Stable donor hematopoiesis reconstitution after post-transplantation relapse of acute myeloid leukemia in patient with inv(3)(q21q26), –7 and *EVI1* oncogene overexpression treated by donor lymphocyte infusions and hypomethylating agents

N.N. Mamayev, A.V. Gorbunova, T.L. Gindina, O.A. Slesarchuk, V.N. Ovechkina, S.N. Bondarenko, O.V. Goloshchapov, V.M. Kravtsova, and B.V. Afanasyev

ABSTRACT

We present the case of successful treatment of post-transplantation relapse of prognostically unfavorable AML with inv(3)(q21q26), –7 and *EVI1* oncogene overexpression, when stable donor hematopoiesis reconstitution was achieved due to one high-dose cytarabine course, DLI, and hypomethylating agents (decitabine, 5-azacitidine). Possible molecular mechanisms of this effect are discussed with respect to the new approaches to management of such patients.

Keywords: acute myeloid leukemia, inv(3)(q21q26), *EVI1* high expression, hematopoietic stem cell transplantation, relapse, treatment, donor lymphocyte infusions, hypomethylating agents.

Accepted November 18, 2013

R.M. Gorbacheva Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantology, I.P. Pavlov State Medical University
197022, ul. Lva Tolstogo, d. 6/8, St. Peterburg, Russian Federation

N.N. Mamayev, DSci, Professor, Department of hematology, transfusiology, and transplantalogy

A.V. Gorbunova, Biologist, Laboratory of transplantalogy and molecular hematology

T.L. Gindina, PhD, Head of Laboratory of cytogenetics and genetic disorders

O.A. Slesarchuk, PhD, Head of Department of bone marrow transplantation in adolescents

V.N. Ovechkina, Medical officer, Department of bone marrow transplantation in adolescents

S.N. Bondarenko, PhD, Head of Department of bone marrow transplantation

O.V. Goloshchapov, Head of Intensive care unit

V.M. Kravtsova, Head of Clinacal Laboratory

B.V. Afanasyev, DSci, professor, Director of R.M. Gorbacheva Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantology

Correspondence should be sent to N.N. Mamayev
197022, ul. Lva Tolstogo, d. 6/8, St. Peterburg, Russian Federation
Tel.: +7 (812) 2331243, e-mail: nikmamaev524@gmail.com

Стойкое восстановление донорского гемопоэза у больной с посттрансплантационным рецидивом острого миеломонобластного лейкоза с inv(3)(q21q26), моносомией 7 и экспрессией онкогена *EVI1* после трансфузий донорских лимфоцитов и использования гипометилирующих агентов

Н.Н. Мамаев, А.В. Горбунова, Т.Л. Гиндина, О.А. Слесарчук, В.Н. Овечкина, С.Н. Бондаренко, О.В. Голощапов, В.М. Кравцова, Б.В. Афанасьев

РЕФЕРАТ

Представлено наблюдение успешного лечения посттрансплантационного рецидива острого миеломонобластного лейкоза (М4-вариант по классификации ФАБ) с прогностически неблагоприятными аномалиями: инверсией inv(3)(q21q26), моносомией 7 и гиперэкспрессией гена *EVI1*. Достигнуто стойкое восстановление донорского гемопоэза после 1-го курса высокодозной терапии цитарабином, повторных инфузий донорских лимфоцитов и нескольких курсов гипометилирующими препаратами (децитабин, азацитидин). Обсуждаются возможные молекулярные механизмы этой эффективной терапии с целью ее воспроизведения в будущем у пациентов с аналогичными клиническими ситуациями.

Ключевые слова:
ОМЛ, inv(3)(q21q26), гиперэкспрессия гена *EVI1*, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, рецидивы, лечение, инфузии донорских лимфоцитов, гипометилирующие агенты.

Принято в печать: 18 ноября 2013 г.

