

Fecal microbiota transplantation in the patients after allogenic bone marrow transplantation with acute graft-versus-host disease and severe gastrointestinal damage

Oleg S. Syuskin, Oleg V. Goloshchapov, Dar'ya V. Churakina, Maksim A. Kucher, Ruslana V. Klementeva, Sergei V. Sidorenko, Vladimir V. Gostev, Vadim E. Karev, Mariya A. Suvorova, Irina V. Shlyk, Alexei B. Chukhlov, Ludmila S. Zubarovskaya, Olga V. Pirogova, Olesya V. Paina, Marina O. Popova, Boris V. Afanasyev

Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

Contacts: Dr. Oleg S. Syuskin

E-mail: solegs84@mail.ru

Introduction

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is often accompanied by severe immune and infectious complications refractory to standard immunosuppressive and antibacterial therapy. This is especially true for hard-to-sanitize loci of infection, such as the gastrointestinal tract, which is one of the main target organs in acute graft-versus-host disease (GVHD). Fecal microbiota transplantation (FMT), which has an immunomodulatory effect and is aimed for eradication of antibiotic-resistant pathogenic microbiota, in this case can be considered as a variant of «rescue therapy». Analysis of efficacy and safety of applying FMT in treatment immunocompromising patients in critical condition caused by gastrointestinal GVHD after allo-HSCT was the aim of our work. It may help to optimize therapy in these patients. The aim of our pilot study was to assess efficiency FMT efficiency.

Materials and methods

Two clinical procedures of TFM were performed for the treatment of acute GVHD with intestinal lesions, confirmed by morphological and histological studies, in patients in critical condition, treated at the R. Gorbacheva Memorial Research Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, i.e., a male recipient 45 years old (patient K.), and a girl 3 years 8 months (patient M.). In both cases, a combination of sepsis, multi-organ dysfunction syndrome and acute grade IV GVHD, was the prevalent syndrome determining the overall severity of the condition which manifested by high-volume secretory diarrhea and severe recurrent gastrointestinal bleeding.

Quantitative changes in the bacterial composition of the fecal microbiota (FM) were evaluated by real-time polymerase chain reaction (PCR). Culturing and isolation of bacteria from biological samples and evaluation of their antibiotic susceptibility was performed using standard disc diffusion methods. The genes encoding carbapenemases of groups KPC, OXA-48, VIM, IMP, NDM, were detected by PCR in DNA separated from clinical isolates. The effectiveness of the method was evaluated by the clinical state of patients, quantitative and qualitative changes in the bacterial composition of FM.

Results

Clinical condition of the patients after TFM has, generally, shown a similar positive dynamics. In patient K., a reduction in stool volume to 1000 mL/day was recorded at D+14.

Termination of intestinal bleeding was observed on D+29. Semi-solid stool was first marked on D+119. The patient was discharged from ICU on D+92; he has left the hospital in satisfactory condition on D+192. Intestinal bleeding in patient M., was stopped at D+14. Volume of the stool was reduced to 500 ml/day on D+25. The well-formed stool was first marked on D+32. The patient was transferred from ICU on D+36, and has left clinic in satisfactory condition on D+82.

In both clinical cases, there was also a similar dynamics of FM. In patient K., the total bacterial mass of FM increased considerably (from $4 \times 10^7/g$ to $6 \times 10^{12}/g$), due to *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *B. Fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *F. Prausnitzii*. Together with these changes, there was a decrease in numbers of *Citrobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, *K. Pneumoniae*. Total bacterial mass in patient M. has not changed considerably ($5 \times 10^{11}/g$ initially, and $2 \times 10^{12}/g$ after FMT). However, an increase in *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *F. prausnitzii*, *B. Fragilis* was noted over the period from D+8 to D+30. Also, a decrease in *Citrobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, *K. pneumoniae*, *Clostridium difficile* was found by D+30. After FMT, in both patients an increased proportion of anaerobic bacteria of the genus *Bacteroides spp.*, *Fecalibacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, reduction of representatives of the *Enterobacteriaceae* family (*Citrobacter spp.*, *K. pneumoniae*) and *Enterococcus spp.* Moreover, the multidrug-resistant *Pseudomonas spp.* (KPC-type carbapenemase gene positive) was not no longer detected after FMT in bronchoalveolar lavage from patient K. Similarly, it caused elimination of *K. pneumoniae* with carbapenemase NDM- and OXA-48 types expression, being replaced by the carbapenem-sensitive isolate.

Conclusion

FMT can be considered a method of «rescue therapy» in combination treatment of children and adults in critical condition with acute intestinal GVHD combined with sepsis. FMT may increase clinical efficacy of antibacterial drugs by replacing polyresistant strains of *K. pneumoniae* and *Pseudomonas spp.* to bacterial strains which did not produce NDM-metalloproteinase, as well as OXA-48 and KPC serine carbapenemases.

