



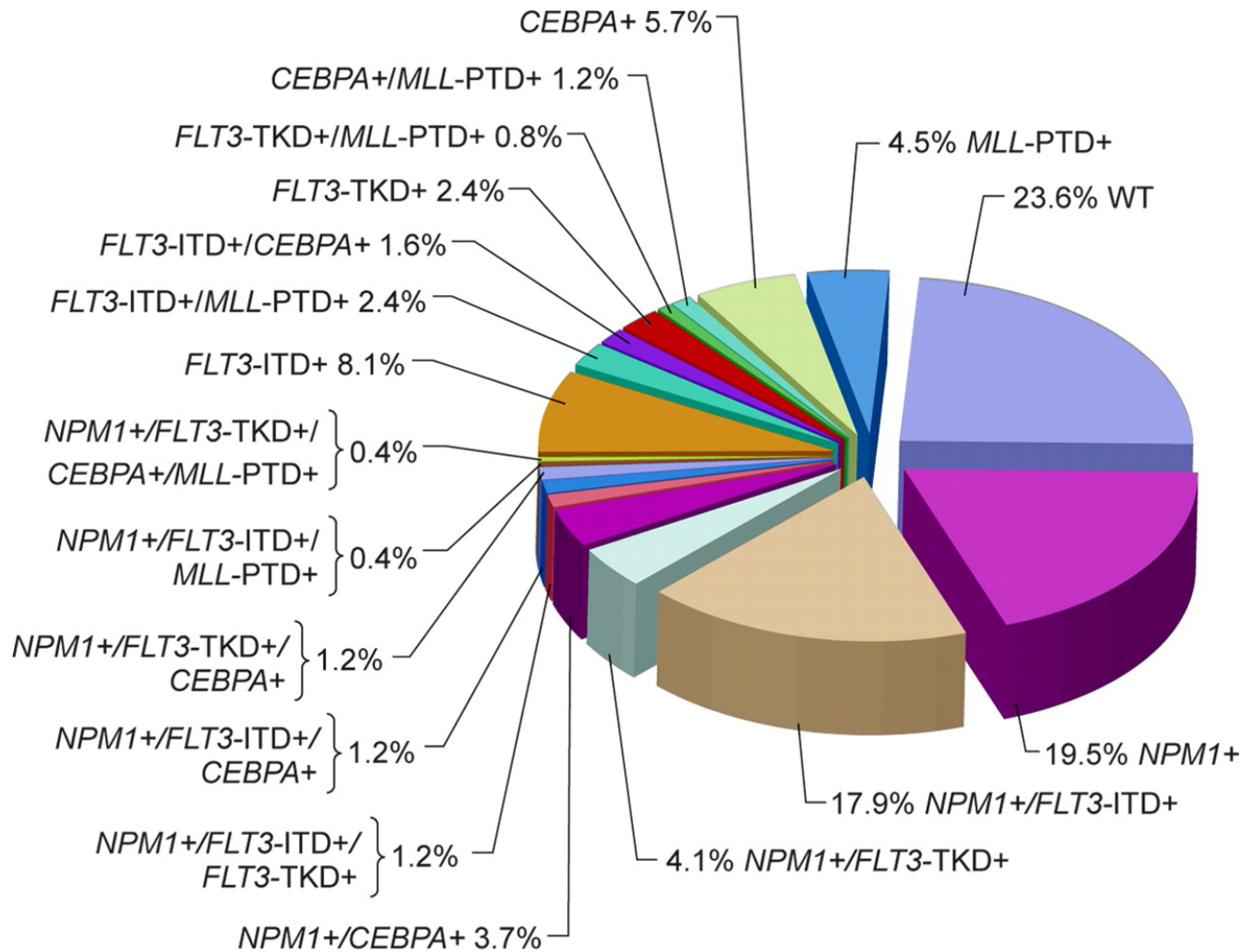
НИИ Детской онкологии, гематологии и трансплантологии
им. Р.М. Горбачевой
Первый Санкт-Петербургский Государственный Медицинский
Университет им. акад. И.П.Павлова

Оценка эффективности терапии у пациентов с острым лейкозом при проведении аллогенной трансплантации с использованием панели экспрессионных маркеров.

Бархатов И.М., Шакирова А.И., Смыкова О.Г., Катерина В.А.,
Лебединова Н.М., Тепляшина В.В., Зубаровская Л.С., Афанасьев Б.В.

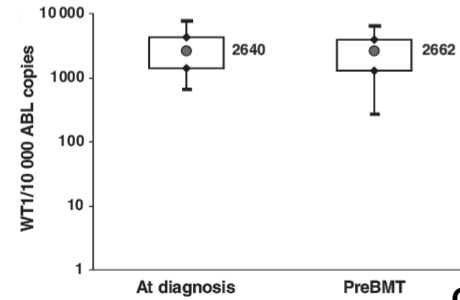
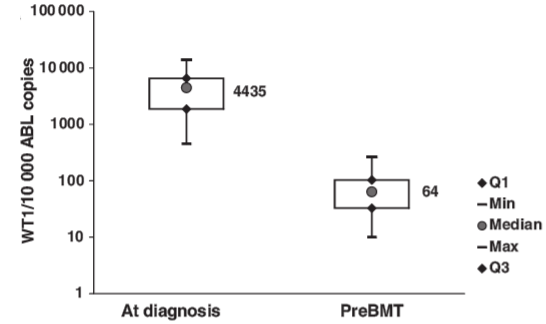
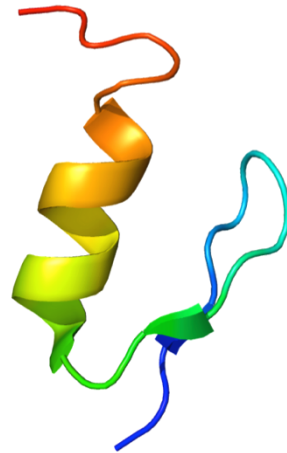
VI Межрегиональное совещание НОДГО
«Перспективы детской гематологии-онкологии - мультидисциплинарный подход».