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) с inv(3)(q21q26) относятся к прогностически неблагоприятным, что объясняется повышенной экспрессией гена *EVI1*, ответственного за резистентность опухолевых клеток к проводимой химиотерапии и ингибиторам тирозинкиназ [1]. В таких ситуациях выполнение аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) представляется незаменимой. Однако самая большая проблема аллоТГСК связана с высокой частотой посттрансплантационных рецидивов (ПТР). Анализ клинического материала показал, что лечение ПТР может быть различным [2]. Важное место в нем занимают инфузии донорских лимфоцитов (ИДЛ) [3–6] и применение гипометилирующих агентов (ГА) [7]. В настоящей работе представлено клиническое наблюдение стойкого восстановления донорского гемопоэза у больной с ПТР ОМЛ и наличием прогностически неблагоприятных аномалий кариотипа: инверсии inv(3)(q21q26), моносомии 7 и повышенной экспрессии гена *EVI1*.

КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

Больная, 19 лет. С декабря 2010 г. стала беспокоить слабость, отмечались синкопальные состояния и геморрагический синдром. Анализ крови: гемоглобин — 56 г/л, лейкоциты — $8{,}6 \times 10^9$/л. В лейкоцитарной формуле 32 % бластных клеток. С диагнозом острого лейкоза была

Институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
197022, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Таблица 1. Результаты HLA-типирования донора и реципиента

Типирование	A	B	C	DRB1	DQB1
Донор	02:01 25:01	18:01 41:02	07:01 17:03	11:04 13:03	03:01
Реципиент	02:01 25:01	18:01 41:02	07:01 17:03	11:04 13:03	03:01

направлена в отделении гематологии ДГБ № 1. Анализ крови от 09.02.2011 г.: эритроциты — 1,78 × 10^{12}/л, гемоглобин — 57 г/л, тромбоциты — 80 × 10^9/л, лейкоциты — 3 × 10^9/л. В лейкоцитарной формуле: бластные клетки — 10 %, палочкоядерные нейтрофилы — 19 %, сегментоядерные нейтрофилы — 1 %, моноциты — 33 % и лимфоциты — 37 %. В миелограмме: клеточность — 65 000/мкл, бластные клетки — 47,2 %. Последние были представлены двумя популяциями. Одну составляли клетки округло-овальной формы с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, петлистой структурой хроматина без видимых ядрышек. Цитоплазма этих бластных клеток была умеренно базофильной и не содержала зернистости. Второй тип бластных клеток был представлен клетками мезо- и макрогенерации. Ядра были лопастные, бобовидные или округлой формы. Данный тип бластных клеток имел умеренное ядерно-плазматическое отношение и содержал 1–2 ядрышка. Структура хроматина петлистая, цитоплазма представлена в незначительном объеме, умеренно базофильная или серо-голубой окраски. В части клеток содержалась азурофильная зернистость и имел место клазматоз цитоплазмы. Цитохимические реакции: PAS в диффузной форме (+), пероксидаза (+) в 9 % бластных клеток, судан (+) в 12 %, α-нафтилэстераза (+) в 70 % с полным ингибированием натрия фторидом. На основании полученных данных был установлен диагноз ОМЛ (М4-вариант по ФАБ), что нашло подтверждение при проведении иммунофенотипирования: CD34+/–, CD117+, CD13+, CD33+, CD64+, HLA-DR+, CD38+. Кариотип клеток костного мозга: 46,XX, inv(3)(q21q26) [3]/45, idem, –7 [15]/46,XX [2]. По данным молекулярного исследования транслокаций t(8;21) и t(9;22), а также инверсии inv(16) не обнаружено.

Таким образом, на основании проведенных исследований установлен **окончательный диагноз:** острый миеломонобластный лейкоз (М4-вариант по ФАБ) с кариотипом 45,XX, inv(3)(q21q26), –7.

Первая полная клинико-гематологическая ремиссия была достигнута в феврале 2011 г., а через 7 мес. констатирован первый костномозговой рецидив, резистентный к химиотерапии. Экспрессия гена *EVI1* достигала 11,07/100 *ABL*-копий, что выше порогового уровня (10/100 *ABL*-копий). АллоТГСК выполнена 26.10.2011 г. при нормальном клеточном составе костного мозга, но при наличии цитогенетических признаков рецидива лейкоза. На момент трансплантации индекс Карновского — 70 %, рост — 170 см, масса тела — 57 кг, площадь поверхности тела — 1,66 м^2. Пол донора — женский, год рождения — 1989, гемотрансфузий — 0, беременность — 0. Группа крови — A(II), резус-фактор — положительный. Фенотип эритроцитов — DCCeeK–.

