,462 (0,154, 0,6014) | 0,1397                  |
| CD8 γδ_CD3+лимф, %             | 1,42 (0,615, 1,84)    | 0,54 (0,1925, 0,948)  | 0,0598                  |
| CD8 γδ_абс, 10 <sup>6</sup> /л | 29,52 (11,47, 37,97)  | 3,653 (1,941, 9,083)  | <0,0001                 |

Данные представлены как медиана (межквартильный размах). αβ – альфа и бета; γδ – гамма и дельта; лимф – лимфоциты; абс – абсолютное количество. <sup>1</sup>Тест Манна-Уитни, \*\*\*\*p-значение<0,0001, \*\*\*p-значение<0,001, \*\*p-значение<0,01, \*p-значение<0,05.

предыдущими исследованиями, которые предполагали участие DNT-клеток в опухолевом иммунитете и регуляции иммунного ответа, хотя точные механизмы их действия остаются неясными [4].

Опухолевое микроокружение играет ключевую роль в прогрессии рака, особенно в гематологических злокачественных новообразованиях, таких как лейкомия, где костный мозг выступает не только в качестве очага опухоли, но и в качестве центра иммунной регуляции [5]. В этом микроокружении иммунные клетки активно взаимодействуют с лейкоэмическими клетками, влияя на течение заболевания и ответ пациента на лечение [11]. В частности, увеличение количества αβ+DNT-клеток у пациентов с ОЛЛ может отражать попытку иммунной системы регулировать аномальную пролиферацию лейкоэмических клеток. Однако остается неясным, является ли это расширение защитной реакцией или частью более широкой иммунной дисфункции [4].

**αβ+DNT-клетки в иммунитете при лейкомии.** Экспансия αβ+DNT-клеток у детей с ОЛЛ, наблюдае-

мое в нашем исследовании, указывает на возможное участие этих клеток в иммунных ответах на лейкомию. DNT-клетки, особенно те, которые экспрессируют αβ+T-клеточный рецептор, ранее были связаны с регуляцией иммунных ответов при других гематологических злокачественных новообразованиях, таких как острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) [15]. В исследованиях по ОМЛ было показано, что DNT-клетки обладают потенциалом для использования в иммунотерапии благодаря их способности осуществлять цитотоксическое действие без индукции реакции «трансплантат против хозяина» [9]. Эти данные могут быть актуальны и для педиатрического ОЛЛ, где роль DNT-клеток в регуляции иммунного ответа и подавлении опухоли остается недостаточно изученной и требует дальнейшего исследования [4].

**Иммунное микроокружение при педиатрической лейкомии.** Педиатрическая лейкомия представляет собой особую проблему для понимания иммунного ландшафта, так как у детей обычно наблюдает-

