

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КОСТНОГО МОЗГА

BONE MARROW TRANSPLANTATION

Молекулярный мониторинг течения острых миелоидных лейкозов по уровню экспрессии гена *WT1* после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Н.Н. Мамаев, А.В. Горбунова, И.М. Бархатов, Я.В. Гудожникова, Т.Л. Гиндина, В.А. Катерина, Е.В. Волчков, А.Л. Алянский, Е.В. Бабенко, О.А. Слесарчук, Н.В. Станчева, С.Н. Бондаренко, Б.В. Афанасьев

НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022

Molecular Monitoring of *WT1* Gene Expression Level in Acute Myeloid Leukemias after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation

N.N. Mamaev, A.V. Gorbunova, I.M. Barkhatov, Ya.V. Gudozhnikova, T.L. Gindina, V.A. Katerina, E.V. Volchikov, A.L. Alyanskii, E.V. Babenko, O.A. Slesarchuk, N.V. Stancheva, S.N. Bondarenko, B.V. Afanas'ev

R.M. Gorbacheva Scientific Research Institute of Pediatric Oncology Hematology and Transplantation; Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, 6/8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022

РЕФЕРАТ

Цель. Оценить возможности серийного определения уровня экспрессии гена *WT1* для предсказания и диагностики посттрансплантационных рецидивов острых миелоидных лейкозов (ОМЛ).

Методы. С помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени проведено серийное измерение уровня экспрессии гена *WT1* в посттрансплантационный период у 34 больных ОМЛ. Всем 34 пациентам выполнена аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток: неродственная ($n = 22$), родственная ($n = 12$), в т. ч. гаплоидентичная ($n = 4$). У 5 из 34 больных имел место ОМЛ как результат трансформации миелодиспластических синдромов. Параллельно оценивали уровень донорского химеризма и количество бластных клеток в костном мозге и крови. У 8 больных определяли уровень экспрессии генов *AML1/ETO* ($n = 4$) и *EVI1* ($n = 4$), результаты были сопоставлены с таковыми гена *WT1*.

Результаты. На основании изучения данных по экспрессии гена *WT1* выделены две равные группы. Группу 1 составили пациенты со стойкой нормальной экспрессией изученного молекулярного показателя в посттрансплантационный период, а 2-ю — с его нарушенной экспрессией. Исходный уровень экспрессии гена *WT1* практически не зависел от морфоцитохимического и цитогенетического вариантов ОМЛ. В посттрансплантационный период уровень экспрессии коррелировал с таковым генов *AML1/ETO* и *EVI1*. Повышение экспрессии гена *WT1* часто значительно опережало характерное для посттрансплантационных рецидивов ОМЛ снижение уровня донорского химеризма и нарастание содержания бластных клеток в костном мозге и крови.

Заключение. Повышенный уровень экспрессии гена *WT1* может служить не только маркером своевременной диагностики посттрансплантационных рецидивов у больных ОМЛ, но и мониторинговым тестом качества их лечения.

ABSTRACT

Objective. To evaluate the possibility of serial analysis of *WT1* gene expression level for prediction and diagnosis of post-transplant acute myeloid leukemia (AML) relapses.

Methods. Serial analyses of *WT1* gene expression were performed using quantitative real-time PCR during the post-transplant period of 34 patients with AML. All patients underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: unrelated ($n = 22$), related ($n = 12$), including haploidentical ($n = 4$). Five of 34 patients had AML transformed from the myelodysplastic syndromes (MDS). In addition, the level of donor chimerism and the bone marrow/peripheral blood blast cells counts were evaluated. *AML1/ETO* ($n = 4$) or *EVI1* ($n = 4$) gene expression degrees were measured in 8 patients in order to compare those with the *WT1* gene expression.

Results. Based on obtained data on the *WT1* gene expression, two equal subgroups of patients were formed. The first one consisted of patients with stable normal expression of the investigated molecular indicator during the post-transplant period, whereas the second group consisted of patients with impaired expression. The initial level of *WT1* gene expression almost did not depend on both cytological and cytogenetic AML subtypes. During the post-transplant period, the *WT1* gene expression degree correlated with that of *AML1/ETO* or *EVI1*. Increased *WT1* gene expression takes the lead over the decreased donor chimerism and blast cell count increase in bone marrow and blood typical for post-transplant relapses of AML.

Conclusion. The higher level of *WT1* gene expression may serve not only as a marker for timely diagnosis of post-transplant relapses in AML patients, but also as a monitoring parameter for testing their treatment quality.

Ключевые слова: острые миелоидные лейкозы, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, мониторинг экспрессии генов *WT1*, *AML1/ETO* и *EVI1*, диагностика посттрансплантационных рецидивов, молекулярный контроль лечения.

Keywords: acute myeloid leukemias, hematopoietic stem cell transplantation, *WT1* gene expression monitoring, *AML1/ETO* and *EVI1*, diagnosis of post-transplant relapses, molecular monitoring of treatment.

Получено: 19 марта 2015 г.

Принято в печать: 1 июня 2015 г.

Received: March 19, 2015

Accepted: June 1, 2015

Для переписки: Николай Николаевич Мамаев, д-р мед. наук, профессор, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022; тел.: +7(812)233-12-43; e-mail: nikmamaev524@gmail.com

For correspondence: Nikolai Nikolaevich Mamaev, DSci, Professor, 6/8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022; Tel.: +7(812)233-12-43; e-mail: nikmamaev524@gmail.com

Для цитирования: Мамаев Н.Н., Горбунова А.В., Бархатов И.М., Гудожникова Я.В., Гиндина Т.Л., Катерина В.А., Волчков Е.В., Алянский А.Л., Бабенко Е.В., Слесарчук О.А., Станчева Н.В., Бондаренко С.Н., Афанасьев Б.В. Молекулярный мониторинг течения острых миелоидных лейкозов по уровню экспрессии гена *WT1* после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Клин. онкогематол.* 2015; 8(3): 309–320.

For citation: Mamaev N.N., Gorbunova A.V., Barkhatov I.M., Gudozhnikova Ya.V., Gindina T.L., Katerina V.A., Volchkov E.V., Alyanskii A.L., Babenko E.V., Slesarchuk O.A., Stancheva N.V., Bondarenko S.N., Afanas'ev B.V. Molecular Monitoring of *WT1* Gene Expression Level in Acute Myeloid Leukemias after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Klin. Onkogematol.* 2015; 8(3): 309–320. (In Russ.)

ВВЕДЕНИЕ

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) представляют собой гетерогенную группу заболеваний крови с различными генетическими, эпигенетическими и транскрипционными характеристиками, что затрудняет распознавание их после химиотерапии и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) стандартными молекулярными и цитогенетическими методами [1]. Характерные для них некоторые мутации присущи лишь небольшой когорте больных [2, 3], что ставит исследователей перед необходимостью поиска новых молекулярных маркеров прогноза заболевания и диагностики рецидивов, в т. ч. в посттрансплантационный период. Одним из таких маркеров может быть ген *WT1*. В частности, его экспрессия может быть повышена как в дебюте ОМЛ, так и на этапе развития рецидивов [4–10]. Кроме того, гиперэкспрессия гена *WT1* не является редкостью у больных с миелодиспластическими синдромами (МДС) [5, 11–14], острым лимфобластным лейкозом [15, 16] и неходжкинскими лимфомами [16, 17].

Тестирование этого молекулярного маркера для диагностики минимальной остаточной болезни в посттрансплантационный период было впервые осуществлено японскими исследователями [10, 18–20]. Они показали, что после ТГСК уровень экспрессии гена *WT1* может быть ниже, чем в костном мозге доноров, хотя при рецидиве он, как правило, достигает максимума [10]. Оптимальные для решения этой задачи серийные исследования уровня экспрессии гена *WT1* пока проводились относительно редко [21–24]. Материал забирали в интервале от 20 до 30 дней после ТГСК, а продолжительность мониторинга доходила до 3 лет [21]. На основании полученных данных сложилось впечатление, что у молодых больных уровень экспрессии гена *WT1* отчетливо выше, чем в старших возрастных группах, но мало зависит от цитогенетического и морфоцитохимического вариантов лейкоза, так же как и от степени выраженности органомегалии [22]. С другой стороны, экспрессия *WT1* тесно связана с содержанием бластных элементов в костном мозге [25] и с уровнем экспрессии специфических молекулярных маркеров, характерных для изученных лейкозов [4, 8, 10, 26, 27].

Как известно, ген *WT1* расположен на коротком плече хромосомы 11, в локусе 11p13. Он кодирует содержащий «цинковые пальцы» транскрипционный фактор, который в физиологических условиях активно экспрессируется в клетках формирующейся у эмбриона урогенитальной системы, так же как и в клетках мезотелия, тимуса, головного мозга, селезенки и эндотелия. В костном мозге его экспрессия была отмечена в клетках-предшественниках гемопоэза [28, 29]. При этом уровень экспрессии гена *WT1* в бластных клетках практически не зависит от их генетического профиля.