Москва, 2015

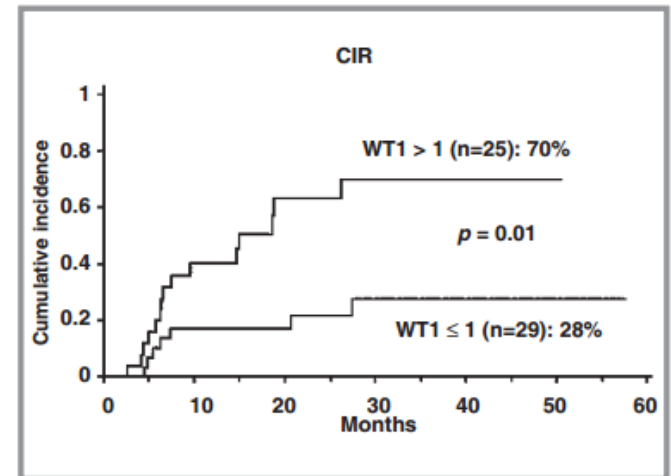
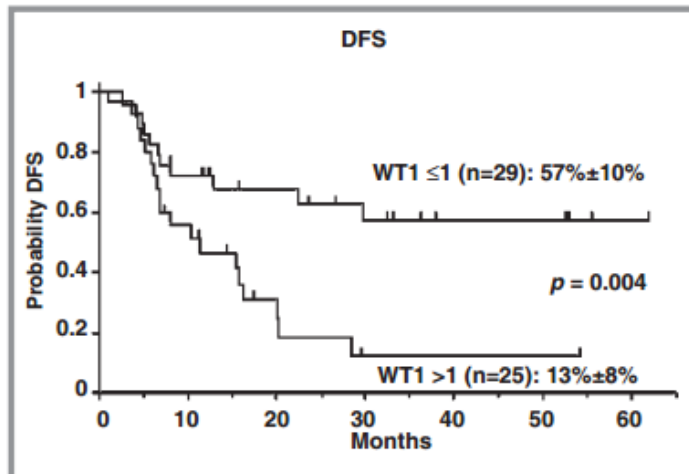


WT1 (*Wilms tumor gene*)

11p13

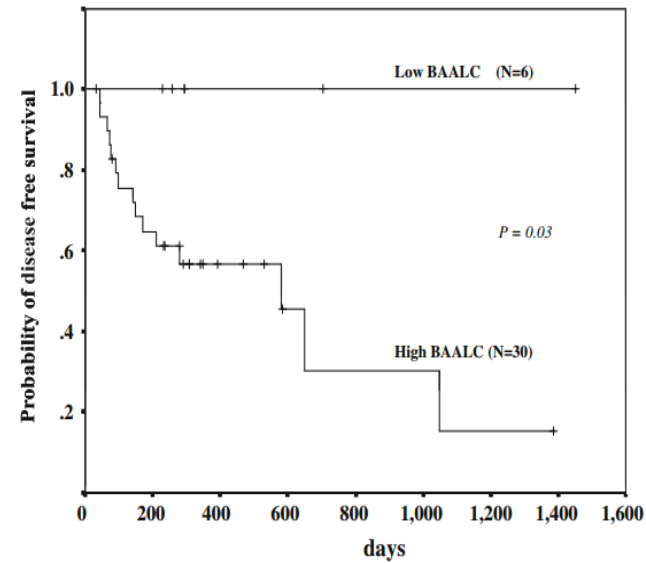
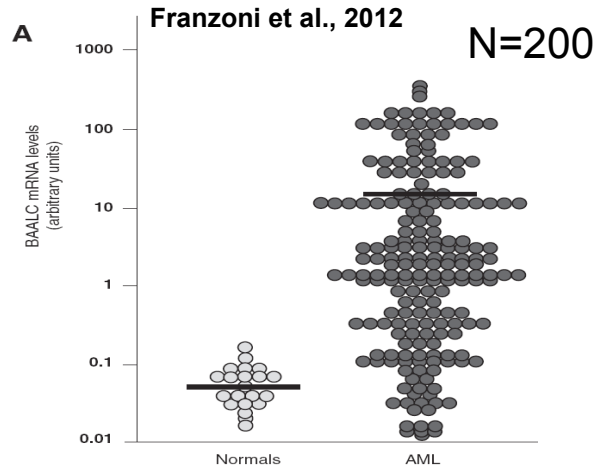