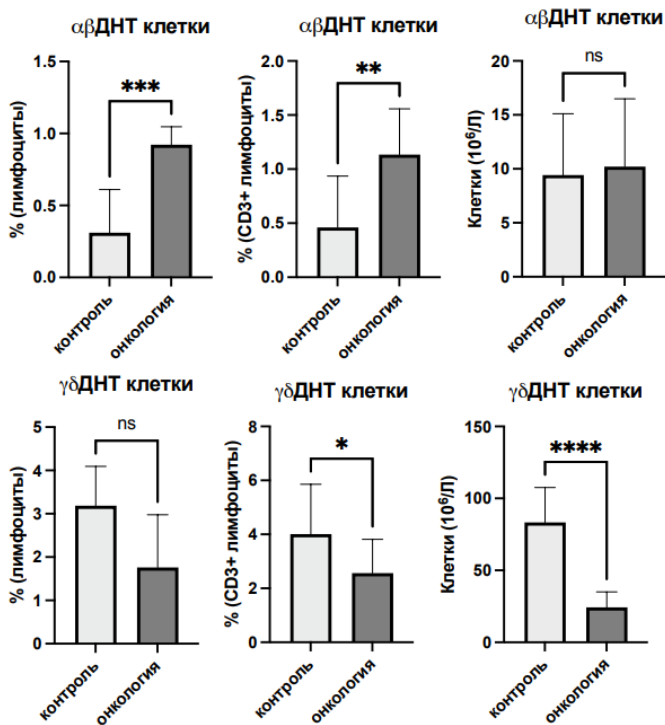


Рисунок 3 – Субпопуляции DNT-клеток

ся меньше соматических мутаций по сравнению со взрослыми, что может ограничивать разнообразие антигенов, доступных для иммунного распознавания [3]. Иммунное микроокружение, особенно в костном мозге, играет критическую роль в формировании течения заболевания. Исследования показали, что лейкоэмическое микроокружение не только поддерживает рост опухоли, но и влияет на поведение иммунных клеток, особенно Т-клеток [5]. По мере прогрессирования ОЛЛ хроническое воздействие антигенов приводит к истощению Т-клеток, особенно в CD8+ популяции, что снижает способность иммунной системы эффективно реагировать на опухоль [13]. Это явление истощения иммунной системы, в сочетании с наблюдаемым увеличением αβ+DNT-клеток, подчеркивает сложное взаимодействие между лейкоэмическими клетками и иммунной системой у детей.

**γδ+DNT-клетки и иммунная регуляция.** В отличие от αβ+DNT-клеток, наше исследование показало, что γδ+DNT-клетки были более многочисленны в контрольной группе по сравнению с пациентами с ОЛЛ. Это может свидетельствовать о том, что γδ+DNT-клетки не играют значительной роли в иммунном ответе на лейкемию, или же лейкоэмическое микроокружение подавляет их функцию. γδ Т-клетки, хотя и менее распространены, чем αβ Т-клетки, играют важные роли как в врожденном, так и в адаптивном иммунитете, особенно в ответ на стрессовые сигналы и распознавание раковых клеток [16]. Сниженные уровни γδ+DNT-клеток у пациентов с ОЛЛ, наблюдаемые в нашем исследовании, могут свидетельствовать о смещении в иммунной динамике, благоприятствующем увеличению αβ+DNT-клеток. Учитывая

известные противоопухолевые свойства γδ Т-клеток при других видах рака, таких как множественная миелома и лимфома, необходимо дальнейшее изучение их роли в педиатрическом ОЛЛ [2].

**Дисбаланс Т-клеточных субпопуляций при ОЛЛ.** Наши данные также выявили значительные изменения в других Т-клеточных субпопуляциях: у пациентов с ОЛЛ наблюдалось значительное снижение количества CD4+ Т-клеток и увеличение количества CD8+ Т-клеток. Этот дисбаланс между CD4+ и CD8+ Т-клетками является индикатором иммунной дисрегуляции, что является характерной чертой лейкемии [12]. В здоровой иммунной системе CD4+ Т-клетки, особенно подгруппа Th1, играют ключевую роль в организации противоопухолевых ответов, активируя CD8+ Т-клетки и натуральные киллеры [8]. Однако снижение количества CD4+ Т-клеток у пациентов с ОЛЛ может нарушать способность иммунной системы к скоординированному противоопухолевому ответу. Напротив, увеличение количества CD8+ Т-клеток может отражать попытку иммунной системы компенсировать утрату функции CD4+ Т-клеток, хотя хроническая активация CD8+ Т-клеток в лейкоэмическом микроокружении часто приводит к их истощению и дисфункции [10].

**Терапевтические перспективы для DNT-клеток.** Наблюдаемое увеличение αβ+DNT-клеток у детей с ОЛЛ позволяет предположить возможность их использования в качестве терапевтических целей. DNT-клетки показали свою перспективность при других гематологических злокачественных заболеваниях, таких как ОМЛ, где их цитотоксические свойства были использованы в иммунотерапевтических испытаниях [15]. Способность DNT-клеток осуществлять цитотоксическое действие без чрезмерного воспаления или повреждения тканей делает их привлекательными кандидатами для терапевтического вмешательства, особенно в педиатрических популяциях, где токсичность, связанная с лечением, является серьезной проблемой [9]. Однако необходимо больше исследований для полного понимания механизмов действия DNT-клеток при ОЛЛ и способов их эффективного применения в будущих иммунотерапиях.