В настоящей работе серийное измерение уровня экспрессии гена *WT1* с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) было использовано для мониторинга течения ОМЛ в посттрансплантационный период у 34 больных, наблюдавшихся в одном трансплантационном центре. Фактически оно было направлено на оценку качества трансплантации, своевременное распознавание возможных рецидивов, а в случае их развития — на попытку терапии.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 34 больных ОМЛ. У 5 (№ 9, 10, 24, 26 и 27) из них была трансформация МДС в ОМЛ. Лиц мужского пола было 20, женского — 14, в возрасте от 3 до 60 лет (средний возраст 25,5 года) (табл. 1). Количество введенных больным CD34-позитивных клеток варьировало от 1,4 до $11,2 \times 10^6$ /кг массы тела реципиента (в среднем $4,8 \times 10^6$ /кг массы тела). У 22 больных была выполнена неродственная ТГСК, у 12 — родственная, в т. ч. гаплоидентичная у 4 человек. Кроме того, у 3 больных из-за неэффективности первой ТГСК гаплоидентичная ТГСК была проведена как метод спасения.

У половины больных источником трансплантата был костный мозг, а у другой половины — периферическая кровь. У 13 пациентов в качестве режима кондиционирования применили миелоаблативный режим, а у 21 — немиелоаблативный или режим со сниженной токсичностью. В итоге приживление трансплантата в ожидаемый срок имело место у 31 больного, в то время как у 3 пациентов

было отмечено или его неприживление, или последовавшее за приживлением отторжение (№ 26, 28 и 29).

Молекулярное исследование уровня экспрессии генов *WT1*, *AML1/ETO* и *EVII* проводили с помощью количественной ПЦР в реальном времени, сопоставляя полученные данные с уровнем экспрессии в клетках гена *ABL*. Поскольку у 4 больных с М2-вариантом ОМЛ имело место стандартное слияние генов *AML1/ETO*, а у 4 других отмечена гиперэкспрессия гена *EVII*, это позволило нам сопоставить диагностические значения уровня их экспрессии

в плане предсказания посттрансплантационного рецидива (ПТР). Кроме того, данные по степени экспрессии гена *WT1* были сопоставлены с уровнем донорского химеризма и количеством бластных клеток в костном мозге и крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как видно из данных табл. 1, максимальный исходный уровень экспрессии гена *WT1* варьировал от 175 до 56 884 копии/10⁴ копий гена *ABL* (средний уровень

Таблица 1. Клинические данные и уровень экспрессии гена *WT1* до и после аллотГСК у больных острыми миелоидными лейкозами

Пациент №	Пациент		ТГСК		Уровень экспрессии гена <i>WT1</i>										Время наблюдения от ТГСК, дни
	Пол, возраст (лет)	Вариант лейкоза	Клинический статус, дата, (число клеток CD34+, ×10 ⁶ /кг)	Вид ТГСК, режим кондиционирования	До ТГСК	После ТГСК, дни									
Группа с нормализацией экспрессии гена <i>WT1</i> после ТГСК															
1	М, 19	М4	Рец. 1, 18.08.14, (5,4)	Н/р, мбл	14 928	176	206	–	–	–	–	–	–	–	70
2	М, 17	М1	Рем. 1, 29.08.12, (3,2)**	Н/р, н/мбл	13 542	91	44	20	–	49	–	52	44	789*	
3	Ж, 11	М1	Перв. рез., 25.03.14, (4,8)	Гапло, мбл	11 168	32	–	–	–	–	–	–	–	140***	
4	М, 54	М5	Рем. 2, 4.12.13, (4,1)**	Н/р, н/мбл	9630	60	40	34	–	7	12	67	6	327	
5	М, 41	М4	Рем. 1, 5.09.14, (6,3)**	Н/р, н/мбл	5457	92	–	–	–	–	–	–	–	108	
6	М, 17	М3	Рем. 2, 6.03.14, (4,1)	Р, мбл	4375	92	–	–	–	0	63	–	–	501	
7	Ж, 32	М1	Рец. 1, 16.02.14, (1,7)	Н/р, мбл	3779	214	13	0	112	118	–	–	–	142***	
				Ауто	–	–	–	–	–	–	–	–	–		
8	М, 14	М2	Рем. 3, 3.07.12, (1,8)	Р, н/мбл	3481	–	17	–	–	–	–	–	–	840	
9	М, 22	М4?*	МДС, 2.02.12, (1,8)	Н/р, н/мбл	3151	–	30	27	8	2	–	–	–	271***	
10	Ж, 22	М1?*	Перв. рез., 21.01.13, (2,7)	Р, н/мбл	2591	125	–	–	26	–	–	–	–	331***	
11	М, 26	М4	Рец. 2, 20.01.12, (5,5)**	Н/р, мбл	2258	100	67	53	–	143	–	–	110	762	
12	М, 15	М4	Рем. 1, 16.06.14, (6,1)	Р, мбл	1948	12	188	38	–	–	–	–	–	126	
13	Ж, 25	М4	Рем. 1, 22.02.13, (4,0)**	Р, мбл	1818	43	–	15	–	–	37	56	123	610	
14	Ж, 25	М1	Рец. 1, 21.08.13, (6,0)**	Н/р, н/мбл	1763	42	7	26	–	–	–	47	–	365	
15	Ж, 60	М1	Рем. 2, 18.09.13, (8,1)	Н/р, н/мбл	1728	55	30	14	–	–	–	–	–	59	
16	М, 5	М4	Рем. 1, 21.11.13, (2,1)	Н/р, н/мбл	999	7	13	–	–	–	–	–	–	340	
17	М, 17	М4	Рем. 1, 16.05.13, (6,0)**	Н/р, н/мбл	866	42	1	29	–	45	–	5	120	529	
Группа с нарушенной экспрессией гена <i>WT1</i> после ТГСК															
18	Ж, 13	М2	Рец. 1, 12.05.11, (5,2)**	Гапло, мбл	56 884	18	–	–	–	–	–	–	–	35***	
19	М, 58	М2	Рец. 1, 13.06.13, (2,6)	Р, н/мбл	26 100	–	–	893	–	–	–	–	135	595	
20	Ж, 10	М4	Рец. 1, 26.10.12, (11,9)**	Н/р, мбл	11 735	161	–	–	–	–	–	–	–	53***	
21	Ж, 55	М4	Рец. 1, 8.08.12, (5,4)**	Н/р, н/мбл	11 686	1100	1020	0	–	–	–	–	–	101***	
22	Ж, 14	М2	Рец. 2, 24.04.14, (5,0)**	Н/р, н/мбл	11 467	322	524	175	63	8610	1216	–	–	280+	
23	М, 32	М4	Рец. 2, 15.12.11, (5,9)**	Н/р, н/мбл	6846	373	289	–	12 414	–	–	–	–	132***	
24	Ж, 35	М1*	Рец. 1, 27.03.12, (3,3)	Р, мбл	5870	259	44	–	–	–	–	–	–	119***	
25	Ж, 3	М7	Рец. 1, 19.08.14, (10,0)**	Н/р, мбл	3693	–	1049	–	–	–	–	–	–	225	
26a	М, 12	М?*	Перв. рез., 9.08.12, (2,2)**	Н/р, н/мбл	3204	2220	2638	114	–	51	–	–	–	414***	
26b			Рец. 1, 2.04.13, (2,3)	Гапло, н/мбл	51	43 113	3885	–	–	–	–	–	–		
27	М, 32	М?*	МДС, 27.02.13, (2,3)**	Н/р, н/мбл	147	4000	997	24	–	18	–	–	1706	125***	
28a	Ж, 26	М1	Рем. 1, 17.07.13, (2,65)	Н/р, мбл	1049	6	35	48	29	19	1683	–	60	559	
28b			Рец. 2, 3.10.14, (7,1)	Гапло, н/мбл	–	–	–	–	–	–	–	–	–		
29a	Ж, 17	М4	Рец. 2, 26.10.11, (3,8)	Н/р, н/мбл	451	0	48	28	70	1093	221	–	1966	1189	
29b			Рец. 3, 18.03.14, (7,2)	Гапло, н/мбл	867	2025	10	4401	12	59	–	–	–		
30	М, 30	М1*	Рем. 1, 13.10.12, (6,8)**	Н/р, н/мбл	725	284	1833	3107	161	2649	–	–	–	194***	
31	М, 22	М4	Рем. 1, 17.07.13, (3,5)**	Н/р, мбл	290	122	69	118	272	–	33	–	76	559	
32	М, 26	М5	Рец. 2, 4.12.13, (2,8)	Р, н/мбл	176	–	151	161	1764	–	4542	–	–	832	
33	М, 53	М7*	Рец. 1, 15.12.10, (2,3)	Гапло, н/мбл	–	–	–	–	–	–	864	–	–	1616	
			Рец. 1, 17.12.10, (4,1)**		–	–	–	–	–	–	–	–	–		
34	М, 6	М4	Рец. 2, 13.08.13, (10,8)	Гапло, н/мбл	–	–	–	–	–	–	–	–	378	532	

«—» — нет данных или исследование не проводилось; гапло — гаплоидентичная ТГСК; М? — подвариант ОМЛ не уточнен; мбл и н/мбл — миелоаблативный и немиелоаблативный режимы кондиционирования; н/р — неродственная ТГСК; р — родственная ТГСК; рем./рец. 1, 2, 3 — ремиссия/ рецидив 1, 2, 3-й; перв. рез. — первичная резистентность к химиотерапии.