Candoni et al, 2009



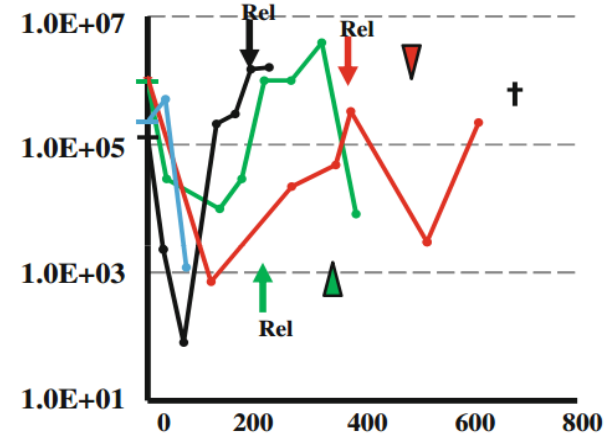
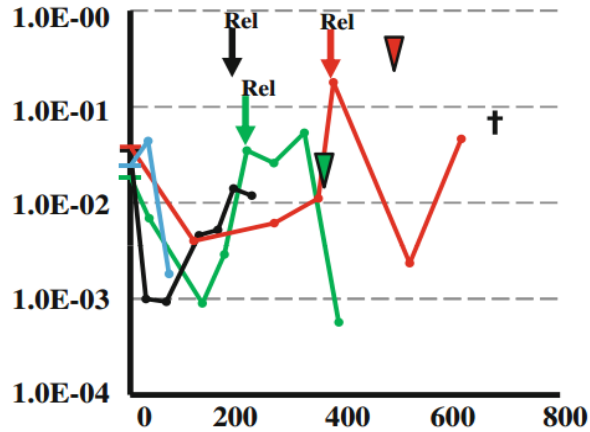
BAALC (*Brain and acute leukemia, cytoplasmic*)

8q22.3



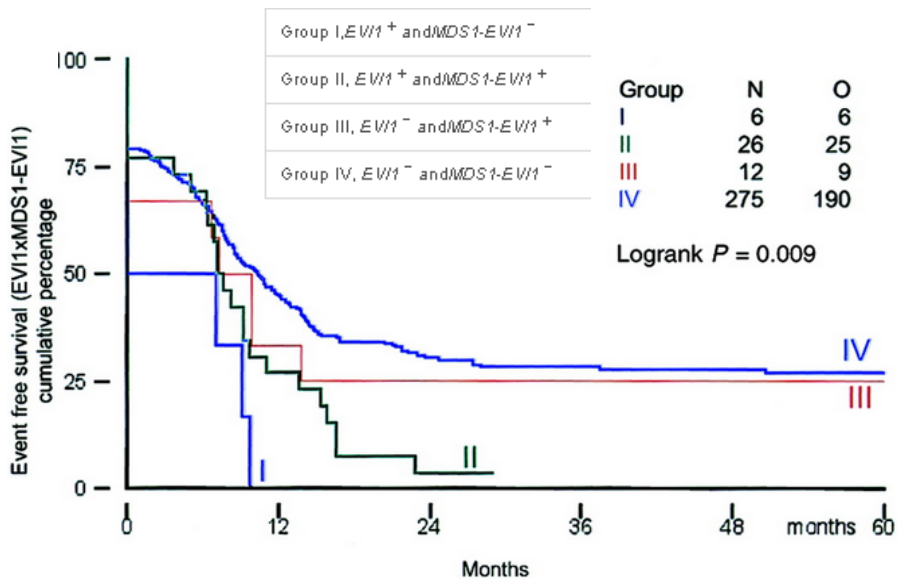
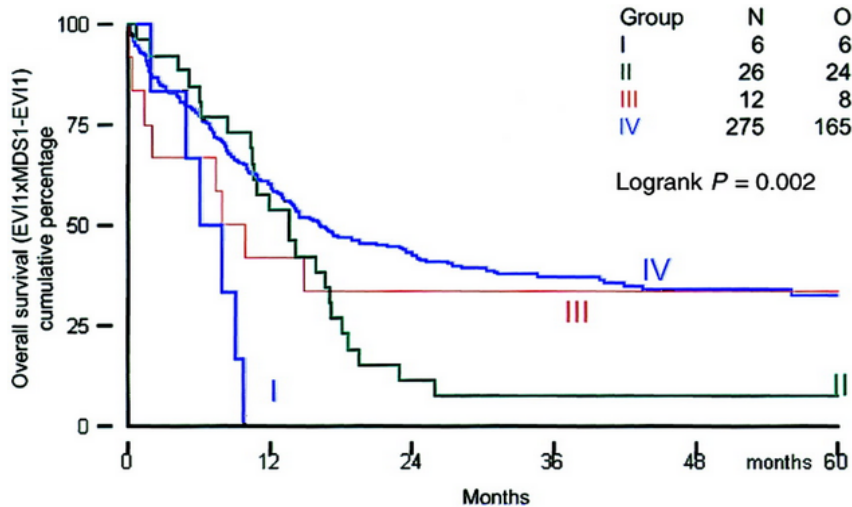
Najima et al., 2010

Сравнительный мониторинг экспрессии BAALC (слева) и транслокации t(8;21) (справа)