Результаты обследования донора и реципиента представлены в табл. 1 и 2.

Режим кондиционирования и профилактики острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ):

- Цитарабин 4 г/м^2/сут (6,6 г/сут) в/в с 15.10.11 по 16.10.11 г. (суммарно 13,3 г).

Таблица 2. Вирусологический статус донора и реципиента

ИФА/ПЦР / Инфекции	Донор		Реципиент
	IgG	IgM	ПЦР
ВПГ	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный
ЦМВ	Отрицательный	Отрицательный	Отрицательный
ЭБВ	Положительный	Отрицательный	Отрицательный
Токсоплазмоз	Положительный ПЦР	Отрицательный	Отрицательный ПЦР
Токсоплазмоз	—		Отрицательный

ВПГ — вирус простого герпеса; ИФА — иммуноферментный анализ; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ЦМВ — цитомегаловирус; ЭБВ — вирус Эпштейна—Барр.

- Бусульфан 4 мг/кг/сут (228 мг/сут) внутрь с 17.10.11 по 19.10.11 г. (суммарно 684 мг).
- CCNU 120 мг/м^2/сут (199 мг/сут) внутрь 22.10.11 г. (суммарно 199 мг).
- Циклофосфамид 1,8 г/м^2/сут (3 г/сут) в/в с 20.10.11 по 21.10.11 г. (суммарно 6 г).
- Антилимфоцитарный глобулин 20 мг/кг/сут (1140 мг/сут) в/в с 20.10.11 по 23.10.11 г. (суммарно 4560 мг).
- Метотрексат 15 мг/м^2/сут (25 мг/сут) в/в 27.10.11 г. и 10 мг/м^2/сут (17 мг/сут) в/в (суммарно 42 мг).
- Такролимус 0,03 мг/кг/сут (1,7 мг/сут) в/в с 16.10.11 г.
- Микофенолата мофетил (СеллСепт) по 0,5 г 2 раза в сутки (1 г) внутрь с 16.10.11 г.

Протокол трансплантации гемопоэтических аллогенных клеток костного мозга от 26.10.11 г.:

- CD34+/кг массы тела пациента — 3,8 × 10^6, NC/кг массы тела пациента — 3,6 × 10^8, NC — 20,5 × 10^9. CD34+ — 1,06 %, CD3+/кг массы тела пациента — 3,5 × 10^7, CD3+ — 9,7 %. Криоконсервирование: (1,7 × 10^5) × 1; (7,6 × 10^5) × 2.

Восстановление показателей крови:

- Лейкоциты более 1 × 10^9/л на Д+23, нейтрофилы более 0,5 × 10^9/л на Д+28. В то же время число тромбоцитов более 25 × 10^9/л не было достигнуто даже на Д+36.
- После проведения аллоТГСК была достигнута вторая полная клинико-гематологическая ремиссия. Вместе с тем уже через 5 мес. (19.03.2012 г.) был диагностирован второй костномозговой рецидив (рис. 1 и 2), который был успешно купирован пов-

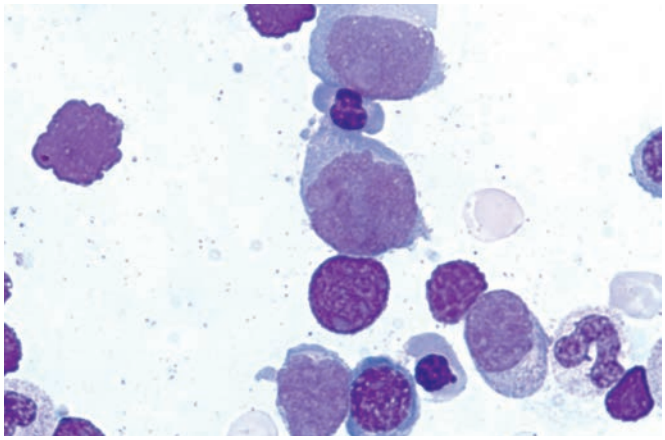

Рис. 1. Костный мозг. Аспират. Посттрансплантационный рецидив острого миеломонобластного лейкоза с inv(3)(q21q26), –7 и гиперэкспрессией гена *EVI1*, иллюстрирующий два типа бластных клеток. Окраска по Романовскому—Гимзе, ×1000