* ОМЛ, трансформировавшийся из МДС.

** Источником CD34-позитивных клеток в данном наблюдении была периферическая кровь донора, а не костный мозг.

*** Смертельный исход.

7070 копий). Он мало зависел от морфоцитохимического варианта лейкоза и цитогенетического профиля бластных клеток. В то же время по характеру реакции на ТГСК больные распределились на две равные группы.

Группу 1 составили больные № 1–17, у которых исходный уровень экспрессии гена *WT1* был в интервале от 866 до 14 928 копий/ 10^4 копий гена *ABL* (среднее значение 4913,7 копий). В процессе посттрансплантационного мониторинга имела место закономерная стойкая нормализация уровня экспрессии *WT1*. Как правило, это сопровождалось достижением у больных высокого уровня донорского химеризма, а также нормализацией в крови и костном мозге содержания бластных элементов. Сложный кариотип обнаружен у 4 (24 %) пациентов (№ 2, 3, 7 и 17), а гиперэкспрессия гена *EVII* была отмечена у 2 (№ 3 и 9). Неродственная аллоТГСК была выполнена 11 (65 %) больным этой группы (№ 1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 14–17), а родственная — 6 (35 %) (№ 3, 6, 8, 10, 12 и 13), в т. ч. гаплоидентичная — 1 (№ 3). Как видно из данных табл. 1, у 10 больных аллоТГСК была проведена в 1, 2 и 3-й ремиссиях (№ 6, 3 и 1 соответственно), а у 4 — в 1-м (№ 1, 7, 14) или во 2-м (№ 11) рецидиве ОМЛ. У 2 больных (№ 3 и 10) перед аллоТГСК была констатирована первичная резистентность к химиотерапии, а у 1 пациента аллоТГСК выполнялась еще на этапе МДС, позднее трансформировавшегося в ОМЛ.

Среднее количество вводимых реципиентам CD34-позитивных клеток/кг массы тела составляло $4,3 \times 10^6$ /кг (диапазон $1,7–4,8 \times 10^6$ /кг). В качестве режима кондиционирования у 7 больных использовался миелоаблативный (№ 1, 3, 6, 7 и 11–13), а у 10 — немиелоаблативный. За редким исключением, приживление трансплантата происходило в ожидаемый срок. В итоге под наблюдением оставалось 12 (70 %) пациентов, умерло 5 (№ 2, 3, 7, 9 и 10). Среди последних 3 (№ 2, 3 и 7) имели сложный кариотип, у 2 (№ 2, 3) был наиболее высокий исходный уровень экспрессии гена *WT1*, а у 3 пациентов (№ 7, 9 и 10) количество введенных CD34-позитивных клеток не достигало 3×10^6 /кг массы тела. Причинами смерти стали инфекции (№ 3, 9), прогрессирование основного заболевания (№ 3) и неприживление трансплантата (№ 9). Средняя продолжительность жизни больных в этой группе составляла 462 дня (диапазон 140–1103 дня).

Группу больных с нарушенной экспрессией гена *WT1* в посттрансплантационный период составили также 17 пациентов (№ 18–34).

Средний исходный уровень экспрессии гена *WT1* у больных этой группы составил 10 121 копия/ 10^4 копий гена *ABL* (диапазон 175–56 884 копии), что заметно выше, чем в 1-й группе больных (4914 копий). Однако из-за малого числа наблюдений выявленные различия статистически незначимы. Лейкозы со сложным кариотипом (№ 2, 7, 16, 18, 22, 28, 29 и 32) и гиперэкспрессией гена *EVII* (№ 25, 29 и 32) были диагностированы у 8 (54 %) и 3 (24 %) больных соответственно, причем у 3 пациентов (№ 28, 29 и 30) оба маркера были представлены одновременно. Неродственная аллоТГСК была выполнена 11 больным, а родственная — 6, причем 3 из них гаплоидентичная. Костный мозг стал источником гемопоэтических стволовых клеток у 7 пациентов, а периферическая кровь — у 10. Как видно из данных табл. 1, среднее количество CD34-позитивных клеток, введенных в этой группе больным, составляло

$4,78 \times 10^6$ /кг (диапазон $2,2–11,9 \times 10^6$ /кг массы тела), что практически не отличалось от соответствующего показателя в 1-й группе. В качестве режимов кондиционирования у 6 больных применили миелоаблативный, а у 11 — немиелоаблативный. Как правило, приживление трансплантата происходило в ожидаемый срок. ПТР были зарегистрированы у всех больных. В 8 наблюдениях (№ 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27 и 30) констатирован летальный исход. Средняя продолжительность жизни ко времени проведения статистического анализа равнялась 559 дням (диапазон 35–1616 дней). Необходимо отметить, что у некоторых больных (№ 33, 34) данные о гиперэкспрессии гена *WT1* перед трансплантацией отсутствовали. В посттрансплантационный период они были определены и указывали на возможность развития ПТР. Общая 3-летняя выживаемость больных в 1-й группе составила 78 %, а во 2-й — 52 % ($p = 0,08$).

Дополнительный анализ материала (табл. 2) показал, что повышение уровня экспрессии гена *WT1* отчетливо совпадало по времени с увеличением количества бластных клеток в костном мозге и/или крови. Следует отметить, что в ряде наблюдений (№ 28–32) молекулярный рецидив значительно опережал морфологический, что ранее было продемонстрировано и другими исследователями [30]. По нашим данным, подтверждающим ранее опубликованные в литературе [21], диагностика ПТР на основании серийного измерения уровня донорского химеризма значительно уступает таковой с помощью серийного измерения уровня экспрессии специфических и неспецифических молекулярных маркеров, в частности гена *WT1*.

В свою очередь, серийно проведенные молекулярные исследования обнаруживают четкую связь изменений уровня экспрессии гена *WT1*, с одной стороны, и *AML1/ETO*, *EVII* — с другой, что может служить основанием для активного его использования как в ранней диагностике ПТР, так и в качестве мониторинга эффективности их лечения. Иллюстрацией сказанному являются рис. 2, 4 и сопровождающие их краткие выписки из историй болезни.

Клиническое наблюдение 1

Больная № 18, 13 лет, ОМЛ, ФАБ-вариант М2, 1-й рецидив. Обнаружены транслокация $t(8;21)(q22;q22)$ и необычные дополнительные перестройки хромосом (рис. 1), в частности с переносом части длинного плеча хромосомы 17 на другие (1, 2, 13, 14). Кроме того, важной отличительной чертой лейкоза у этой больной была наивысшая исходная экспрессия в клетках гена *WT1*, равная 56 884 копиям/ 10^6 копий гена *ABL*. С другой стороны, из-за отсутствия в семье и в регистрах НЛД-совместимого донора в качестве источника CD34-позитивных клеток стала кровь от гаплоидентичной матери. Немаловажно и то, что из-за быстрого прогрессирования патологического процесса гаплоТГСК у этой больной выполнена до достижения ремиссии. При этом были использованы миелоаблативный режим кондиционирования и достаточное количество CD34-позитивных клеток ($5,2 \times 10^6$ /кг массы тела). Достичь должного лечебного эффекта от гаплоТГСК не удалось. Больная умерла на 35-й день после трансплантации, когда содержание бластных элементов в пунктате костного мозга (Д+34) достигло 94,2 %, а уровень донорского химеризма снизился до 5 %.