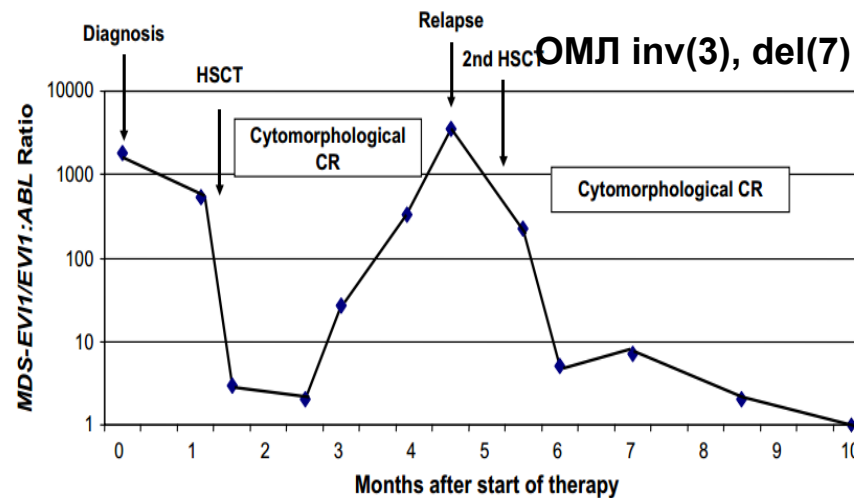
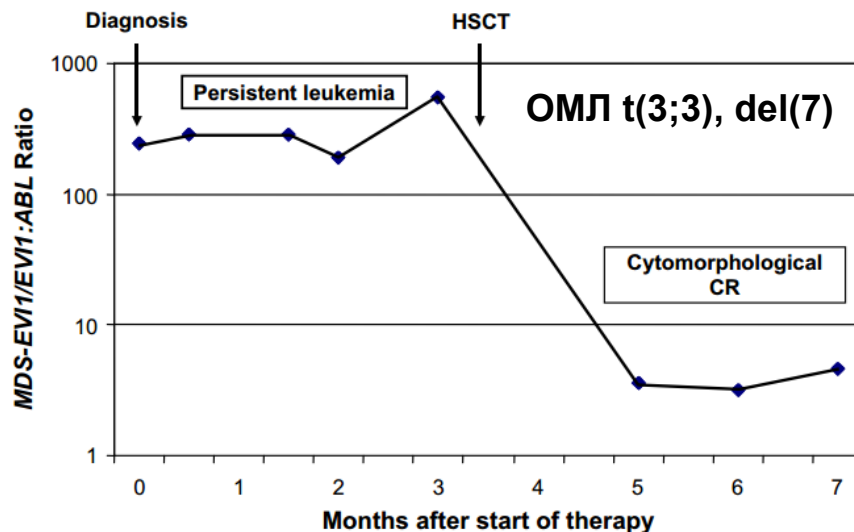


3q26.2



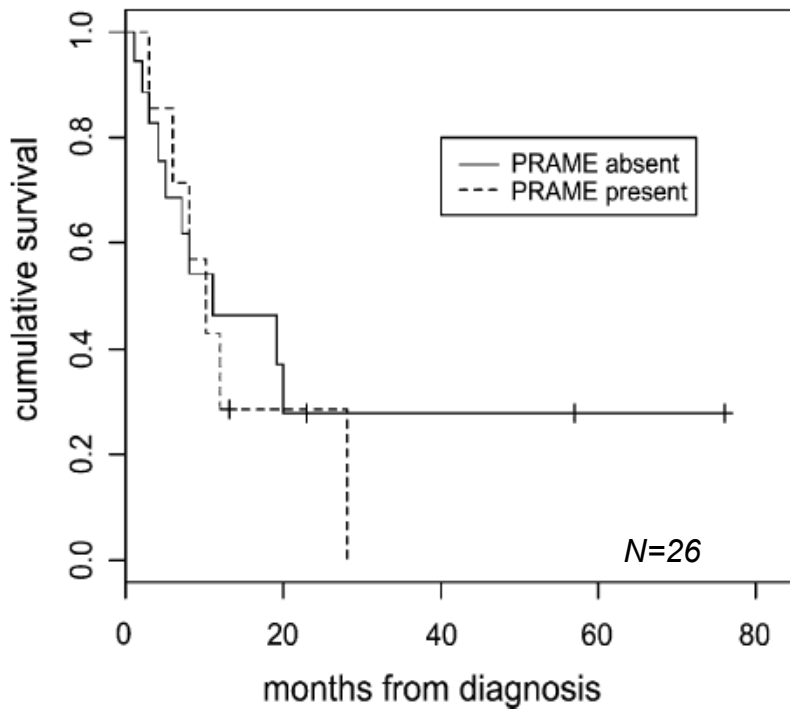
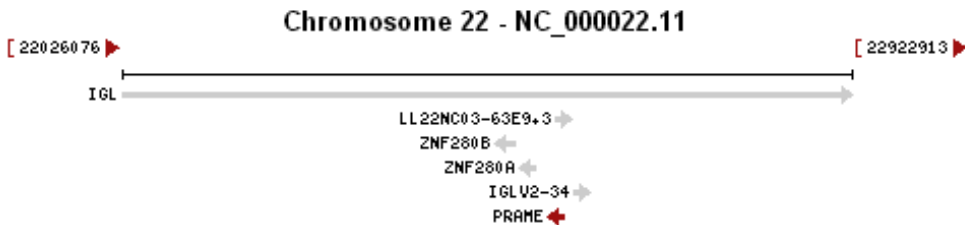
Khosrovani et al., [Blood](#). 2003 Feb 1;101(3)

