

Materials and methods

Two white New Zealand's rabbits underwent heterotopic heart transplantation, after which a daily measurement of myeloperoxidase in the blood plasma performed. One rabbit received cyclosporine A at a dosage of 10 mg/kg per day and another rabbit was immunosuppressive. The histological examination of transplanted hearts was performed after the rabbits were deceased.

Results

Data on the dynamics of leukocyte myeloperoxidase were obtained after cardiac transplantation and histological changes

in the transplanted heart. There are calcification and dystrophy in transplanted heart found in a rabbit without immunosuppression. No signs of graft calcinosis or dystrophy were observed in the cyclosporine-treated animal.

Keywords

Heterotopic heart transplantation, myeloperoxidase, markers of the graft rejection.

Гистологические и плазменные изменения после гетеротопической трансплантации сердца

Никита В. Грудинин¹, Вадим Е. Карев², Николай С. Буненков³, Владимир В. Комок³, Валерия А. Костевич⁴, Николай П. Горбунов⁴, Алексей В. Соколов⁴, Андрей А. Карпов³, Кирилл В. Лепик³, Александр Н. Швецов³, Юрий А. Серов³, Олег В. Галибин³, Александр С. Немков³, Геннадий Г. Хубулава³

¹ НМИЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В. И. Шумакова, Москва, Россия

² ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБУ РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И. П. Павлова

⁴ ФГБНУ институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Введение

Одним из эффективных методов лечения тяжелой сердечной недостаточности является трансплантация сердца. Тем не менее, не решенной проблемой является отторжение трансплантата. Актуальным является изучение гистологических и молекулярных иммунных механизмов отторжения трансплантата.

Цель

Цель работы состояла в оценке гистологических изменений трансплантата после гетеротопической трансплантации сердца, а также изменения в плазме крови реципиента.

Материалы и методы

Двум белым новозеландским кроликам выполнена гетеротопическая трансплантация сердца в брюшную полость, после чего, ежедневно выполнялось измерение

миелопероксидазы в плазме крови. Один кролик получал циклоспорин А в дозировке 10 мг/кг в сутки, другой кролик был без иммуносупрессивной терапии. После гибели кроликов выполнено гистологическое исследование пересаженных сердец.

Результаты

Получены данные о динамике миелопероксидазы лейкоцитов после трансплантации сердца и гистологических изменениях в виде дистрофии и кальциноза миокарда в пересаженном сердце у кролика, не получавшего иммуносупрессию. В трансплантате кролика, получавшего циклоспорин А, признаков кальциноза или дистрофии не наблюдалось.

Ключевые слова

Гетеротопическая трансплантация сердца, миелопероксидаза, маркеры отторжения трансплантата.

The prognostic value of the *WT1* gene expression on relapse and survival AML patients after allogeneic stem cell transplantation

Yana V. Gudozhnikova, Nikolay N. Mamaev, Ildar M. Barkhatov, Alena I. Shakirova, Valeria A. Katerina, Sergey N. Bondarenko, Tatiana L. Gindina, Valentina M. Kravtsova, Ludmila S. Zubarovskaya, Boris V. Afanasyev

R. M. Gorbacheva Memorial Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, 1st Saint Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Contact: Dr. Yana V. Gudozhnikova

E-mail: y.gudozhnikova@mail.ru

Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is now considered the best treatment of AML with

poor prognosis, which is, however, often followed by post-transplant relapses (PTR). Among PTR, molecular and cytological variants (mPTR and cPTR, respectively) are recognized. The *WT1* gene is known to be an independent

prognostic indicator of the mass of blast cells producing it. The serial measurement of *WT1* expression levels provides a real possibility for early diagnosis of mPTR and an evaluation of the overall and event-free survival (OS and EFS, respectively) and the cumulative frequency of relapse (CIR) in patients with AML treated with allo-HSCT.