Таблица 2. Характеристика больных с нарушением уровня экспрессии гена *WT1* в посттрансплантационный период

Пациент №	АллотГСК		Дата анализа (день до/после ТГСК)	Уровень экспрессии гена <i>WT1</i>	До-норский химеризм	Содержание бластных клеток в костном мозге/крови	Специфические молекулярные маркеры	Дата последнего наблюдения или смерти	Время наблюдения от даты ТГСК, дни
	Дата, вид, режим	Количество клеток CD34+ кг массы							
18	12.05.11, гапло, мбл	5,2	22.03.11 (Д-510)	56 884		28,4/36,0	<i>AML1/ETO</i>	16.06.11*	35
			3.05.11 (Д-12)	–		50,0/–	305		
			1.06.11 (Д+20)	18	5–10	38,0/43,0	300		
			15.06.11 (Д+34)	–	< 5	94,2/–	–		
19	13.06.13, р, н/мбл	2,6	3.06.13 (Д-10)	26 100		45,0/–	<i>AML1/ETO</i>	27.01.15	595+
			8.07.13 (Д+25)	–	> 95	1,2/0	482		
			12.08.13 (Д+60)	–	> 95	2,4/0	–		
			30.09.13 (Д+109)	893	> 97	0,2/0	–		
			17.03.14 (Д+277)	135	> 97	1,6/0	0,05		
20	26.10.12, н/р, мбл	11,9	До	11 735		69,0/17,0	Уровень экспрессии <i>AML1/ETO</i> не определялся	18.12.12*	53
			18.09.12 (Д-38)	9		–/–	–		
			12.11.12 (Д+17)	161	–	0,4/0	–		
			22.11.12 (Д+29)	132	–	–/–	–		
21	8.08.12, н/р, мбл	5,4	7.05.12			10,0/–	Уровень экспрессии <i>AML1/ETO</i> не определялся	17.11.12*	101
			22.05.12 (Д-78)	1686		68,0/19,0	–		
			25.07.12 (Д-34)	5471		17,0/0	–		
			6.09.12 (Д+29)	1100	90–95	6,0/0	–		
			20.09.12 (Д+43)	53	> 95	1,4/0	–		
			4.10.12 (Д+57)	1020	> 95	20,8/0	–		
			15.10.12 (Д+68)	852	> 95	1,2/0	–		
			25.10.12 (Д+78)	0	> 95	4,2/0	–		
15.11.12 (Д+99)	55	> 95	1,0/0	–					
22	24.04.14, н/р, н/мбл	5,0	28.01.13	5198		71,0/60,0	<i>AML1/ETO</i>	27.01.15	280+
			24.12.13	–		22,0/–	188		
			4.02.14	0		0,8/	189		
			21.03.14	–		0,8/–	0		
			26.03.14	–		–/–	0,06		
			17.04.14 (Д-7)	11 467		5,4/0	–		
			19.05.14 (Д+25)	87	> 97	4,0/0	35,8		
			5.06.14 (Д+42)	524	> 97	0,6/0	8,5		
			30.06.14 (Д+67)	20,0	70–79	37,0/0	10,1		
			4.08.14 (Д+102)	164	> 97	0,4/0	405		
			9.10.14 (Д+168)	8610	40–49	74,0/28,0	0,2		
			13.11.14 (Д+212)	16	90–97	0,2/0	176		
			23	15.12.11, н/р, н/мбл	5,9	23.08.11 (Д-86)	2316		
28.11.11 (Д-17)	–					4,2/–	–		
1.12.11 (Д-14)	6846					7,8/0	–		
29.12.11 (Д+14)	373	90–95				–/1,0	–		
13.02.12 (Д+60)	289	–				8,6/–	–		
12.03.12 (Д+87)	120	–				7,0/–	–		
18.04.12 (Д+124)	13 414	–				84,0/–	–		
24	27.03.12, р, мбл	3,3	20.02.12 (Д-36)	5870		28,0/44,0	Уровень экспрессии <i>EVI1</i> не определялся	3.08.14*	119
			19.04.12 (Д+23)	259	> 97	1,2/0	–		
			14.05.12 (Д+47)	–	80–90	–	–		
			23.05.12 (Д+56)	–	50–60	–	–		
			6.06.12 (Д+71)	44	40–50	–	–		
25	19.06.14, н/р, мбл	10,0	18.12.13 (Д-172)	282		27,8/3,0	<i>EVI1</i>	27.01.15	222+
			7.04.14 (Д-72)	42		4,6/–	18		
			10.06.14 (Д-9)	3693		13,6/–	5		
			5.07.14 (Д+16)	0	> 97	1,0/–	90		
			29.07.14 (Д+40)	–	> 97	–/–	22		
			18.08.14 (Д+60)	1049	> 97	20,0/–	–		
			2.10.14 (Д+104)	–	–	60,8/–	53		
							–		

Пациент №	АллоТГСК		Дата анализа (день до/после ТГСК)	Уровень экспрессии гена <i>WT1</i>	До-норский химеризм	Содержание бластных клеток в костном мозге/крови	Специфические молекулярные маркеры	Дата последнего наблюдения или смерти	Время наблюдения от даты ТГСК, дни						
	Дата, вид, режим	Количество клеток CD34+/кг массы													
26a	9.08.12, н/р, н/млб	2,2	29.02.12 (Д-162)	3204		10,0/0	Уровень экспрессии <i>EV11</i> не определялся	27.09.13*	414						
			17.04.12 (Д-112)	–		4,0/–									
			29.08.12 (Д+20)	–	80–90	–/–									
			08.10.12 (Д+60)	27	–	–/–									
			23.10.12 (Д+75)	80	–	–/–									
			08.11.12 (Д+91)	2220	–	6,6/–									
			26.11.12 (Д+109)	2638	–	2,8/–									
			8.01.13 (Д+152)	–	–	52,9/83,0									
			31.01.13 (Д+185)	11 468	–	79,0/–									
			25.03.13 (Д+228)	51?	< 5	–/20,0									
			31.03.13 (Д+234)	–	–	–/20,0									
			11.04.13 (Д+245)	–	< 5	–/–									
			26b	3.04.13, гапло, н/млб		23.04.13 (Д+20)				–	> 95	–/1,0			
						29.04.13 (Д+26)				–	> 95	0,4/0			
13.05.13 (Д+40)	–	> 95				–/0									
28.05.13 (Д+55)	–	–				–/0									
20.06.13 (Д+78)	43 113	80–90				31,0/4,0									
25.06.13 (Д+83)	–	> 95				–/0									
1.07.13	–	–				–/4,0									
4.07.13	–	90–95				–/–									
8.07.13	–	80–90				–/5,0									
11.07.13	–	–				–/14,0									
15.07.13	–	–				–/21,0									
18.07.13	–	–				–/41,0									
23.07.13	38 859	10–20				49,8/41,0									
15.08.13	–	20–30				41,0/–									
20.08.13	–	20–30	–/43,0												
23.08.13	–	–	–/79,0												
27.08.13	–	–	–/55,0												
27	27.02.13, н/р, н/млб	2,3	21.03.13 (Д+22)	147	90–95	1,8/0	Уровень экспрессии <i>EV11</i> не определялся	29.06.13*	125						
			27.03.13 (Д+28)	1706	–	1,8/0									
			3.04.13 (Д+35)	4000	10	31,8/–									
			6.05.13 (Д+68)	997	–	–/–									
			20.05.13 (Д+82)	–	–	–/–									
28	17.07.13, н/р, млб	2,65	12.12.12 (Д-217)	1049		84,2/61,0	<i>EV11</i>	27.01.15	559+						
			14.01.13	110		–/–				23					
			29.05.13 (Д-49)	44,6		1,8/0				8,3					
			26.06.13 (Д-21)	61,2		3,4/0				3					
			1.08.13 (Д+15)	6,2	80–90	0,6/0				2					
			12.09.13 (Д+57)	35	80–90	2,2/0				1					
			3.10.13 (Д+78)	41	80–90	1,2/0				0,3					
			21.10.13 (Д+96)	48	80–90	4,4/0				2					
			6.11.13 (Д+112)	29	80–90	1,6/0				1					
			21.11.13 (Д+127)	19	80–90	0,4/0				2					
			25.12.13 (Д+161)	19	80–90	0/0				–					
			13.01.14 (Д+180)	282	80–90	4,2/0				–					
			24.01.14 (Д+191)	29	–	–/–				3					
			6.02.14 (Д+204)	488	80–89	0,4/0				–					
			20.02.14 (Д+218)	1653	70–79	11,6/0				7					
			4.03.14 (Д+233)	–	–	54,2/0				–					
			8.04.14 (Д+265)	60	> 97	0,4/0				4					
			24.04.14 (Д+281)	6	90	0,4/0				0,3					
			19.05.14 (Д+306)	8	60–69	1,0/0				1					
			4.06.14 (Д+322)	1	80–89	1,0/0				0,5					
			25.06.14 (Д+343)	–	80–89	0,4/0				–					
			21.08.14 (Д+397)	2500	60–70	45,4/–				10					
			25.09.14 (Д+404)	–	3–9	90,0/0				–					
			3.10.14, гапло, н/млб	7,1	22.10.14 (Д+19)	22				90–97	1,0/0	1			