**Ограничения.** Это исследование имеет несколько ограничений, которые следует учитывать в будущих работах. Во-первых, небольшой размер выборки ограничивает обобщаемость наших результатов. Хотя мы наблюдали значительные различия в популяциях DNT-клеток, для подтверждения этих предварительных наблюдений необходимо большее количество участников, что повысит статистическую мощность. Кроме того, это исследование носило поперечный характер, что ограничивает нашу способность оценивать изменения в популяциях DNT-клеток в течение болезни или в ответ на лечение. Продольные исследования необходимы для лучшего понимания того, как DNT-клетки изменяются на различных стадиях ОЛЛ и их возможную роль в устойчивости к лечению или рецидиве. Еще одним ограничением является гетерогенность подтипов ОЛЛ в нашей популяции пациентов, что могло спо-

Таблица 4 – Анализ субпопуляций DNT у всех пациентов с онкологическими заболеваниями и в контрольной группе

| Характеристика                 | Контроль (n=9)       | Пациенты (n=20)      | p-значение <sup>1</sup> |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|
| DNT_лимф, %                    | 3,84 (2,43, 4,82)    | 4,15 (3,30, 5,33)    | 0,3228                  |
| DNT_CD3+лимф, %                | 5,89 (3,34, 6,96)    | 3,04 (2,33, 4,21)    | 0,0113                  |
| DNT_абс, 10 <sup>6</sup> /л    | 101,3 (67,86, 122,4) | 51,66 (26,64, 83,56) | 0,0017                  |
| DNT αβ_лимф, %                 | 0,31 (0,29, 0,61)    | 0,92 (0,72)          | 0,0002                  |
| DNT αβ_CD3+лимф, %             | 0,46 (0,39, 0,94)    | 1,14 (0,82, 1,56)    | 0,0020                  |
| DNT αβ_абс, 10 <sup>6</sup> /л | 9,42 (7,70, 15,11)   | 10,21 (5,49, 16,50)  | 0,7992                  |
| DNT γδ_лимф, %                 | 3,19 (1,76, 4,09)    | 1,76 (1,36, 2,98)    | 0,1047                  |
| DNT γδ_CD3+лимф, %             | 4,01 (2,55, 5,86)    | 2,56 (1,82, 3,82)    | 0,0386                  |
| DNT γδ_абс, 10 <sup>6</sup> /л | 83,36 (48,88, 107,5) | 24,33 (9,79, 35,08)  | <0,0001                 |

Данные представлены как медиана (межквартильный размах). αβ – альфа и бета; γδ – гамма и дельта; лимф – лимфоциты; абс – абсолютное количество. <sup>1</sup>Тест Манна-Уитни, \*\*\*\*p-значение<0,0001, \*\*\*p-значение<0,001, \*\*p-значение<0,01, \*p-значение<0,05

собствовать вариабельности иммунных ответов. Наконец, хотя мы выявили значительные различия в αβ+DNT и γδ+DNT клетках между пациентами с ОЛЛ и контролями, функциональные последствия этих различий остаются неясными. Будущие исследования должны сосредоточиться на изучении функциональных свойств DNT-клеток при ОЛЛ, включая их цитотоксический потенциал и взаимодействие с другими иммунными клетками.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этом пилотном исследовании было выявлено значительное увеличение количества αβ+DNT-клеток у детей с ОЛЛ, что может свидетельствовать о их участии в иммунологическом ландшафте заболевания. Наблюдаемые дисбалансы в Т-клеточных субпопуляциях, в частности снижение количества CD4+ Т-клеток и увеличение CD8+ Т-клеток, подчеркивают сложную иммунную дисрегуляцию при педиатрической лейкемии. Понимание этих динамических процессов будет иметь ключевое значение для разработки будущих иммунотерапий, нацеленных на иммунное микроокружение при ОЛЛ. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить функциональную роль DNT-клеток, особенно подгруппы αβ+, и их потенциал в качестве терапевтических целей при педиатрической лейкемии.