Patients and methods

The study included 88 AML patients aged 2 to 68 (median, 30 y.o.) who underwent allo-HSCT at our University between 2011 and 2017. *WT1* gene expression levels were serially measured by real-time quantitative PCR, and marrow blast counts were performed in marrow samples at the standard control time points: before transplantation (D0) and on days D+30, D+60 and D+100 after transplantation. The *WT1* threshold value was selected, as based on the measurement of expression levels of *WT1* gene in bone marrow aspirates of healthy donors and determined as 250 *WT1* copies/ 10^4 copies of *ABL* gene. At all the time points, groups of patients with elevated and normalized levels of *WT1* gene expression (> 250 copies and < 250 copies, respectively) were formed, which allowed for calculating the difference in the 2-year OS, EFS and CIR. Since the increase in the expression of the *WT1* gene reflecting the content of the blasts secreting this gene can precede the morphologically identified cPTR, we measured this time interval for all the examined AML patients taking in consideration the posttransplantation therapy.

Results

The levels of *WT1* gene expression at allo-HSCT ranged from 0 to 56884 *WT1*/ 10^4 *ABL* copies (median – 253). According to the log-rank criteria, the difference in the 2-year OS, EFS and CIR between the groups of patients with elevated and normalized levels of *WT1* gene expression before allo-HSCT was as follows: 79.5%, 69.8%, 28.2% vs. 31.8%, 22.7% and 58.9%, at $p < 0.001$, $p < 0.001$, and $p = 0.0019$, respectively. On D+30, we found no difference in the 2-year OS, EFS and CIR between the groups of patients with elevated and normalized levels of *WT1* gene expression. Significant differences in the 2-year OS and CIR in the two groups were found on D+60 (66.2% and 42.3% vs. 35.7% and 61.5% at $p = 0.012$ and $p = 0.01$, respectively), while there was still no significant difference in the EFS (52.3% vs. 38.5%, $p = 0.084$). The greatest differences in the 2-year OS, EFS and CIR between the groups of patients with elevated and normalized levels of *WT1* gene expression occurred at the control time point D+100 (28.6%, 19% and 77.8% vs. 75.4%, 63.2% and 32.7% at $p < 0.001$, $p < 0.001$, and $p < 0.001$, respectively) (Fig.1). On the basis of proportional Cox risks, the independent positive effect on OS and EFS was preserved only for the normalized level of the *WT1* gene expression ($p = 0.011$ and $p = 0.041$) at the time point D+100 after the allo-HSCT and in the presence of chronic GVHD ($p = 0.038$ and $p = 0.03$). In this case, the ratio of the risk of relapse (125) was maximal also on D+100. Concerning mPTR and cPTR, they were documented in 55/88 (62.5%) and 33/88 (37.5%) patients, respectively. In 33.3% of patients (11/33), mPTR and cPTR coincided in time, while in 22 cases cPTR occurred 13-321 (median – 35) days later than mPTR. According to the data obtained, this delay of cPTR from mPTR can be partially ascribed to the