Мониторинг МОБ с помощью EVI1



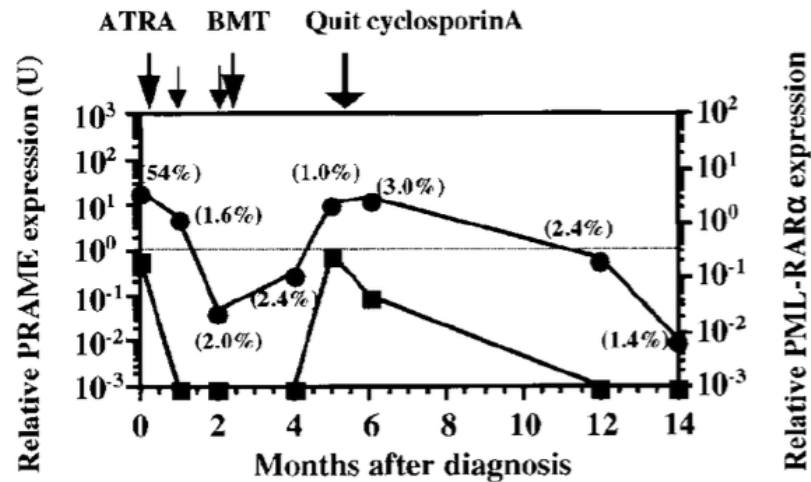
Weisser et al., [Cancer Genetics and Cytogenetics](#) 177 (2007)

22q11.22

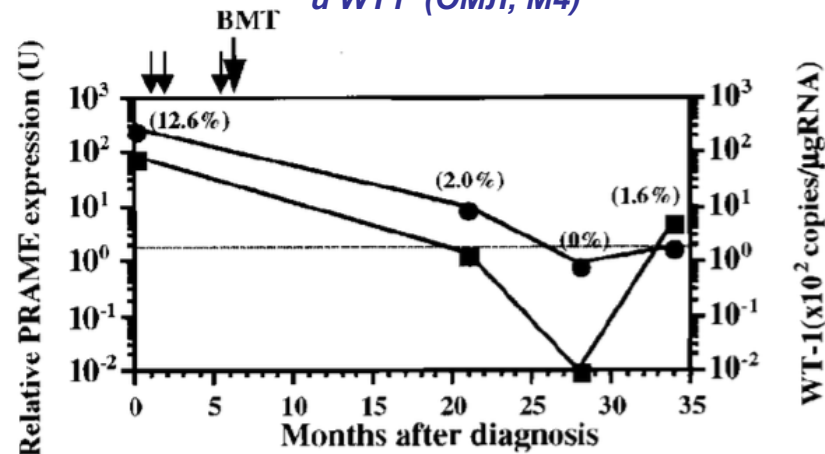


Christina A. Ortmann et al.,
Ann Hematol (2008) 87:809–818

Сравнительный мониторинг экспрессии PRAME и транслокации t(15;17) (ОМЛ, М3)



Сравнительный мониторинг экспрессии PRAME и WT1 (ОМЛ, М4)



Matsushita et al., *Br J Haematol*, 2001 Mar;112(4):916-26.

Цель работы

Разработать панель экспрессионных маркеров ОМЛ и оценить ее информативность в оценке развития посттрансплантационных рецидивов

Задачи

1. Исследовать уровень экспрессии маркеров (WT1, BAALC, PRAME, EVI1) в периферической крови и костном мозге здоровых доноров.
2. Проанализировать уровни экспрессии генов WT1, BAALC, PRAME, EVI1 в пробах кДНК пациентов исследуемой выборки до и после проведения ТКМ методом количественной ПЦР в режиме реального времени
3. Изучить прогностическую значимость исследуемых экспрессионных маркеров для оценки вероятности развития рецидива заболевания в посттрансплантационном периоде у пациентов с ОМЛ

Характеристика выборки пациентов с ОМЛ, которым выполнена трансплантация гемопозитических стволовых клеток (2010-2014 гг)

Количество пациентов (N) – 108

Мужчин - 57 (52%)

Женщин 51 - (48%)

Возраст – 27 (2-60) лет

Период наблюдения - 6 (1-47) мес

FAB классификация:

Виды алло ТГСК

Совместимость

M0 - 6 (5,6%)

M1 - 18 (16,7%)

M2 - 21 (19,4%)

M3 - 2 (1,9%)

M4 - 33 (30,5%)

M5 - 23 (21,3%)

M6 - 1 (0,9%)

M7 - 4 (3,7%)

Родственная – 19 (18%)

Неродственная – 73 (67%)

Гаплоидентичная - 16 (15%)

Полная – 74 (69%)

Частичная – 18 (16%)

Гапло - 16 (15%)

Характеристика выборки пациентов с ОМЛ при аллоТГСК (2010-2014 гг) N108

Профилактика острой РТПХ:

CsA+MMF	3
ATGAM+CsA+MTX	2
ATGAM+MTX+Tx+MMF	2
ATGAM+Tx+MMF	2
ATGAM+Tx+MTX	5
CsA+Mtx	8
CsA+Tx+Sir	2
CsA+ATGAM+MMF+Cy	2
Cy+CsA (+ моноциклофосфан, + моноциклоспорин)	6
Cy+CsA+MMF	1
Cy+Tx+MMF	7
Cy+Tx+Mtx	1
Cy+Tx+Sir	1
MMF+Cy+Tc	18
MMF+Tc	8
MMF+мабтера+campas	1
Mtx+MMF+Tc	1
Mtx+Tc	22
Tc+Cy	1
Tc+Cy+Rap (+MMF)	4
Tc+Cy+Sir(+MMF)	6
Tc+Sir	2
Mtx+Tx	1

Режим кондиционирования:

Миелоаблативный – 46 (43%)

Немиелоаблативный – 62 (57%)

Статус заболевания перед ТГСК

Ремиссия 1 – 52 (48%)

Ремиссия 2 и 3 – 22 (20%)

Вне ремиссии - 34 (32%)

Профилактика рецидива (ИДЛ)