### Вклад авторов:

Д. Поддиге – концепция и дизайн исследования, супервизия проекта.

К. Б. Досыбаева, Г. С. Жубанова, Г. М. Наурызбаева, У. Л. Орумбаева – проведение лабораторной части.

К. Б. Досыбаева – статистическая обработка, подготовка рукописи

Л. Л. Ахмалудинова – анализ данных, подготовка рукописи

Г. С. Жубанова, А. А. Мусаева, А. Ж. Аблаева – сбор и обработка первичных данных, ведение базы данных

К. Т. Нурғалиева, М. Танко (Matthew Naanlep Tanko) – супервизия лабораторной части.

Д. Ж. Нурғалиев, З. Н. Кыздарбекова, Қ. Ф. Шайхызда, Ж. М. Ермагамбетова – набор опытной и контрольной группы, клиническое исследование, интерпретация исследования, редактирование рукописи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Финансирование:

Работа выполнена при поддержке гранта МОН РК AP19677323 «Неконвенциональные Т-клетки периферической крови при педиатрических иммунологических и онкогематологических заболеваниях, акценты на исходе, ответе на терапию, потенциальные мишени терапии»

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bailur J. K. Risk-associated alterations in marrow T cells in pediatric leukemia. *JCI Insight*. 2020; 5 (16): e140179.
2. Barros M. S. γδ T cells for leukemia immunotherapy: New and expanding trends. *Frontiers in Immunology*. 2021; 12: 729085.
3. Chalmers Z. R. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Medicine*. 2017; 9 (1): 34.
4. Chen X. Application of double-negative T cells in haematological malignancies: Recent progress and future directions. *Biomarker Research*. 2022; 10: 11.
5. Duarte D. The interplay of leukemia cells and the bone marrow microenvironment. *Blood*. 2018; 131 (14): 1507-1511.
6. Fang K. K. Targeting T-cell malignancies using allogeneic double-negative CD4-CAR-T cells. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2023; 11 (9): e007277.
7. Hayashi H. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia: A historical perspective. *Cancers*. 2024; 16 (4): 723.
8. Kravtsov D. S. Roles of CD4+ T cells as mediators of antitumor immunity. *Frontiers in Immunology*. 2022; 13: 972021.

9. Lee J. Allogeneic human double-negative T cells as a novel immunotherapy for acute myeloid leukemia and its underlying mechanisms. *Clinical Cancer Research*. 2018; 24 (2): 370-382.

10. Liu X. C. Diagnostic and prognostic value of double-negative T cells in colorectal cancer. *Heliyon*. 2024; 10 (14): e34645.

11. Maimela N. R. Fates of CD8+ T cells in the tumor microenvironment. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2018; 17: 1-13.

12. Mikami T. Alteration of the immune environment in bone marrow from children with recurrent B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Science*. 2022; 113 (1): 41-52.

13. Oliveira J. B. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): Report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*. 2010; 116 (14): 280347.

14. Palen K. Bone marrow-derived CD8+ T cells from pediatric leukemia patients express PD-1 and expand ex vivo following induction chemotherapy. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 2019; 41 (8): 648-652.

15. Saura-Esteller J. Gamma delta T-cell-based cancer immunotherapy: Past-present-future. *Frontiers in Immunology*. 2022; 13: 915837.

16. Strippoli S. Examining the Relationship between Circulating CD4- CD8- Double-Negative T Cells and Outcomes of Immuno-Checkpoint Inhibitor Therapy-Looking for Biomarkers and Therapeutic Targets in Metastatic Melanoma. *Cells*. 2021; 10 (2): 406.

17. Tang B. Allogeneic double-negative T cell therapy for relapsed acute myeloid leukemia patients post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A first-in-human phase I study. *American Journal of Hematology*. 2022; 97: e264-e267.

18. Wu Z. CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2022; 13: 816005.

## TRANSLITERATION

1. Bailur J. K. Risk-associated alterations in marrow T cells in pediatric leukemia. *JCI Insight*. 2020; 5 (16): e140179.