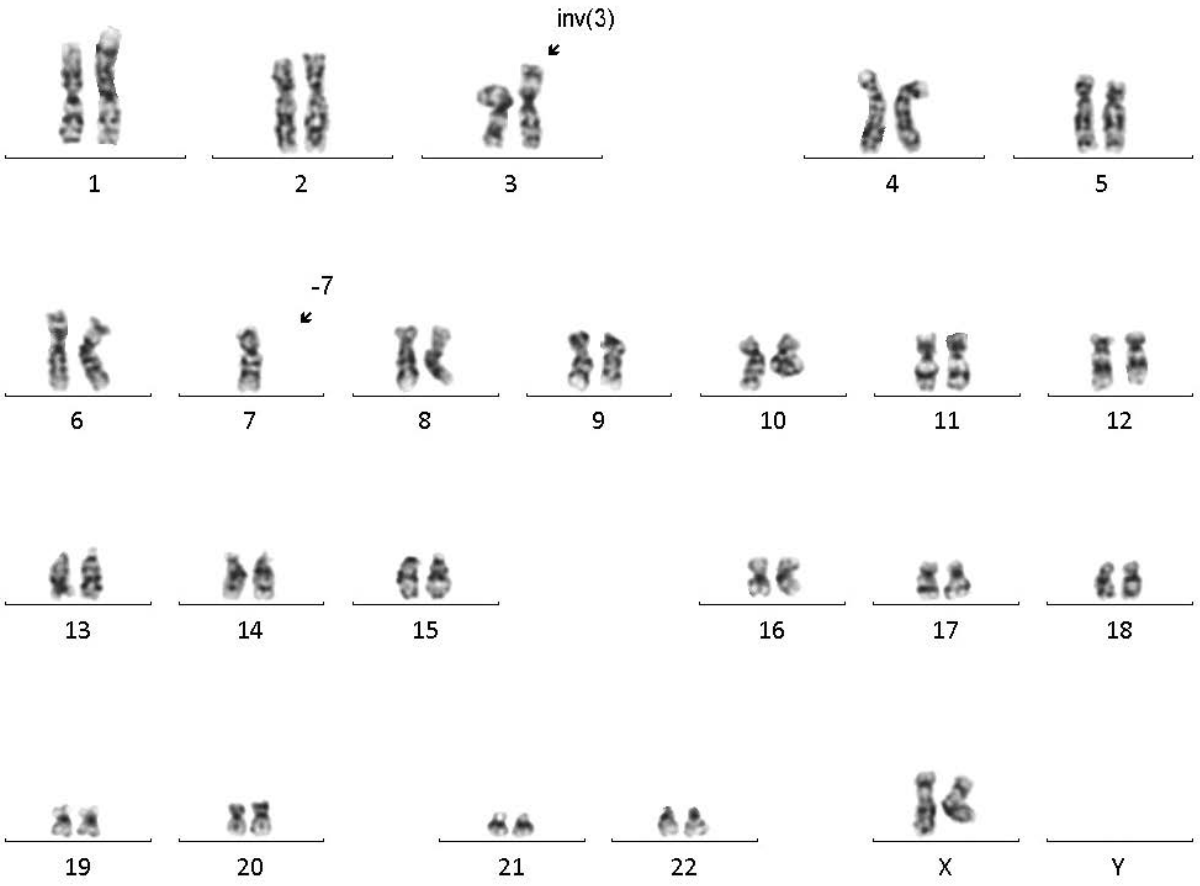

Рис. 2. Кариотип клеток костного мозга на этапе посттрансплантационного рецидива острого миеломонобластного лейкоза с прогностически неблагоприятными аномалиями кариотипа: inv(3)(q21q26), –7 и гиперэкспрессия гена *EVI1*

торными инфузиями донорских лимфоцитов и применением децитабина (рис. 3).