Keywords

Fecal microbiota transplantation, GVHD, sepsis, decolonization, carbapenemases, metalloproteinase, NDM, OXA-48, KPC, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas spp.*

Трансплантация фекальной микробиоты у пациентов после аллогенной трансплантации костного мозга при острой реакции «трансплантат против хозяина» с поражением кишечника

Олег С. Сюськин, Олег В. Голощанов, Дарья В. Чуракина, Максим А. Кучер, Руслана В. Клементьева, Сергей В. Сидоренко, Владимир В. Гостев, Вадим Е. Карев, Мария А. Суворова, Ирина В. Шлык, Алексей Б. Чухловин, Людмила С. Зубаровская, Ольга В. Пирогова, Олеся В. Паина, Марина О. Попова, Борис В. Афанасьев

НИИ 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), применяемая при лечении онкогематологических заболеваний, часто сопровождается жизнеугрожающими иммунными и инфекционными осложнениями, рефрактерными к стандартной иммуносупрессивной и антибактериальной терапии. Особенно это касается трудно санируемых очагов инфекции, таких как желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), являющийся, наряду с кожей и печенью, одним из основных органов-мишеней при острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ), которая обладает иммуномодулирующим эффектом и направлена на эрадикацию антибиотикорезистентной патогенной микробиоты, в этом случае может рассматриваться как вариант «терапии спасения».

Целью нашей работы был анализ эффективности и безопасности, а также оценка перспективности применения метода ТФМ в комплексном лечении иммунокомпрометированных пациентов в критическом состоянии, явившемся следствием РТПХ ЖКТ после алло-ТГСК, что может в дальнейшем помочь в оптимизации терапии данной категории пациентов.

Материалы и методы

Два клинических случая ТФМ, проведенной с целью терапии острой РТПХ с поражением кишечника, подтвержденной морфологическими и гистологическими исследованиями, у пациентов в критическом состоянии, проходивших лечение на базе НИИ ДОГиТ им. Р. М. Горбачевой – мужчины 45 лет (К.) и девочки 3 лет 8 месяцев (М.). В обоих случаях ведущим синдромом, определяющим общую тяжесть состояния, была комбинация сепсиса, синдрома мультиорганной дисфункции и острой РТПХ кишечника IV степени, проявлявшейся секреторной диареей большого объема и тяжелым рецидивирующим желудочно-кишечным кровотечением.

Производилась оценка количественного изменения бактериального состава фекальной микробиоты (ФМ) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР). Культивирование и выделение бактерий из биологических образцов и оценку их антибиотикочувствительности осуществляли с помощью стандартных дискодиффузных методов. Гены, кодирующие карбапенемазы групп КРС, ОХА-48, VIM, IMP, NDM, детектировали методом ПЦР в ДНК, выделенной из клинических изолятов.

Эффективность метода ТФМ оценивали по клиническому состоянию пациентов, количественному и качественному изменению бактериального состава ФМ.

Результаты

Клиническое состояние пациентов после ТФМ имело, в целом, схожую динамику. У пациента К. уменьшение объема стула до 1000 мл/сут. зафиксировано на Д+14. Прекращение кишечного кровотечения – Д+29. Полуформленный стул был впервые отмечен на Д+119. Перевод из ОРИТ – на Д+92; выписан из клиники в удовлетворительном состоянии на Д+192. У пациентки М. прекращение кишечного кровотечения зафиксировано на Д+14. Уменьшение объема стула до 500 мл/сут. – Д+25. Оформленный стул был впервые отмечен на Д+32. Перевод из ОРИТ – Д+36; выписана из клиники в удовлетворительном состоянии на Д+82.

В обоих клинических случаях также отмечена сходная динамика изменения ФМ. У пациента К. общая бактериальная масса ФМ значительно увеличилась (с $4 \cdot 10^7/\text{г}$ до $6 \cdot 10^{12}/\text{г}$) за счет *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *B. fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *F. prausnitzii*. Наряду с этими изменениями, отмечено снижение *Citrobacter* spp., *Enterococcus* spp., *K. pneumoniae*. У пациентки М. общая бактериальная масса ФМ значительно не изменилась (до ТФМ $5 \cdot 10^{11}/\text{г}$, после – $2 \cdot 10^{12}/\text{г}$). Однако, в период с Д+8 до Д+30 увеличилось количество *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *F. prausnitzii*, *B. fragilis*. Также к Д+30 отмечено снижение *Citrobacter* spp., *Enterococcus* spp., *K. pneumoniae*, *Clostridium difficile*. После ТФМ у обоих пациентов следует отметить повышение доли анаэробных бактерий рода *Bacteroides* spp., *Fecalibacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., снижение представителей семейства энтеробактерий (*Citrobacter* spp., *K. pneumoniae*) и *Enterococcus* spp. Дополнительно у пациента К. после ТФМ в бронхоальвеолярном лаваже перестала определяться полирезистентная *Pseudomonas* spp., положительная по гену карбапенемазы КРС-типа, а также *K. pneumoniae*, экспрессировавшая карбапенемазы NDM- и ОХА-48 типов, однако появился ее изолят, чувствительный к карбапенемам.