2. Barros M. S.  $\gamma\delta$  T cells for leukemia immunotherapy: New and expanding trends. *Frontiers in Immunology*. 2021; 12: 729085.

3. Chalmers Z. R. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Medicine*. 2017; 9 (1): 34.

4. Chen X. Application of double-negative T cells in haematological malignancies: Recent progress and future directions. *Biomarker Research*. 2022; 10: 11.

5. Duarte D. The interplay of leukemia cells and the bone marrow microenvironment. *Blood*. 2018; 131 (14): 1507-1511.

6. Fang K. K. Targeting T-cell malignancies using allogeneic double-negative CD4-CAR-T cells. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2023; 11 (9): e007277.

7. Hayashi H. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia: A historical perspective. *Cancers*. 2024; 16 (4): 723.

8. Kravtsov D. S. Roles of CD4+ T cells as mediators of antitumor immunity. *Frontiers in Immunology*. 2022; 13: 972021.

9. Lee J. Allogeneic human double-negative T cells as a novel immunotherapy for acute myeloid leukemia and its underlying mechanisms. *Clinical Cancer Research*. 2018; 24 (2): 370-382.

10. Liu X. C. Diagnostic and prognostic value of double-negative T cells in colorectal cancer. *Heliyon*. 2024; 10 (14): e34645.

11. Maimela N. R. Fates of CD8+ T cells in the tumor microenvironment. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2018; 17: 1-13.

12. Mikami T. Alteration of the immune environment in bone marrow from children with recurrent B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Science*. 2022; 113 (1): 41-52.

13. Oliveira J. B. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): Report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*. 2010; 116 (14): 280347.

14. Palen K. Bone marrow-derived CD8+ T cells from pediatric leukemia patients express PD-1 and expand ex vivo following induction chemotherapy. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 2019; 41 (8): 648-652.

15. Saura-Esteller J. Gamma delta T-cell-based cancer immunotherapy: Past-present-future. *Frontiers in Immunology*. 2022; 13: 915837.

16. Strippoli S. Examining the Relationship between Circulating CD4- CD8- Double-Negative T Cells and Outcomes of Immuno-Checkpoint Inhibitor Therapy-Looking for Biomarkers and Therapeutic Targets in Metastatic Melanoma. *Cells*. 2021; 10 (2): 406.

17. Tang B. Allogeneic double-negative T cell therapy for relapsed acute myeloid leukemia patients post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A first-in-human phase I study. *American Journal of Hematology*. 2022; 97: e264-e267.

18. Wu Z. CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2022; 13: 816005.

Поступила 14.07.2024

Направлена на доработку 23.08.2024

Принята 20.10.2025

Опубликована online 31.03.2025

K. Dossybaeva<sup>1</sup>, G. Zhubanova<sup>1</sup>, A. Musaeva<sup>1</sup>, A. Ablaeva<sup>1</sup>, D. Nurgaliev<sup>2</sup>, Z. Kyzdarbekova<sup>2</sup>, K. Shaykhyzada<sup>2</sup>, Zh.Ermagambetova<sup>2</sup>, G. Nauryzbaeva<sup>3</sup>, U. Orumbaeva<sup>3</sup>, K. Nurgalieva<sup>3</sup>, M. Tanko<sup>1, 3</sup>, D. Poddighe<sup>1, 4</sup>, L.Akhmaltdinova<sup>1,5</sup>

### DOUBLE NEGATIVE T-CELLS IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: A PILOT STUDY IN PEDIATRIC PATIENTS

<sup>1</sup>Department of Medicine, Nazarbayev University School of Medicine (020000, Republic of Kazakhstan, Astana city, Kerey Zhanibek Khandar st., 5; e-mail: umc@umc.org.kz)

<sup>2</sup>Program of Pediatric Oncology, Clinical Academic Department of Pediatrics, UMC (Z05K7A4, Republic of Kazakhstan, Astana city, Syganak st., 46; e-mail: umc@umc.org.kz)

<sup>3</sup>Clinical Academic Department of Laboratory Medicine, Republican Diagnostic Center, UMC (Z05K7A4, Republic of Kazakhstan, Astana city, Syganak st., 46; e-mail: umc@umc.org.kz)