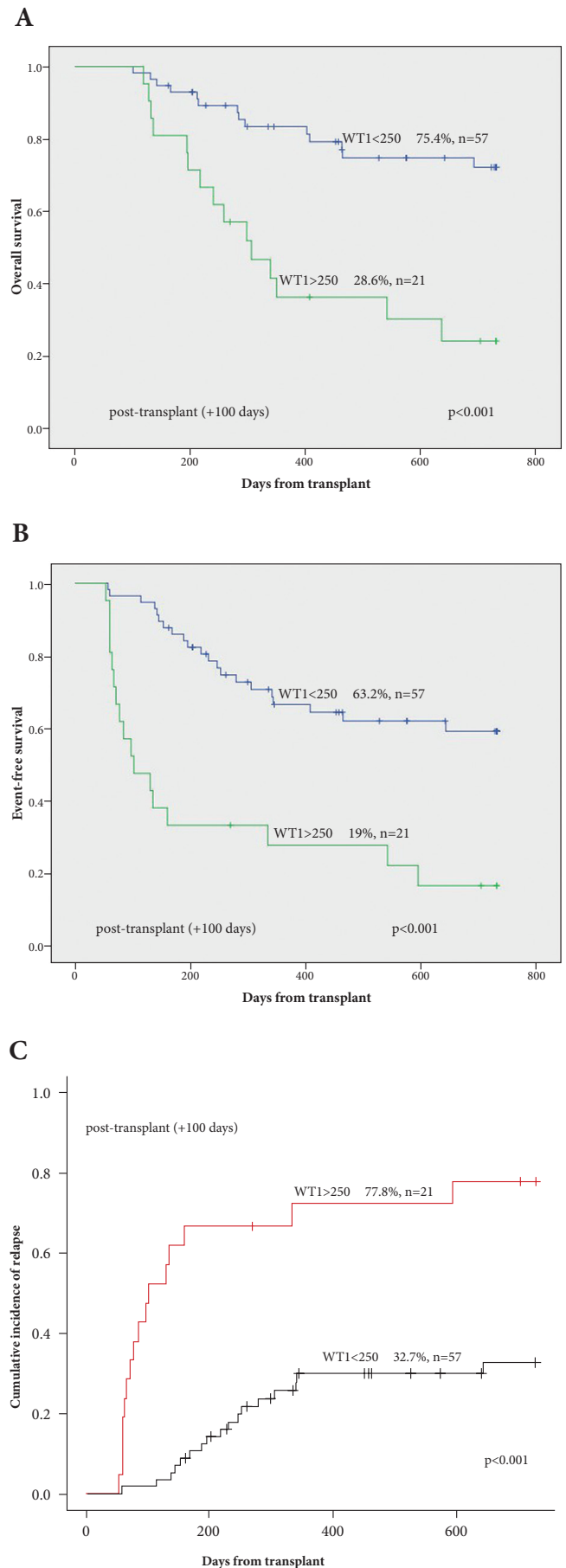


Figure 1. 2-year OS (A), EFS (B) and CIR dynamics (C) in AML patients with elevated vs normalized levels of *WT1* gene expression on D+100 after allo-HSCT

therapy performed at the clinic, in particular, donor lymphocyte infusions, and to presence of chronic GVHD in patients, thus being in good agreement with other research data [Pozzi et al, 2013].

Conclusion

Elevated and normalized levels of *WT1* gene expression are convenient and clinically useful markers of molecularly controlled mPTR and remission of AML. The optimal point for measuring the level of *WT1* gene expression in PTR diagnostics is D+100, followed by D0, D+60 and D+30, as the signif-

icance decreases. According to our data, the duration of OS and EFS is also positively affected by the presence of chronic GVHD in AML patients after allo-HSCT, which explains the tendency to use immunotherapy to treat mPTR diagnosed by serial measurements of the *WT1* gene expression levels [Di Grazia et al, 2016].

Keywords

Allogeneic stem cell transplantation, acute myeloid leukemia, *WT1*, relapse, molecular monitoring.

Значение экспрессии гена *WT1* для прогноза рецидивов и выживаемости после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов с острым миелоидным лейкозом

Яна В. Гудожникова, Николай Н. Мамаев, Ильдар М. Бархатов, Алена И. Шакирова, Валерия А. Катерина, Сергей Н. Бондаренко, Татьяна Л. Гиндина, Валентина М. Кравцова, Людмила С. Зубаровская, Борис В. Афанасьев

Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Введение

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) в настоящее время считается лучшим методом лечения ОМЛ с плохим прогнозом, который часто сопровождается посттрансплантационными рецидивами (ПТР). Среди ПТР могут быть молекулярные и цитологические варианты (мПТР и цПТР соответственно). Известно, что уровень экспрессии гена *WT1* является хорошим индикатором массы продуцирующих его бластных элементов. С помощью этого теста имеется возможность ранней диагностики мПТР и оценка общей и бессобытийной выживаемости (ОВ и БСВ соответственно) и кумулятивной частоты рецидивов (КЧР) больных ОМЛ, леченных с использованием алло-ТГСК.