Пациент №	АллотГСК		Дата анализа (день до/после ТГСК)	Уровень экспрессии гена <i>WT1</i>	До-норский химеризм	Содержание бластных клеток в костном мозге/крови	Специфические молекулярные маркеры	Дата последнего наблюдения или смерти	Время наблюдения от даты ТГСК, дни
	Дата, вид, режим	Количество клеток CD34+/кг массы							
29	26.10.11, н/р, мбл	3,8	9.09.11 (Д-47)	6846		12,0/0	<i>EV11</i>	27.01.15	1189+
			21.09.11 (Д-35)	–		45,2/0	–		
			13.10.11 (Д-13)	451		45,5/0	11		
			9.11.11 (Д+14)	–	30–40	1,6/0	–		
			15.11.11 (Д+20)	–	–	1,4/0	–		
			23.11.11 (Д+28)	0,01	90–95	1,0/0	–		
			5.12.11 (Д+40)	–	90–95	1,0/0	–		
			14.12.11 (Д+49)	–	> 95	0,4/0	–		
			22.12.11 (Д+57)	48	> 95	6,2/0	0,5		
			23.12.11 (Д+58)	–	> 95	3,4/0	–		
			11.01.12 (Д+77)	28	> 95	2,2/0	0,18		
			7.02.12 (Д+104)	21	90–95	0,4/0	–		
			15.02.12 (Д+112)	70	90–95	0/0	3,4		
			19.03.12 (Д+145)	1093	60–70	7,2/3,0	36		
			26.03.12 (Д+152)	–	–	22,4/–	–		
			25.04.12 (Д+182)	2393	60–70	7,4/0	25,1		
			2.05.12 (Д+189)	3252	60–70	24,0/0	–		
			24.05.12 (Д+211)	733	80–90	4,4/0	–		
	14.06.12 (Д+232)	221	> 95	1,0/0	–				
	17.09.12 (Д+327)	67	> 95	0/0	0,5				
	12.12.12 (Д+413)	55	> 95	1,0/0	0,9				
	3.07.13 (Д+616)	–	> 95	0,2/0	–				
	11.12.13 (Д+777)	1966	> 97	8,0/0	15				
	15.01.14 (Д+902)	867	80–89	17,0/0	49				
	22.01.14 (Д-55)	–	90–97	–/–	–				
	19.02.14 (Д-27)	1139	–	–/–	–				
	26.02.14 (Д-20)	2025	–	9,0/0	–				
	14.04.14 (Д+27)	3	> 97	1,0/0	–				
	28.04.14 (Д+41)	65	> 97	0,4/0	–				
	12.05.14 (Д+55)	10	> 97	0,2/0	–				
	26.05.14 (Д+69)	4401	> 97	3,4/0	–				
	9.06.14 (Д+83)	529	70–79	11,2/15,0	–				
	17.07.14 (Д+121)	12	–	31,5/0	22				
	28.07.14 (Д+132)	118	> 97	8,0/0	5				
	11.08.14 (Д+146)	59	–	0,2/0	3				
	20.08.14 (Д+155)	–	> 97	0,2/0	–				
30.09.14 (Д+168)	10	> 97	1,2/0	9					
1.10.14 (Д+197)	110	> 97	1,4/0	12					
5.11.14 (Д+232)	2016	90–97	9,2/–	12					
30	13.10.12, н/р, н/мбл	6,8	5.07.12 (Д-100)	725		22,0/29,0	<i>AML1/ETO</i>	25.04.13*	194
			16.08.12 (Д-65)	–		–	27,8		
			19.09.12 (Д-24)	–		3,8/0	1,7		
			31.10.12 (Д+18)	–	–	1,4/0	12,6		
			12.11.12 (Д+30)	284	> 95	2,4/0	–		
			26.11.12 (Д+44)	1833	> 95	1,4/0	6,0		
			5.12.12 (Д+53)	2363	–	52,0/0	139		
			13.12.12 (Д+61)	3107	–	23,0/0	169		
			9.01.13 (Д+88)	19	–	4,8/0	180		
			16.01.13 (Д+95)	161	–	2,0/0	2		
			31.01.13 (Д+110)	–	–	1,2/0	2		
			1.03.13 (Д+139)	2649	70	28,6/3,0	40		
15.04.13 (Д+184)	–	–	–/11,0	423					
31	17.07.11, н/р, млб	3,5	20.05.13 (Д-58)	290		3,2/0	Уровень экспрессии <i>AML1/ETO</i> и <i>EV11</i> не определялся	27.01.15	559+
			5.08.13 (Д+19)	112	> 95	0,8/0	–		
			2.09.13 (Д+47)	122	> 95	2,8/0	–		
			16.09.13 (Д+61)	69	> 95	3,0/0	–		
			14.10.13 (Д+89)	118	> 97	1,8/0	–		

Пациент №	АллоТГСК		Дата анализа (день до/после ТГСК)	Уровень экспрессии гена <i>WT1</i>	До-норский химеризм	Содержание бластных клеток в костном мозге/крови	Специфические молекулярные маркеры	Дата последнего наблюдения или смерти	Время наблюдения от даты ТГСК, дни
	Дата, вид, режим	Количество клеток CD34+/кг массы							
			26.11.13 (Д+131)	147	> 97	3,2/0			
			18.12.13 (Д+154)	272	> 97	1,6/0			
			15.01.14 (Д+182)	33	> 97	1,2/0			
			24.03.14 (Д+250)	76	> 97	3,0/0			
32			20.11.13 (Д-14)	176		—/—	<i>EV11</i>	22.10.14	832+
	4.12.13, н/р, н/мбл	2,8	25.12.13 (Д+21)	—	> 95	—/—	53		
			9.01.14 (Д+36)	—	> 95	—/—	—		
			22.09.14 (Д+49)	—	> 95	5,8/0	4		
			29.01.14 (Д+56)	151	> 97	3,0/0	1		
			17.02.14 (Д+75)	71	> 97	1,8/0	6		
			27.02.14 (Д+85)	161	90–97	2,0/0	14		
			31.03.14 (Д+117)	1764	80–89	1,8/0	17		
			21.05.14 (Д+168)	4542	60–69	4,4/0	80		
			17.06.14 (Д+195)	—	—	21,0/—	88		
			22.10.14 (Д+352)	3025	10	2,0/0	—		
33			20.03.10 (Д-280)			49,0/—	Уровень	28.09.13	1616+
	15.12.10–17.12.10, гапло, н/мбл	2,3	17.01.11 (Д+31)	—	90–95	0/—	экспрессии <i>AML1/ETO</i> и <i>EV11</i> не определялся		
		4,1	9.02.11 (Д+62)	—	90–95	—/—			
			10.03.11 (Д+103)	—	< 5	—/12,0			
			20.04.11 (Д+133)	—	< 5	37,5/22,0			
			(Д+180)	864	—	—/—			
34			24.01.13 (Д-199)	—		63,4/—	Уровень	27.01.15	532+
			18.06.13 (Д-55)	—		54,6/1,0	экспрессии <i>AML1/ETO</i> и <i>EV11</i> не определялся		
			17.07.13 (Д-26)	—		49,0/—			
	13.08.13, гапло, н/мбл	10,8	16.04.14 (Д+246)	296	> 95	41,2/—			
			16.06.14 (Д+307)	—	> 97	1,6/—			
			26.06.14 (Д+317)	0	> 95	—/—			
			20.08.14 (Д+372)	378	99	—/—			

«—» — нет данных; гапло — гаплоидентичная ТГСК; мбл — миелоаблативный режим кондиционирования; н/мбл — немиелоаблативный режим кондиционирования; н/р — неродственная ТГСК; р — родственная ТГСК.

* Летальный исход.

Клиническое наблюдение 2

Больной № 19, 58 лет, ОМЛ, ФАБ-вариант М2, 1-й рецидив с транслокацией t(8;21) и высоким уровнем экспрессии генов *WT1* и *AML1/ETO*. Окончательная нормализация экспрессии этих молекулярных маркеров была достигнута после родственной ТГСК, проведенной с использованием немиелоаблативного режима, только на Д+227. Обращало на себя внимание то, что несмотря на высокий уровень экспрессии молекулярных маркеров, выраженность донорского химеризма все это время была в пределах 95–97 %, что указывало на его меньшую чувствительность в плане предсказания ПТР.

По нашим данным, корреляция уровня экспрессии гена *WT1* с таковыми *AML1/ETO* или *EV11* наиболее отчетливо прослеживается у больных № 28–30, выписки из историй болезни которых представлены ниже.

Клиническое наблюдение 3

Больной № 30, 30 лет, ОМЛ, трансформировавшийся из МДС, ФАБ-вариант М1, 1-я ремиссия. Клинические и лабораторные данные, касающиеся экспрессии генов *AML1/ETO* и *WT1*, были опубликованы ранее [31]. Как видно из данных табл. 1 и 2, источником CD34-позитивных клеток в этом наблюдении был костный мозг

от HLA-совместимого неродственного донора. Их количество составляло $6,8 \times 10^6$ /кг массы тела реципиента. Был выбран немиелоаблативный режим кондиционирования. Несмотря на наличие в трансплантате достаточного количества стволовых клеток, гиперэкспрессия выбранных для мониторинга генов стала обнаруживаться и прогрессивно нарастать задолго до снижения донорского химеризма (рис. 2). Число же бластных клеток в костном мозге стало нарастать и достигло 53 и 28 % соответственно. Больной умер от прогрессирования заболевания. Продолжительность жизни в этом наблюдении составила 194 дня.

Важная особенность данного наблюдения заключается в том, что диагностическая ценность экспрессии гена *WT1* в распознавании ПТР оказалась выше, чем данные об экспрессии специфического маркера *AML1/ETO*.