Основные осложнения посттрансплантационного периода:

- острая РТПХ кожи и кишечника I степени (06.01.2012 г.);
- гипофункция трансплантата с последующей глубокой нейтропенией, анемией и тромбоцитопенией IV степени (24.03.2012 г.);
- двусторонняя пневмония вирусно-бактериальной природы;
- симптоматическая эпилепсия.

После первой ИДЛ (02.05.12 г., Д+28) содержание бластных клеток в миелограмме составило 22 %, донорский химеризм был 60–70 %, экспрессия генов *EVI1*/*ABL* × 100 и *WT1*/*ABL* × 10 000 в пределах 25 и 2393 соответственно. Кариотип 46,XX. После второй ИДЛ с 1×10^6 клеток CD3+, а также терапии гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (Неостим) и интерфероном-α (Реаферон) РТПХ не было, но имели место признаки гипофункции трансплантата, что потребовало возобновления гемотрансфузий. При обследовании 24.05.2012 г.: содержание бластных клеток в костном мозге менее 4,4 %, отсутствие нарушений кариотипа, донорский химеризм 80–90 %, а экспрессия генов *EVI1*/*ABL* × 100 и *WT1*/*ABL* × 10 000 на уровне 7,2 и 732,98 соответственно. В период с 29.05.2012 по 04.06.2013 г. больной провели 7 недельных циклов азацитидина в дозе 70 мг/сут.

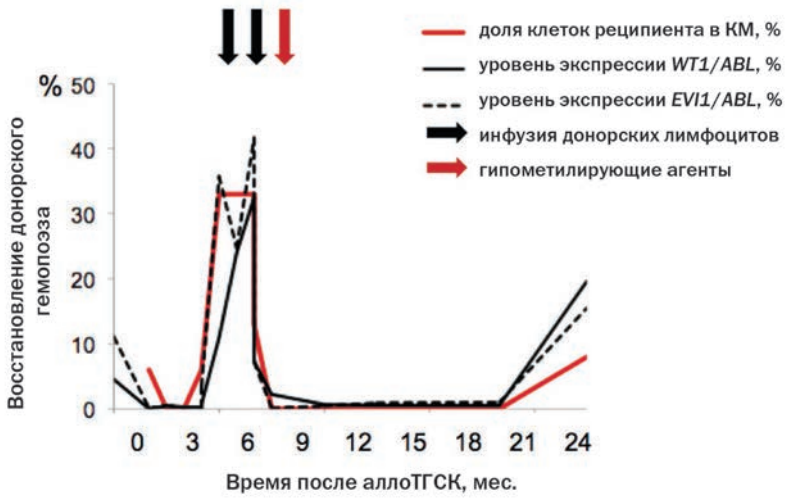

Рис. 3. Восстановление донорского гемопоэза на фоне инфузий донорских лимфоцитов и применения гипометилирующих агентов.
ПРИМЕЧАНИЕ. Молекулярный мониторинг осуществляли по результатам определения уровня экспрессии генов *EVI1* и *WT1* в период ПТР и последующей ремиссии острого миеломонобластного лейкоза с прогностически неблагоприятными аномалиями: inv(3)(q21q26), –7, гиперэкспрессия гена *EVI1*.
КМ — костный мозг.