Пациенты и методы

Исследование включало 88 пациентов с ОМЛ в возрасте от 2 до 68 лет (медиана – 30 лет), которым была выполнена алло-ТГСК в нашем Центре в период с 2011 по 2017 годы. Уровни экспрессии гена *WT1* измеряли серийно количественной ПЦР в реальном времени, а содержание бластов в тех же аспиратах костного мозга определяли в стандартно выбранных контрольных временных точках: перед трансплантацией (D0) и в дни D+30, D+60 и D+100 после ее выполнения. Пороговый уровень экспрессии гена *WT1* был определен на основании измерения уровня экспрессии гена *WT1* в аспиратах костного мозга здоровых доноров и равнялся 250 копиям *WT1*/10⁴ копий гена *ABL*. Во всех временных точках были сформированы группы больных с повышенным и нормализованным уровнями экспрессии гена *WT1* (>250 копий <250 копий соответственно) и рассчитана разница в 2-летней ОВ, БСВ и КЧР. Поскольку повышение уровня экспрессии

гена *WT1*, отражающее содержание секретирующих этот ген бластов, может опережать по времени определяемые морфологом цПТР, мы измерили этот временный интервал у всех обследованных больных ОМЛ и сопоставили его с проведенной посттрансплантационной терапией.

Результаты

Уровни экспрессии гена *WT1* перед режимом кондиционирования варьировали от 0 до 56884 копий *WT1*/10⁴ копий гена *ABL* (медиана – 253 копии). По данным критериям лог-ранга, существенная разница в 2-летней ОВ, БСВ и КЧР между группами больных с повышенным и нормализованным уровнями экспрессии гена *WT1* перед алло-ТГСК выглядела следующим образом: 79,5%, 69,8% и 28,2% против 31,8%, 22,7% и 58,9%, при $p < 0,001$, $p < 0,001$ и $p = 0,0019$ соответственно. Различий в 2-летней ОВ, БСВ и КЧР между группами больных с повышенным и нормализованным уровнями экспрессии гена *WT1* на день D+30 после выполнения алло-ТГСК не было. Достоверные различия в 2-летней ОВ и КЧР наблюдались между этими группами на день D+60 после выполнения алло-ТГСК (66,2% и 42,3% против 35,7% и 61,5% при $p = 0,012$ и $p = 0,01$ соответственно), в то время как достоверные различия в БСВ отсутствовали (52,3% против 38,5%, $p = 0,084$). Наибольшие различия в 2-летней ОВ, БСВ и КЧР между группами больных с повышенным и нормализованным уровнями экспрессии гена *WT1* имели место в контрольной временной точке D+100 после алло-ТГСК (28,6%, 19% и 77,8% против 75,4%, 63,2% и 32,7% при $p < 0,001$, $p < 0,001$ и $p < 0,001$ соответственно) (Рис.1).

На основе пропорциональных рисков Кокса, независимое позитивное влияние на ОВ и БСВ сохранилось только для нормализованного во временной точке D+100 после выполнения алло-ТГСК уровня экспрессии гена

WT1 ($p=0,011$ и $p=0,041$) и наличия у больных хрРТПХ ($p=0,038$ и $p=0,03$). При этом отношение риска рецидива (125) было максимальным также на день Д+100. По нашим данным, мПТР и цПТР были зарегистрированы у 55/88 (62,5%) и 33/88 (37,5%) пациентов соответственно. У 33,3% пациентов (11/33) мПТР и цПТР по времени появления совпадали, в то время как в 22 наблюдениях цПТР отставали от мПТР на 13-321 день (медиана – 35). Задержка цПТР от мПТР частично может быть объяснено проводимой в клинике терапией, в частности, инфузиями донорских лимфоцитов и наличием у больных хронической РТПХ, что хорошо согласуется с данными литературы [Pozzi et al, 2013].