Клиническое наблюдение 4

Больная № 28, 26 лет, ОМЛ, ФАБ-вариант М1, лейкозные клетки имели сложный кариотип (рис. 3). Кроме гиперэкспрессии гена *WT1* (1049 копий/10⁴ копий гена *ABL*) в них активно экспрессировался ген *EV11* (23 копии/10² копий гена *ABL*), в то время как количество бластных клеток в костном мозге и крови достигало уровня 84 и 61 % соответственно. Было введено

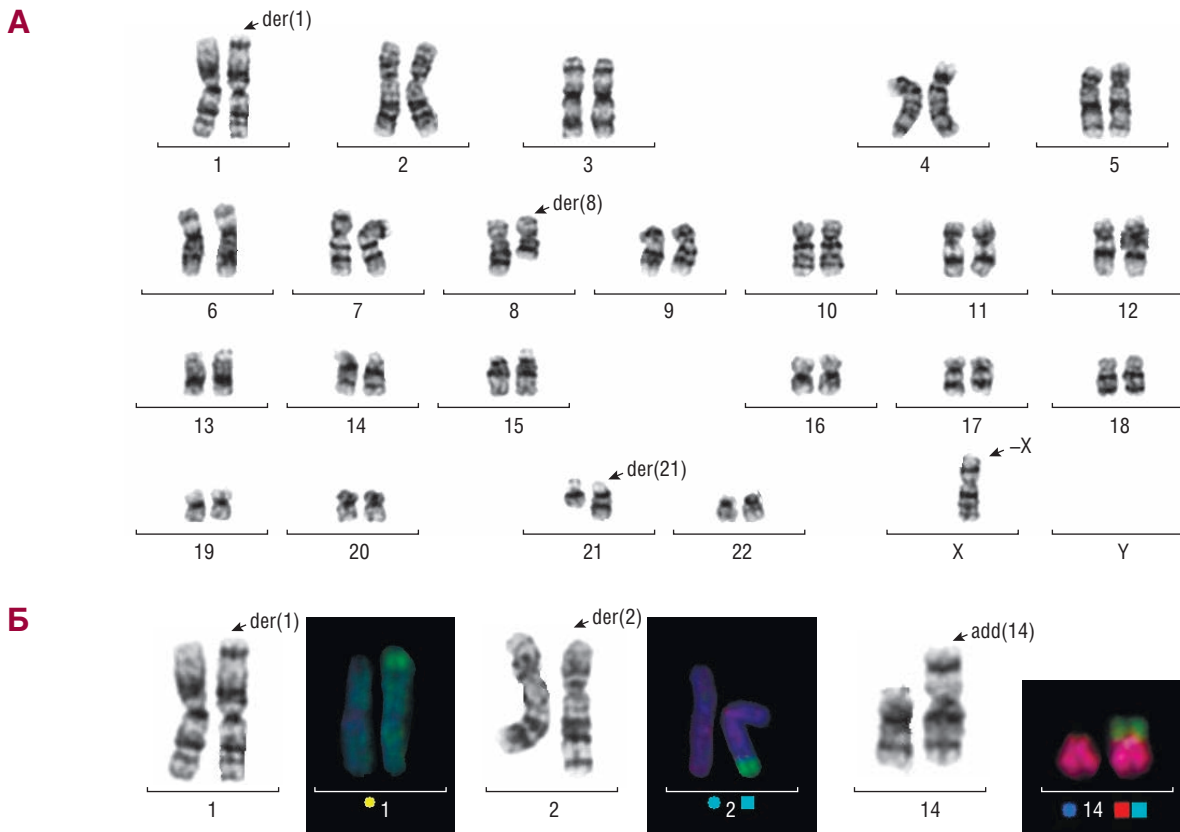


Рис. 1. Кариограмма (А) и частичные кариотипы (Б) из 3 клеток больной № 18, иллюстрирующие стандартную транслокацию t(8;21) (q22;q22) с дополнительной утратой одной из X-хромосом и переносом части длинного плеча хромосомы 17 на хромосомы 1, 2, 13 (не показано) и 14

Fig. 1. Karyogram (A) and partial karyotypes (B) from 3 cells of patient No. 18 illustrating a standard t(8;21)(q22;q22) translocation with further loss of one of X chromosomes and a part of long arm of chromosome 17 jumping to chromosomes 1, 2, 13 (not illustrated) and 14

2,65 × 10⁶/кг массы тела CD34-позитивных клеток от HLA-совместимого неродственного донора. Использовался миелоаблативный режим кондиционирования. После трансплантации уровень экспрессии генов *WT1* и *EVII* длительное время был ниже порогового значения, а на долю донорского химеризма приходилось 80–90 % клеток. Впервые повышение уровня экспрессии гена *WT1* было зафиксировано в Д+180 и Д+204 (рис. 4). В то же время достоверная диагностика рецидива лейкоза по морфологическим критериям, сопровождающаяся дальнейшим повышением уровня экспрессии гена *WT1*, стала возможна значительно позже. Обращает на себя внимание то, что у больной с развившимся ПТР применение системной химиотерапии, дополненное гаплоидентичной ТГСК, позволило достичь кратковременной ремиссии. Продолжительность жизни больной составила 559 дней. Наблюдение за больной продолжается.

Клиническое наблюдение 5

Больная № 29, 17 лет, ОМЛ, ФАБ-вариант М4, 2-й рецидив. В данном наблюдении вслед за успешным лечением первого ПТР с помощью инфузий донорских лимфоцитов и гипометилирующих агентов были зарегистрированы новые морфологические и молекулярные рецидивы. Как и в предыдущем наблюдении, их удалось временно купировать системной химиотерапией, дополненной выполнением гаплоидентичной родственной ТГСК. Далее, несмотря на постоянное сдерживание лейкозного процесса гипометилирующими агентами,



Рис. 2. Молекулярный мониторинг посттрансплантационного течения М1-варианта ОМЛ (по ФАБ-классификации) у больной № 30 с транслокацией t(8;21)(q22;q22). Молекулярные рецидивы заболевания обнаружены раньше увеличения содержания бластных клеток в костном мозге

Fig. 2. Molecular monitoring of post-transplantation course of the M1 type AML (according to the FAB classification) in patient No. 30 with a t(8;21)(q22;q22) translocation. Molecular relapses of the disease were detected earlier than the increased blast cell levels in the bone marrow

сиролимусом и повторными (в эскалирующих дозах) инфузиями донорских лимфоцитов, предотвратить очередной, третий по счету, ПТР не удалось (рис. 5).

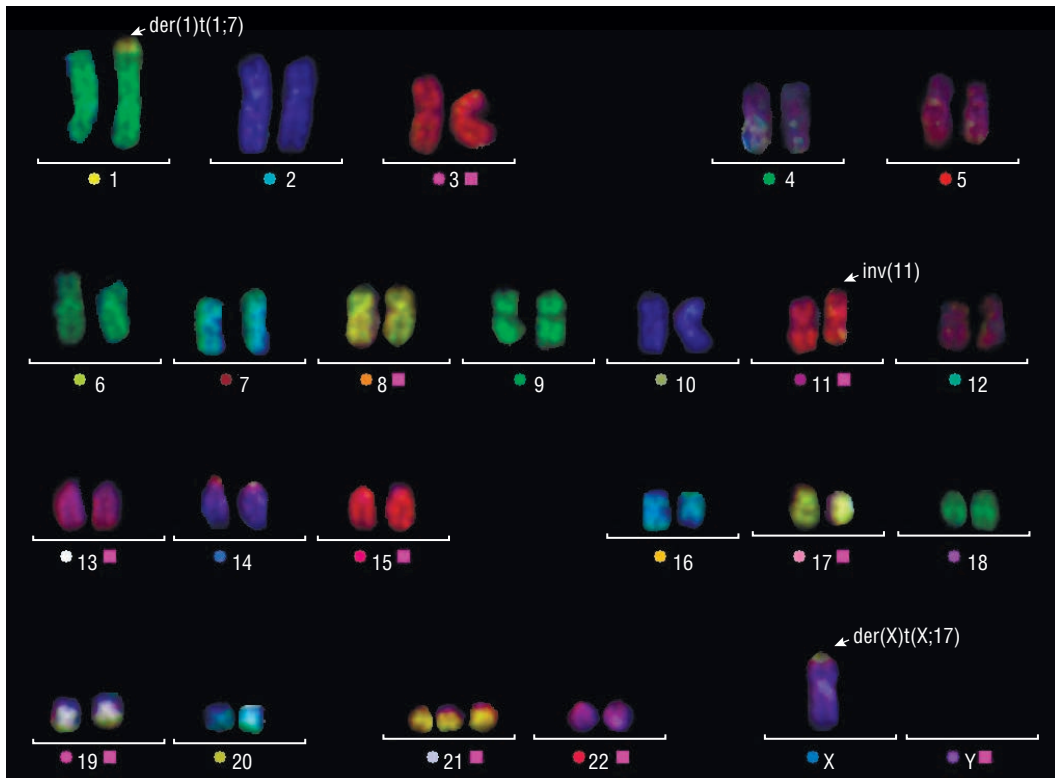


Рис. 3. Кариотип клетки костного мозга больной ОМЛ (№ 28), иллюстрирующий как структурные, так и числовые нарушения хромосом (> 3), что соответствует представлению о сложном кариотипе: 46, -X, der(X)t(X;17)(p22;q21), der(1)t(1;17)(p36;q2?3), inv(11)(p15q22), +21