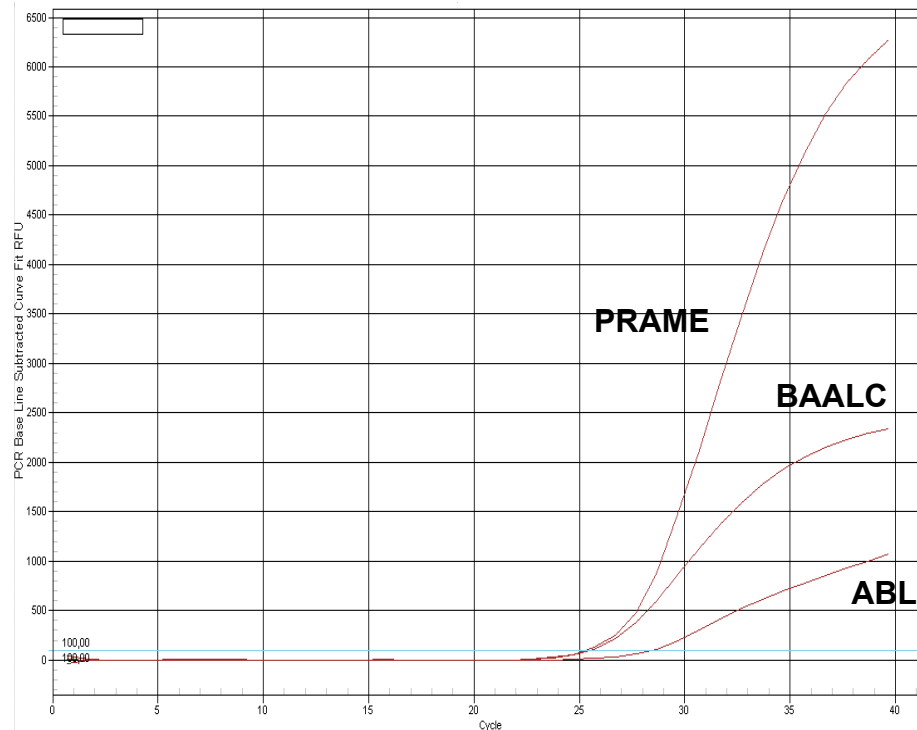
Да – 20 (19%)

Нет – 88 (81%)

Материалы и методы

Оценка уровней экспрессии генов WT1, EVI1, BAALC и PRAME методом РТ-ПЦР

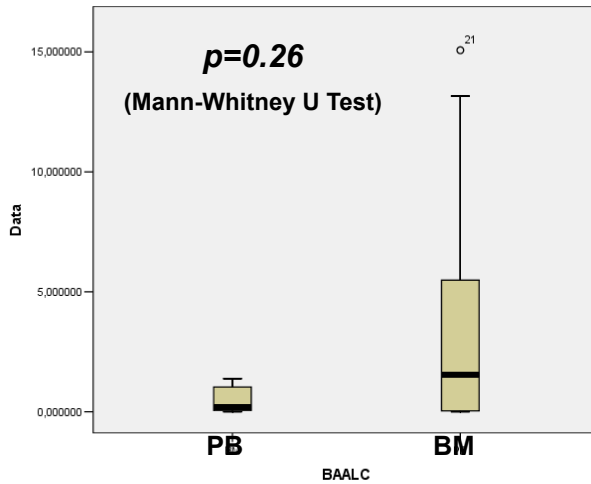
1. Разработан метод количественной ПЦР в режиме реального времени для определения уровней экспрессии генов WT1, EVI1, BAALC и PRAME в режиме мультиплекс относительно референсного гена ABL;
2. Исследованы уровни базальной экспрессии генов WT1, EVI1, BAALC и PRAME в пробах кДНК периферической крови (N=10) и костного мозга (N=10) здоровых доноров, выявлены пороговые значения экспрессии для пациентов с ОМЛ



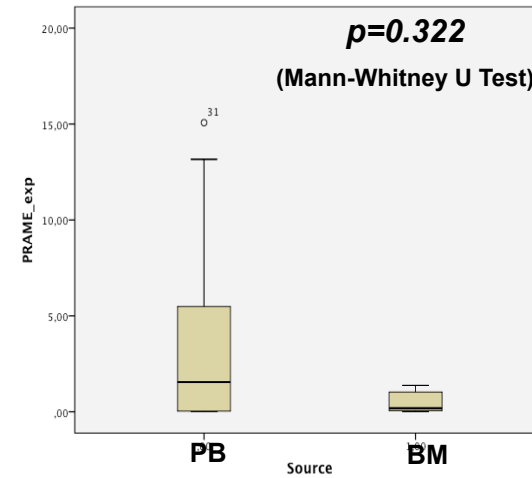
Результаты



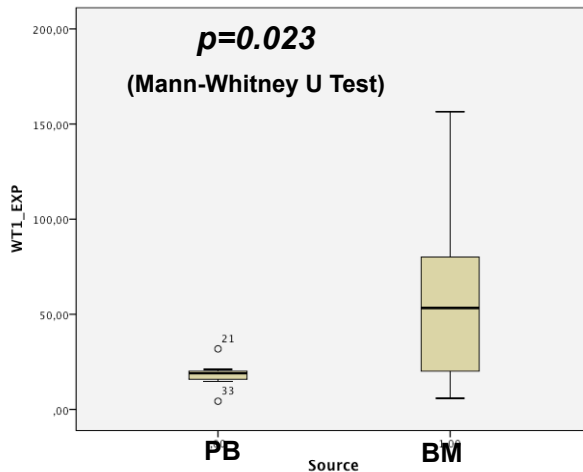
Уровень экспрессии гена **BAALC** у здоровых доноров (костный мозг и кровь)