Выводы

ТФМ может рассматриваться как метод «терапии спасения» в составе комбинированной терапии у детей и взрослых в критическом состоянии с острой РТПХ кишечника в сочетании с сепсисом. ТФМ может повышать клиническую эффективность антибактериальных пре-

паратив за счет замещения полирезистентных штаммов *K. pneumoniae* и *Pseudomonas spp.* на штаммы, не продуцирующие NDM-металлопротеиназу и сериновые карбапенемазы OXA-48 и KPC.

Ключевые слова

Трансплантация фекальной микробиоты, РТПХ, сепсис, деколонизация, карбапенемазы, металлопротеиназа, NDM, OXA-48, KPC, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas spp.*

Expression of immune checkpoint molecules in bone marrow as a predictor of clinical outcome in myelodysplastic syndrome

Nikolai Y. Tsvetkov, Ivan S. Moiseev, Artem A. Gusak, Vadim V. Baykov, Elena V. Morozova, Boris V. Afanasyev

Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

Contacts: Dr. Nikolai Y. Tsvetkov

E-mail: nikolai.tsvetkov@yandex.ru

Introduction

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous group of hematological malignancies affecting mostly elderly people over 70 years. Lack of effective treatment modalities in the field promotes the search for new treatment options with several ongoing clinical trials. The checkpoint inhibitors are also an option since they are able to affect the bone marrow niche, which is involved in MDS development, although there is still no consensus on the optimal use of this method in MDS settings and treatment criteria. The aim of our single-center retrospective study was to determine whether different expression of checkpoint molecules in bone marrow biopsies at diagnosis may affect clinical course of MDS patients.

Materials and methods

A consecutive cohort of 55 MDS patients treated in our center in 2003 to 2018 was studied. Among 55 adult MDS patients, 27 belonged to high or very high risk group, as based on IPSS-R score values. Twenty-three patients subsequently underwent allogeneic bone marrow transplantation. The median follow-up period was 900 days. We developed a technique able to detect expression of the following antigens: PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, Galectin-9, TIM-3, CD80. The relations between expression level and clinical outcomes were analyzed. Three-year overall and relapse-free survival and time-to-progression were assessed as the main clinical outcomes. Our univariate analysis was aimed to assess the possible role of overall checkpoint expression level and age, IPSS/WPSS/IPSS-R scores, blood and blast counts, transfusion dependency. The SAS 9.4 software was used, p-value of

less than 0.05 was considered statistically significant. The study was approved by local Ethics Committee.

Results

Intensive expression of TIM-3 was observed in 100% of cases. Also, in most cases, moderate Gal-9 expression was observed on many cells. Our statistical analysis yielded a significant connection between CD80 expression and three-year time-to-progression. At 3-year follow-up disease progression was seen in 72.9% of patients with CD80 level of more than 1 point and 52.1% of patients with CD80 level of less than 1 point ($p=0.04$). Similar trend was seen for general checkpoint expression level. At 3-year follow-up, 67.2% of patients with checkpoint expression level of more than 1.5 point showed the disease progression, while in the group with checkpoint expression level of less than 1.5 point, the progression was seen only in 33.3% of cases ($p=0.059$).

Conclusion

Our preliminary study highlighted a potential role of immune checkpoint molecules in MDS pathogenesis and a need for further studies of different immune checkpoint inhibitors.

This work was supported by Russian Science Foundation, grant № 17-75-20145. Authors confirm the absence of any conflicts of interests.

Keywords

Myelodysplastic syndrome, checkpoint molecules, expression.

Уровень экспрессии молекул иммунных контрольных точек в костном мозге как предиктор клинического исхода при миелодиспластическом синдроме

Николай Ю. Цветков, Иван С. Моисеев, Артем А. Гусак, Вадим В. Байков, Елена В. Морозова, Борис В. Афанасьев

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

Введение

Миелодиспластический синдром (МДС) – это гетерогенная группа гематологических злокачественных ново-

образований, поражающая в основном пожилых людей старше 70 лет. Отсутствие эффективных лекарств при МДС побуждает к поиску новых веществ и подходов, и в настоящее время проводится несколько соответству-