Fig. 3. Karyotype of an AML patient's bone marrow cell (patient No. 28) demonstrating both structural and numerical chromosome aberrations (> 3) that corresponds to the conception of a complex karyotype: 46, -X, der(X)t(X;17)(p22;q21), der(1)t(1;17)(p36;q2?3), inv(11)(p15q22), +21



Рис. 4. Корреляция уровня экспрессии генов *WT1* и *EVI1* у больной № 28 со сложным кариотипом и поздним посттрансплантационным рецидивом ОМЛ. Повышение экспрессии гена *WT1* предшествовало нарастанию содержания бластных клеток в костном мозге. Этот маркер был более чувствительным, чем экспрессия специфического маркера *EVI1*

Fig. 4. Correlation of *WT1* and *EVI1* gene expression degrees in patient No. 28 with complex karyotype and delayed post-transplant AML relapse. Increased *WT1* gene expression preceded the growth of the blast cell count in the bone marrow. This marker was more sensitive, than expression of the specific marker *EVI1*

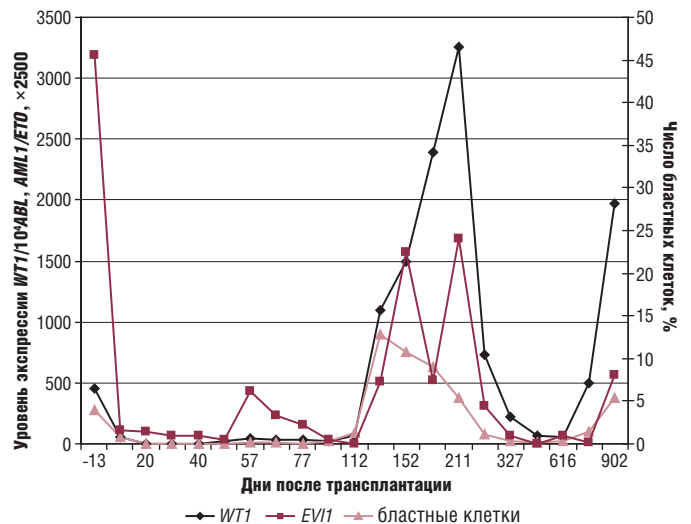


Рис. 5. Корреляция повышенного уровня экспрессии генов *WT1* и *EVI1* у больной ОМЛ М4-варианта (№ 29) с кариотипом 45,XX, inv(3)(3q21q26), -7 во время посттрансплантационных рецидивов после аллотГСК и гаплогТГСК

Fig. 5. Correlation of increased *WT1* and *EVI1* gene expression degree in a patient with M4 type AML (patient No. 29) with 45,XX, inv(3)(3q21q26), -7 karyotype during post-transplant relapses after alloSCT and haploSCT

Продолжительность периода наблюдения за больной составляет 1189+ дней.

Экспрессия молекулярных маркеров опережала нарастание содержания бластных клеток в крови и костном

мозге. Проводимая терапия инфузиями донорских лимфоцитов и гипометилирующими агентами на начальных этапах была эффективной, позже ее комбинировали как с системной химиотерапией, так и с гаплоидентичной ТГСК.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННЫХ РЕЦИДИВОВ

Как видно из данных, представленных в табл. 3, результаты предпринятого нами лечения зарегистрированных ПТР с использованием инфузий донорских лимфоцитов, гипометилирующих агентов, химиотерапии и гаплогенной ТГСК пока оказались малоутешительными. Действительно, стойкие клинико-гематологические ремиссии удалось достичь только у 3 пациентов, причем 2 из них (№ 21 и 22) умерли от реакции «трансплантат против хозяина» на 53-й и 101-й дни после ТГСК. В дополнение к этому в 2 наблюдениях (№ 20 и 29) было отмечено только некоторое улучшение лабораторных и клинических параметров. В то же время у 13 больных имело место дальнейшее прогрессирование заболевания с развитием ПТР.

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как известно, гиперэкспрессия гена *WT1* является хорошо зарекомендовавшим себя в онкогематологии неспецифическим маркером, который позволяет успешно прогнозировать рецидивы опухолевого процесса [5–7]. В равной мере это справедливо как в отношении больных, уже получавших химиотерапию [32], так и в отношении ПТР [8, 20, 21]. По нашим данным, уровень экспрессии гена *WT1* у больных ОМЛ варьирует в широких пределах. Он мало зависит от морфоцитохимического и цитогенетического вариантов лейкоза. В то же время высокий исходный уровень экспрессии гена *WT1* и неблагоприятный исход заболевания могут быть взаимосвязаны (наблюдение № 18). Из работы следует, что уровень экспрессии гена *WT1* отчетливо связан с уровнями экспрессии таких специфических молекулярных маркеров, как *AML1/ETO* и *EVII*. Это подтверждает правомерность использования данного молекулярного параметра даже при отсутствии у больных более специфических молекулярных маркеров [30]. Немаловажно и то, что параллельные измерения уровня донорского химеризма оказались менее стабильными, а по информативности значительно уступали молекулярному мониторингу с использованием как неспецифических (*WT1*), так и специфических (*AML1/ETO*, *EVII*) маркеров, что было продемонстрировано и другими исследователями [21].

Дополнительный анализ материала показал, что одним из важных факторов неудачи аллоТГСК может быть качество трансплантата, в частности количество в нем CD34-позитивных клеток. Этот вывод основан на том, что у 7 из 10 больных после аллоТГСК с низким ($< 3,2 \times 10^6/\text{кг}$ массы тела) числом CD34-позитивных клеток в трансплантате исход ТГСК был неудовлетворительным.

В целом представленные в работе данные о серийном количественном измерении уровня экспрессии гена *WT1* показали, что у половины больных имевшее место перед трансплантацией повышение уровня экспрессии гена *WT1* после аллоТГСК стойко нормализуется, что совпадает по времени с достижением и длительным сохранением клинико-гематологической ремиссии и полного донорского химеризма. В то же время у других больных картина качественно отличалась. У части из них после аллоТГСК нормализация экспрессии гена

Таблица 3. Терапия посттрансплантационных рецидивов заболевания

Пациент №	Дата аллоТГСК	Дата рецидива	Терапия при рецидиве	Результат лечения (время наблюдения от даты выполнения ТГСК, дни)
19	13.06.13	30.09.13	Азацитидин 2 цикла	Улучшение (595+)
21	8.08.12	4.10.12	Азацитидин 2 цикла	Клинико-гематологическая ремиссия, летальный исход (101)
22	24.04.14	30.06.14 9.10.14	Азацитидин, FLAG-Ida ИДЛ 2 раза	Ремиссия (280+)
23	15.12.11	13.02.12	Проводилась*	Прогрессирование (132)
24	27.03.12	6.06.12	FLAG, ИДЛ 2 раза	Прогрессирование и летальный исход (119)
25	19.06.14	18.08.14	FLAG	Прогрессирование (225+)
26	9.08.12 3.04.13	8.11.12 8.01.13 21.06.13	ИДЛ 1 раз AML-BFM-04 Децитабин, ИДЛ, химиотерапия (клофарабин, цитарабин)	Резистентность к химиотерапии, прогрессирование (414)
27	27.02.13	27.03.13	ИДЛ 2 раза	Прогрессирование и летальный исход (125)
28	17.07.13	13.01.14 9.06.14 3.10.14	ИДЛ 6 раз, FLAG, азацитидин 6 циклов <5+2>, ИДЛ 2 раза, интерферон- α 2a Проводилась*	Ремиссия Прогрессирование Стабилизация (559+)
29	26.10.11	19.03.12 11.12.13	Цитарабин, ИДЛ 1 раз Гаплогенная ТГСК	Ремиссия (902+) Новые рецидивы (1189+)
30	13.10.12	26.11.12	FLAG, ИДЛ 1 раз	Прогрессирование и летальный исход (194)
31	17.07.11	18.12.13	Не проводилась	Ремиссия (559+)
32	4.12.13	31.03.14	Азацитидин 4 цикла, ИДЛ 4 раза, FLAG 2 цикла	Стабилизация (832+)
33	15.12.10	10.03.11	Децитабин, ИДЛ 2 раза	Ремиссия (1616+)

ИДЛ — инфузия донорских лимфоцитов (клеток CD3+).

* Данных о виде противоопухолевой терапии нет.

WT1 долго не наступала, а у других имели место разного уровня экспрессионные «всплески», которые могли служить предвестниками развития ПТР. Как предотвращать и лечить такие рецидивы, пока неясно. По-видимому, терапия должна проводиться в условиях молекулярного мониторинга. В будущем исследования помимо больных ОМЛ следует также включать пациентов с МДС [12, 14], острыми лимфобластными лейкозами [15, 16] и неходжкинскими лимфомами [16, 17].