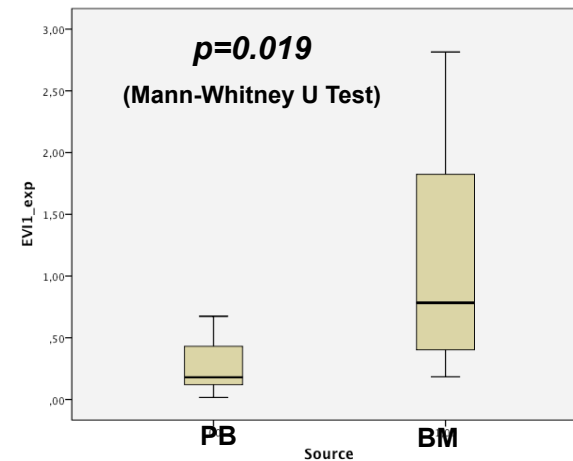
Уровень экспрессии гена **PRAME** у здоровых доноров (костный мозг и кровь)



Уровень экспрессии гена **WT1** у здоровых доноров (костный мозг и кровь)

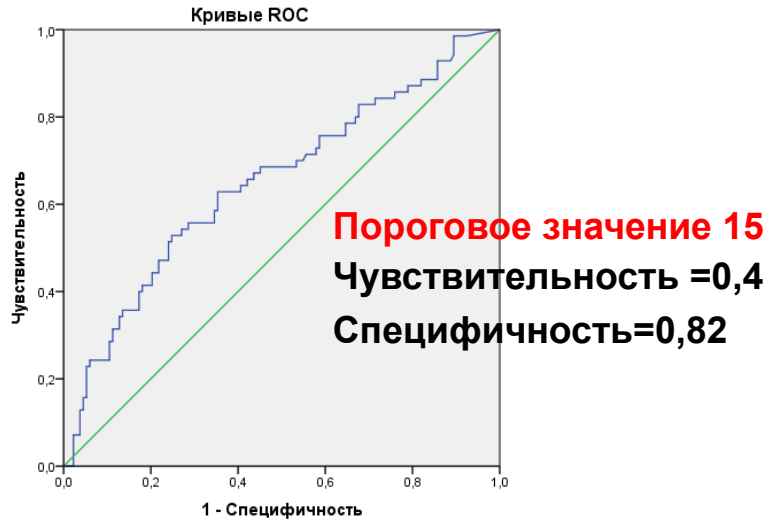


Уровень экспрессии гена **EVI1** у здоровых доноров (костный мозг и кровь)

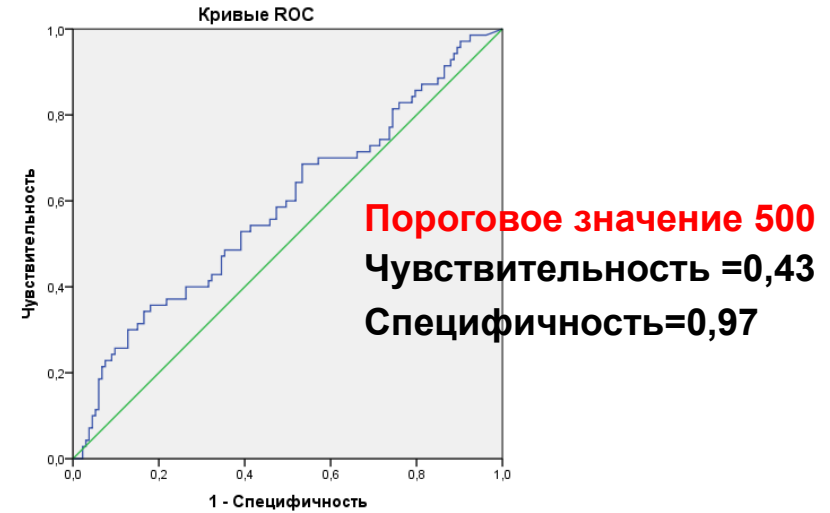


Расчет пороговых значений экспрессии в зависимости от чувствительности и специфичности методов ее детекции, определенных относительно референтных МЕТОДОВ

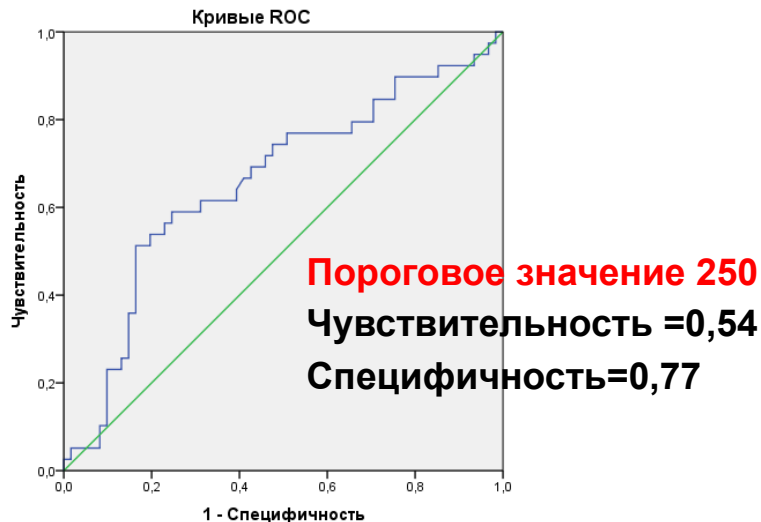
Уровень экспрессии гена **BAALC** у здоровых доноров