<sup>4</sup>Clinical Academic Department of Pediatrics, UMC (Z05K7A4, Republic of Kazakhstan, Astana city, Syganak st., 46; e-mail: bgnncmd@bk.ru)

<sup>5</sup>Hematology Center LLP (100019, Republic of Kazakhstan, Karaganda city, 17 S. Seifullina ave.; e-mail: info@hemcenter.kz)

---

**\*Lyudmila Akhmaltdinova** – Department of Medicine, Nazarbayev University School of Medicine; 020000, Republic of Kazakhstan, Astana city, Kerey Zhanibek Khandar st., 5; Hematology Center LLP; 100019, Republic of Kazakhstan, Karaganda city, 17 S. Seifullina ave.; e-mail: immunol.lab@gmail.com

---

**Objective.** Double negative T cells are involved in various neoplastic processes including hematologic malignancies such as acute lymphoblastic leukemia. These unconventional lymphocytes express neither CD4 nor CD8 and play a role in immune modulation in cancer, particularly in the bone marrow microenvironment. However, their specific involvement in acute lymphoblastic leukemia and other leukemias, especially in pediatric patients, remains poorly understood. The present pilot study aims to characterize double negative T-cells in children with acute lymphoblastic leukemia and compare them with healthy controls.

**Materials and methods.** A prospective, cross-sectional study of 20 children diagnosed with acute lymphoblastic leukemia and 9 healthy, age- and sex-matched control participants was performed. Flow cytometry was used to evaluate lymphocyte subpopulations, including double negative T-cells.

**Results and Discussion.** The total number of double negative T cells significantly increased in patients with acute lymphoblastic leukemia compared to controls. In particular,  $\alpha\beta$ +DNT cells were markedly increased in patients with acute lymphoblastic leukemia both in percentage and absolute values. At the same time,  $\gamma\delta$ +DNT cells were significantly decreased in patients with acute lymphoblastic leukemia in absolute number and in proportion to CD3+ lymphocytes.

**Conclusions.**  $\alpha\beta$ +DNT cells are significantly elevated in children with acute lymphoblastic leukemia, suggesting their possible role in the immune response to leukemia. However, this increase may reflect a broader immune dysregulation rather than being specific to acute lymphoblastic leukemia. Further studies are required to clarify their role in leukemia and to explore their therapeutic potential.

**Key words:** double negative T-lymphocytes; acute leukemia; immunophenotyping; flow cytometry; acute lymphoblastic leukemia

Қ. Б. Досыбаева<sup>1</sup>, Ф. С. Жұбанова<sup>1</sup>, А. Ә. Мұсаева<sup>1</sup>, А. Ж. Аблаева<sup>1</sup>, Д. Ж. Нұрғалиев<sup>2</sup>, З. Н. Қыздарбекова<sup>2</sup>, Қ. Ф. Шайхызада<sup>2</sup>, Ж. М. Ермағамбетова<sup>2</sup>, Г. М. Наурызбаева<sup>3</sup>, У. Л. Орумбаева<sup>3</sup>, Қ. Т. Нұрғалиева<sup>3</sup>, М. Танко<sup>1, 3</sup>, Д. Поддиге<sup>1, 4</sup>, Л. Л. Ахмалтдинова<sup>1, 5</sup>

### ЖЕДЕЛ ЛИМФОБЛАСТИКАЛЫҚ ЛЕЙКОЗДАҒЫ ҚОС ТЕРІС Т-ЖАСУШАЛАРЫ: ПЕДИАТРИЯЛЫҚ НАУҚАСТАРДА ЖҮРГІЗІЛГЕН ПИЛОТТЫҚ ЗЕРТТЕУ

<sup>1</sup>Назарбаев Университетінің Медицина мектебі, Медицина кафедрасы (020000, Қазақстан Республикасы, Астана қ., Керей көш., Жәнібек Хандар 5; e-mail: umc@umc.org.kz)