Молекулярный подход рассматривался в двух недавно опубликованных работах. В одной из них измерение уровня экспрессии гена *WT1* использовалось для обнаружения опухолевых клеток в крови, приготовленной для

аутоТГСК [33]. В другой работе минимальная остаточная болезнь наиболее успешно определялась методом точной флуориметрии и молекулярного измерения уровня экспрессии гена *WT1* [26].

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: Н.Н. Мамаев.

Сбор и обработка данных: А.В. Горбунова, Я.В. Гудожникова, В.А. Катерина, И.М. Бархатов, Т.Л. Гиндина, С.Н. Бондаренко.

Предоставление материалов исследования: И.М. Бархатов, Т.Л. Гиндина, Е.В. Бабенко, А.Л. Алянский, О.А. Слесарчук, Н.В. Станчева, С.Н. Бондаренко.

Анализ и интерпретация данных: Н.Н. Мамаев, Я.В. Гудожникова, Т.Л. Гиндина.

Подготовка рукописи: Н.Н. Мамаев, Я.В. Гудожникова, Т.Л. Гиндина, Е.В. Волчков.

Окончательное одобрение рукописи: Б.В. Афанасьев.

Административная поддержка: Б.В. Афанасьев.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Wertheim G.B., Bagg A. Minimal residual disease testing to predict relapse following transplant for AML and high-grade myelodysplastic syndromes. *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 2011; 11(4): 361–6.
2. Mardis E.R., Ding L., Dooling D.J. et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361: 1058–66.
3. Rocquain J., Carubbia N., Trouplin V. et al. Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *BMC Cancer.* 2010; 10: 401.
4. Cilloni D., Gottardi E., De Micheli D. et al. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia.* 2002; 16: 2115–21.
5. Cilloni D., Gottardi E., Messa F. et al. WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol.* 2004; 112: 79–84.
6. Cilloni D., Renneville A., Hermitte F. et al. Real-time quantitative PCR (RQ-PCR) detection of minimal residual disease (MRD) by optimized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia (AML): A European LeukemiaNet Study. *Blood.* 2007; 110: 542a.
7. Nomdedeu J.F., Hoyos M., Carricondo M. et al. Bone marrow WT1 levels at diagnosis, post-induction and post-intensification in adult de novo AML. *Leucemia.* 2013; 27: 2157–64.
8. Yoon J.H., Kim H.J., Shin S.H. et al. BAALC and WT1 expressions from diagnosis to hematopoietic stem cell transplantation: consecutive monitoring in adult patients with core-binding-factor-positive AML. *Eur. J. Haematol.* 2013; 91(2): 112–21.
9. Tamaki H., Ogawa H., Inoue K. et al. Increased expression of the Wilms tumor gene (WT1) at relapse in acute leukemia. *Blood.* 1996; 88: 4396–8.
10. Ogawa H., Tamaki H., Ikegami K. et al. The usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood.* 2003; 101: 1698–704.
11. Bader P., Niemeyer C., Weber G. et al. WT1 gene expression: useful marker for minimal residual disease in childhood myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukemia? *Eur. J. Haematol.* 2004; 73: 25–8.
12. Lange T., Hubmann M., Burkhard R. et al. Monitoring of WT1 expression in PB and CD34+ donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Leukemia.* 2011; 25: 498–505.
13. Ueda Y., Mizutani C., Nannya Y. et al. Clinical evaluation of WT1 mRNA expression levels in peripheral blood and bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk. Lymphoma.* 2013; 54(7): 1450–8.

14. Мамаев Н.Н., Горбунова А.В., Гиндина Т.Л. и др. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при миелодиспластических синдромах и клиническое значение гиперэкспрессии гена *WT1*. *Клиническая онкогематология.* 2014; 7(4): 551–63.

[Mamayev N.N., Gorbunova A.V., Gindina T.L. et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in myelodysplastic syndromes and clinical significance of WT1 gene overexpression. *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2014; 7(4): 551–63. (In Russ.)]

15. Heesch S., Goekbuget N., Stroux A. et al. Prognostic implications and expression of the Wilms tumor 1 (WT1) gene in adult T-lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2010; 95: 942–9.

16. Ujj Z., Buglyo G., Udvardy M. et al. WT1 overexpression affecting clinical outcome in non-Hodgkin lymphomas and adult acute lymphoblastic leukemia. *Pathol. Oncol. Res.* 2014; 20: 565–70.

17. Drakos E., Rassidakis G.Z., Tsioli F. et al. Differential expression of WT1 gene product in non-Hodgkin lymphomas. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2005; 13(2): 132–7.

18. Inoue K., Sugiyama H., Ogawa H. et al. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood.* 1994; 84: 3071–9.

19. Inoue K., Ogawa H., Yamagami T. et al. Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood.* 1996; 88: 2267–78.

20. Inoue K., Ogawa H., Sonoda Y. et al. Aberrant overexpression of the Wilms' tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood.* 1997; 88: 1405–12.

21. Candoni A., Toffoletti E., Gallina R. et al. Monitoring of minimal residual disease by quantitative WT1 gene expression following reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Clin. Transplant.* 2011; 25: 308–16.

22. Kwon M., Martinez-Laperche C., Infante M. et al. Evaluation of minimal residual disease by real-time quantitative PCR of Wilms' Tumor 1 expression in patients with acute myelogenous leukemia after allogeneic stem cell transplantation: Correlation with flow cytometry and chimerism. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2012; 18: 1235–42.

23. Polak J., Hajkova H., Haskovec C. et al. Quantitative monitoring of WT1 expression in peripheral blood before and after allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia — a useful tool for early detection of minimal residual disease. *Neoplasma.* 2013; 60(1): 74–82. doi: 10.4149/neo_2013_011.

24. Frairia C., Aydin S., Riera L. et al. WT1 expression in acute myeloid leukaemia: a useful marker for improving therapy response evaluation. *Blood.* 2013; 122(21): 2588 (abstract).

25. Alonso-Dominquez J.M., Tenorio M., Velasco D. et al. Correlation of WT1 expression with the burden of total and residual leukemic blasts in bone marrow samples of acute myeloid leukemia patients. *Cancer Genet.* 2012; 205(0): 190–1 (Letter to the Editor).

26. Zhao X.S., Yan C.H., Liu D.H. et al. Combined use of WT1 and flow cytometry monitoring can promote sensitivity of predicting relapse after allogeneic HSCT without affecting specificity. *Ann. Hematol.* 2013; 92(8): 1111–9.

27. Yoon J.-H., Kim H.-J., Kim J.-W. et al. Identification of molecular and cytogenetic risk factors for unfavorable core-binding factor-positive adult AML with post remission treatment outcome analysis including transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2014; doi:10.1038/bmt.2014.180.

28. Hosen N., Shirakata T., Nishida S. et al. The Wilms' tumor gene WT1-GFP knock-in mouse reveals the dynamic regulation of WT1 expression in normal and leukemic hematopoiesis. *Leukemia.* 2007; 21: 1783–91.

29. Huff V. Wilms' tumours about tumour suppressor genes, an oncogene and chameleon gene. *Nat. Rev. Cancer.* 2011; 11: 11–21.

30. Zhang Q., Zhang Q., Li Q. et al. Monitoring of WT1 and its target gene *IRF8* expression in acute myeloid leukemia and their significance. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2014 (Letter to the Editor). doi: 10.1111/ijlh.12309.

31. Мамаев Н.Н., Горбунова А.В., Гиндина Т.Л. и др. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при остром миелоидном лейкозе с транслокацией t(8;21)(q22;q22). *Клиническая онкогематология.* 2013; 6(4): 439–44.

[Mamayev N.N., Gorbunova A.V., Gindina T.L. et al. Hematopoietic stem cell transplantation in AML patients with t(8;21)(q22;q22) translocation. *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2013; 6(4): 439–50. (In Russ.)]

32. Мамаев Н.Н., Горбунова А.В., Гиндина Т.Л. и др. Стойкое восстановление острого миелоидного лейкоза у больной с посттрансплантационным рецидивом острого миелоидного лейкоза с inv(3)(q21q26), моносомией 7 и экспрессией онкогена *EV11* после трансфузий донорских лимфоцитов и использования гипометилирующих агентов. *Клиническая онкогематология.* 2014; 7(1): 71–5.

[Mamayev N.N., Gorbunova A.V., Gindina T.L. et al. Stable donor hematopoiesis recovery after post-transplantation relapse of acute myeloid leukemia in patient with inv(3)(q21q26), monosomy 7 and *EV11* oncogene overexpression after donor lymphocyte infusions and administration of hypomethylating agents. *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2014; 7(1): 71–5. (In Russ.)]

33. Messina C., Candoni A., Carraba M.G. et al. Wilms' tumor gene 1 transcript levels in leukopheresis on peripheral blood hematopoietic cells predict relapse risk in patients autografted for acute myeloid leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2014; 20(10): 1–6.