В общем клиническом анализе крови от 7.03.2013 г.: гемоглобин — 131 г/л, эритроциты — 3,86 × 10^{12}/л, тромбоциты — 131 × 10^9/л, лейкоциты — 6,2 × 10^9/л. В лейкоцитарной формуле: палочкоядерные нейтрофилы — 1 %, сегментоядерные нейтрофилы — 40 %, эозинофилы — 5 %, моноциты — 8 % и лимфоциты — 46 %. В миелограмме от 03.07.2013 г.: недифференцированные бластные клетки — 0,2 %, миелобласты — 0,2 %, промиелоциты — 2,6 %, миелоциты — 22,4 %, метамиелоциты — 11 %, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы — 23,4 и 22 % соответственно, эозинофилы — 2,6 %, моноциты — 2 %, лимфоциты — 6,4 %, проэритробласты — 1,6 %, базофильные нормобласты — 0,6 %, полихроматофильные нормобласты — 4,4 % и оксифильные нормобласты — 1 %. По данным молекулярно-биологического исследования от 03.07.2013 г. более 95 % клеток реципиента имеют донорское происхождение, а гиперэкспрессии генов *EVI1* и *WT1* нет. Цитогенетическое исследование: нормальный женский кариотип 46,XX во всех 20 анализированных клетках. Таким образом, на данном этапе было подтверждено сохранение полной клинико-гематологической, молекулярно-биологической и цитогенетической ремиссий. Жалобы на повышение температуры до 38,5 °С в вечернее время, затруднение дыхания и слабость появились 10.07.2013 г. При обследовании складывалось впечатление о присоединении микоплазменной пневмонии. Кроме того, в крови был выявлен аспергиллезный антиген, хотя убедительных данных, свидетельствующих об аспергиллезе в период с 07.10.2013 по 18.10.2013 г., не получено. В этой связи противогрибковая терапия не проводилась. Эмпирическая антибактериальная терапия привела к нормализации температуры тела и лабораторных показателей.

Очередное плановое клинико-гематологическое обследование было проведено 19.12.2013 г. В миелограмме содержание бластных клеток составило 8 %, сегментоядерных нейтрофилов — 22,4 %, моноцитов — 5,4 %, лимфоцитов — 60,6 %. По данным молекулярно-биологического исследования более 97 % клеток реципиента имели донорское происхождение. Экспрессия гена *WT1*/*ABL* × 10 000 копий равнялась 1965 при пороге разграничения 0–250, в то время как экспрессии гена *EVI1* не было обнаружено. При цитогенетическом исследовании в 30 % метафаз был выявлен ранее установленный патологический кариотип с inv(3q) и моносомией 7, с дополнительной транслокацией t(2;3).

В связи с рецидивом лейкоза больной начат курс противорецидивной терапии, включающий цитарабин и антрациклиновые антибиотики. Наблюдение за больной продолжается.

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное наблюдение демонстрирует успешное лечение ПТР при прогностически неблагоприятном варианте ОМЛ с кариотипом 45,XX, inv(3)(q21q26), моносомией 7 и повышенным уровнем экспрессии гена *EVI1*. По данным литературы [1], наличие в лейкозных клетках высокой экспрессии гена *EVI1* связано с их резистентностью к проводимой химиотерапии, что имело место в настоящем наблюдении. По-видимому, по этой же причине достичь полной цитогенетической ремиссии к моменту проведения аллоТГСК не удалось, а в ранний посттрансплантационный период развился рецидив лейкоза. Несмотря на данное обстоятельство, стабилизацию лейкоза и восстановление донорского гемопоэза удалось достичь после использования комбинации азацитидина и ИДЛ, дополненной цитарабином. Следует отметить, что клинических проявлений РТПХ не наблюдалось. Как известно из литературы, положительный эффект ИДЛ более всего выражен у больных хроническим миелолейкозом, а не острым лейкозом. Вклад ГА в ликвидацию ПТР у больной с *EVI1*-позитивным острым миеломонобластным лейкозом отрицать сложно, тем более что этот ген имеет прямое отношение к метилированию промоторов многих других генов. С другой стороны, появились данные, что получить полную эрадикацию опухолевых клеток с помощью ГА не удается [8]. Это означает, что решающее значение в достижении полной ремиссии следует придавать антилейкозному эффекту ИДЛ. Вероятно, у больных с рецидивом после трансплантации ГА будут избирательно действовать на гиперметилированные патологические клоны клеток, а не на нормальные. Что касается срока назначения и отмены ГА и ИДЛ, то выбор, как показано в настоящей работе, может базироваться на данных серийного определения экспрессии гена *WT1*, повышенный уровень которого служит признанным неспецифическим маркером начинающегося рецидива острого лейкоза [9, 10].