Заключение

Уровень повышенной и нормализованной экспрессии гена *WT1* является удобным и полезным для клиники маркером молекулярно контролируемых ПТР и ремис-

сий ОМЛ. Оптимальной временной точкой для измерения уровня экспрессии гена *WT1* в диагностике ПТР является Д+100, за которой, по мере снижения значимости, следуют Д0, Д+60 и Д+30. По нашим данным на удлинение продолжительности ОВ и БСВ сказывается также наличие у больных ОМЛ признаков хрРТПХ, что объясняется наметившуюся в клинике тенденцию лечить иммунотерапией диагностированные при серийном измерении уровни экспрессии гена *WT1* мПТР [Di Grazia et al, 2016].

Ключевые слова

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, острый миелоидный лейкоз, *WT1*, рецидив, молекулярный мониторинг.

Experience with hypomethylating drug application in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Marina N. Horobrykh, Natalia V. Minaeva, Natalia A. Zorina, Ekaterina N. Zotina, Svetlana V. Samarina, Elena L. Nazarova
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

Contact: Dr. Marina N. Horobrykh
E-mail: khmn-nii@mail.ru

Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is an effective treatment method in patients with high-risk acute myeloid leukemia (AML). Nevertheless, disease relapse develops in 40-70% of patients during the first posttransplant year, and achievement of repeated remissions is possible only in 15-30% of patients. Hypomethylating, or epigenetic therapy (HM) appears to be a promising approach to these patients. The mechanism of HM drug action includes their ability to increase the levels of regulatory T-cells (Tregs, CD4+CD25+FOXP3+), which play a key role in the development of immunological tolerance in the post-transplant period, reducing the degree of development and severity of “graft-versus-host disease” (GVHD). In addition, the stimulating effect of these drugs on the pool of cytotoxic CD8+ T-lymphocytes provides implementation of a tumor-specific response in the graft-versus-leukemia (GVL) effect.

Aim

Objective of this study was to evaluate the results of the azacitidine application after allo-HSCT in patients with AML.

Patients and methods

Twenty patients with AML were transplanted between 2015 and 2018 at the Federal State Institute of Science “Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency of Russia” including 18 adult patients (14 women and 4 men) and 2 children.

Myeloablative conditioning was used in 5 (25%) cases. In 15 (75%) patients, the reduced intensity regimen was applied. Related allo-HSCT was performed in 15 (75%) patients, 4 of them were transplanted from HLA-haploidentical donors. Unrelated allo-HSCT was carried out from fully matched donors in 5 cases. Out of 20 patients, 9 (45%) patients were alive at the time of evaluation. Eleven (55%) patients died at different times after alloHSCT due to severe infectious complications, severe acute GVHD, thrombotic microangiopathy, early relapse of the disease. Preventive azacitidine courses were given to 7 patients with high-risk AML. Of these, 6 women and 1 man, with a median age of 36.7 years (range: 20-50 years). Azacitidine therapy was started after hematopoietic recovery on the average at day +85 (range: 40-121 days) in the absence of severe infectious and other complications. The drug was administered according to the scheme: 35 mg/m² subcutaneously for 5-7 days, every 28 days, with a median of 8 courses. In 3 cases, azacitidine was combined with donor lymphocyte infusions (DLI).

Results

All the patients who received azacitidine at the time of the study are alive. Six of them have a disease remission. Prior to the azacitidine administration, 2 patients had complete donor hematopoiesis, in 1 complete donor chimerism was achieved in 2 months of therapy, in 4 there was a mixed donor chimerism. In 1 of them, a late relapse occurred after 3 courses of azacitidine, and now he receives antirelapse chemotherapy (ChT).