<sup>2</sup>Балалар онкологиясы бағдарламасы, Педиатрия клиникалық академиялық кафедрасы, Университет медицина орталығы (Z05K7A4, Қазақстан Республикасы, Астана қ., Сығанақ көшесі, 46; e-mail: umc@umc.org.kz)

<sup>3</sup>Республикалық диагностикалық орталық, Университет медицина орталығы (Z05K7A4, Қазақстан Республикасы, Астана қ., Сығанақ к-сі, 46, электрондық поштасы: umc@umc.org.kz)

<sup>4</sup>Педиатрия клиникалық академиялық кафедрасы, Университет медицина орталығы (Z05K7A4, Астана, Қазақстан Республикасы, Сығанақ көш., 46; e-mail: bgnncmd@bk.ru)

<sup>5</sup>«Гематология орталығы» ЖШС (100019, Қазақстан Республикасы, Қарағанды қ., Сейфуллин көшесі, 17; e-mail: info@hemcenter.kz)

**\*Людмила Леонидовна Ахмалтдинова** – Назарбаев Университетінің Медицина мектебі, Медицина кафедрасы (020000, Қазақстан Республикасы, Астана қ., Керей көш., Жәнібек Хандар 5; «Гематология орталығы» ЖШС (100019, Қазақстан Республикасы, Қарағанды қ., Сейфуллин көшесі, 17; e-mail: immunol.lab@gmail.com)

**Зерттеудің мақсаты.** Қос теріс Т жасушалары қатерлі аурулардағы, соның ішінде жедел лимфобластический лейкоз (ЖЛЛ) сияқты гематологиялық қатерлі аурулардағы неопластический процесстерге қатысады. Бұл типтік емес Т лимфоциттер CD4 немесе CD8 маркерлерін білдірмейді және қатерлі ісік кезінде әсіресе сүйек кемігінің микроортасындағы иммундық модуляцияда рөл атқарады. Дегенмен, олардың әсіресе педиатриялық науқастардағы ЖЛЛ мен басқа лейкоздардағы рөлі әлі де терең зерттелмеген. Бұл пилоттық зерттеу ЖЛЛ диагнозы қойылған балалардағы қос теріс Т жасушаларын сипаттауға және оларды сау бақылау топтарымен салыстыруға бағытталған.

**Материалдар мен әдістер.** ЖЛЛ диагнозы қойылған 20 балаға және оларға жасы мен жынысы бойынша сәйкестендіріліп алынған 9 дені сау бақылаушыларға ретроспективті, көлденең зерттеу жүргізілді. Лимфоциттердің субпопуляцияларын, соның ішінде қос теріс Т жасушаларын бағалау үшін ағынды цитометрия қолданылды.

**Нәтижелер және талқылау.** ЖЛЛ диагнозы қойылған науқастарда бақылау тобындағы науқастарға қарағанда қос теріс Т жасушаларының жалпы саны айтарлықтай жоғары болды. Атап айтқанда,  $\alpha\beta$ +DNT жасушалардың мөлшері ЖЛЛ-мен ауыратын науқастарда пайыздық және абсолютті мәндерде өскені байқалды. Алайда,  $\gamma\delta$  + DNT жасушаларының мөлшері ЖЛЛ-мен ауыратын науқастарда абсолютті және CD3+ лимфоциттер үлесіндегі мәндерінде айтарлықтай төмен болғаны байқалды.

**Қорытынды.** ЖЛЛ бар балаларда  $\alpha\beta$ +DNT жасушалар саны айтарлықтай өскен, бұл лейкозға иммундық жауаптағы олардың ықтимал рөлін көрсетуі мүмкін. Дегенмен, бұл ұлғаю ЖЛЛ-ға ғана тән болмай, кеңірек иммундық дисрегуляцияны меңзеуі мүмкін. Олардың лейкоздағы рөлін нақтылау және терапевтік әлеуетін бағалау үшін қосымша зерттеулер қажет.

**Кілт сөздер:** қос теріс Т-лимфоциттер; жедел лейкемия; иммунофенотиптеу; ағынды цитометрия; жедел лимфобластический лейкоз