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие скрытых конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. *Мамаев Н.Н., Горбунова А.В., Гиндина Т.Л. и др.* Лейкозы и миелодиспластические синдромы с высокой экспрессией гена EVI1: теоретические и клинические аспекты. Клин. онкогематол. 2012; 5(4): 361–4.
[*Mamayev N.N., Gorbunova A.V., Gindina T.L. et al.* Leukemias and myelodisplastic syndromes with high EVI1 gene expression: theoretical and clinical aspects. Klin. onkogematol. 2012; 5(4): 361–4. (In Russ.)].

2. *Barrett A.J., Battiwalla M.* Relapse after allogeneic stem cell transplantation. Expert. Rev. Hematol. 2010; 3(4): 429–41.

3. *Arellano M.L., Langston A., Winton E. et al.* Treatment of relapsed acute leukemia after allogeneic transplantation: a single center experience. Biol. Blood Marrow Transplant. 2007; 13(1): 116–23.

4. *Porter D.L., Alyea E.P., Antin J.H. et al.* NCI First International Workshop on the biology, prevention, and treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Report from the Committee on Treatment of Relapse after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Biol. Blood Marrow Transplant. 2010; 16: 1467–503.

5. *Pavletic S.Z., Kumar S., Mohty M. et al.* NCI First International Workshop on the biology, prevention, and treatment of relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Report from the Committee on the Epidemiology and Natural History of Relapse following Allogeneic Cell Transplantation. Biol. Blood Marrow Transplant. 2010; 16: 871–90.

6. *Wang Y., Liu D.-H., Fan Z.-P. et al.* Prevention of relapse using DLI can increase survival following HLA-identical transplantation in patients with advanced-stage acute leukemia: a multi-center study. Clin. Transplant. 2012; DOI: 10.111/j.1399-0012.2012.01626.x.

7. *Lubbert M., Bertz H., Wasch R. et al.* Efficacy of a 3-day, low-dose treatment with 5-azacytidine followed by donor lymphocyte infusions in older patients with acute myeloid leukemia or chronic myelomonocytic leukemia relapsed after allografting. Bone Marrow Transplant. 2009; 45(4): 627–32.

8. *Craddock C., Quek L., Goardon N. et al.* Azacitidine fails to eradicate leukemic stem/progenitor cell populations in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. Leukemia 2012; doi: 10.1038/leu.2012.312.

9. *Candoni A., Tiribelli M., Toffoletti E. et al.* Quantitative assessment of WT1 gene expression after allogeneic stem cell transplantation is a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia. Eur. J. Haematol. 2009; 82(1): 61–8.

10. *Zhao X.-S., Jin S., Zhu H.-H. et al.* Wilms' tumor gene 1 expression: an independent acute leukemia prognostic indicator following allogeneic hematopoietic SCT. Bone Marrow Transplant. 2011; doi:10.1038/bmt.2011.121.

Н.Н. Мамаев — доктор медицинских наук, профессор кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии.

А.В. Горбунова — биолог лаборатории трансплантологии и молекулярной гематологии.

Т.Л. Гиндина — кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией цитогенетики и диагностики генетических заболеваний.

О.А. Слесарчук — кандидат медицинских наук, заведующий отделением трансплантации для подростков.

В.Н. Овечкина — врач отделения трансплантации для подростков.

С.Н. Бондаренко — кандидат медицинских наук, заведующий отделом трансплантации костного мозга.

О.В. Голощапов — заведующий отделением интенсивной терапии.

В.М. Кравцова — заведующий клинической лабораторией.

Б.В. Афанасьев — доктор медицинских наук, профессор, директор НИИ Детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачёвой

Адрес для переписки: Н.Н. Мамаев, 197022, ул. Льва Толстого, д. 6/8., Санкт-Петербург, Российская Федерация, тел.: +7 (812) 2331243, e-mail: nikmamaev524@gmail.com