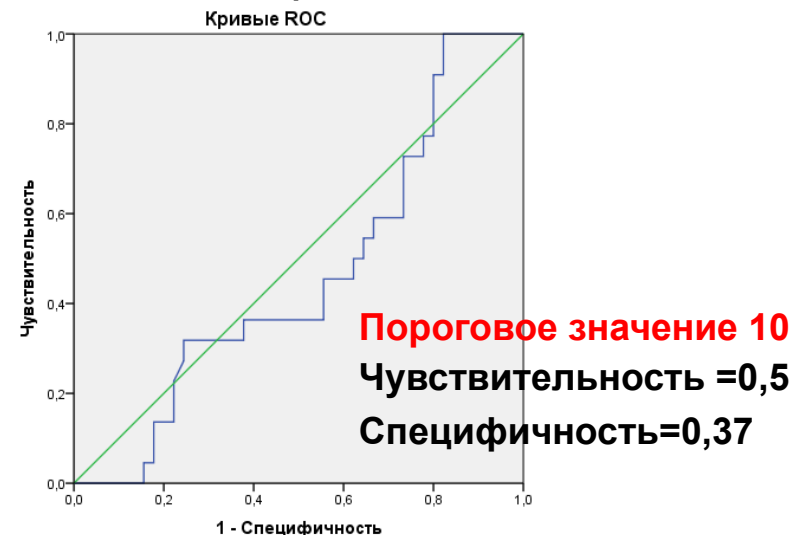
Уровень экспрессии гена **PRAME** у здоровых доноров



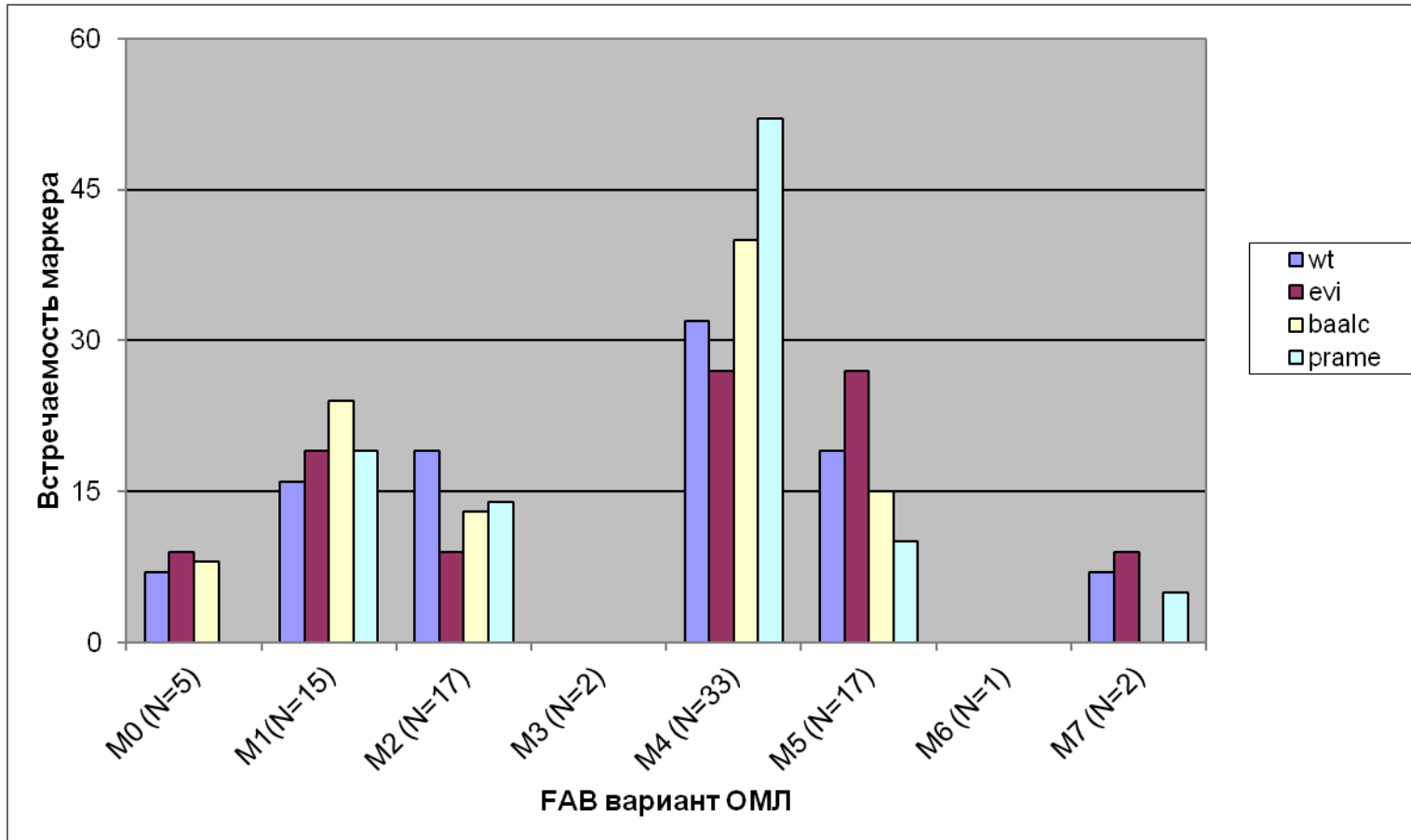
Уровень экспрессии гена **WT1** у здоровых доноров



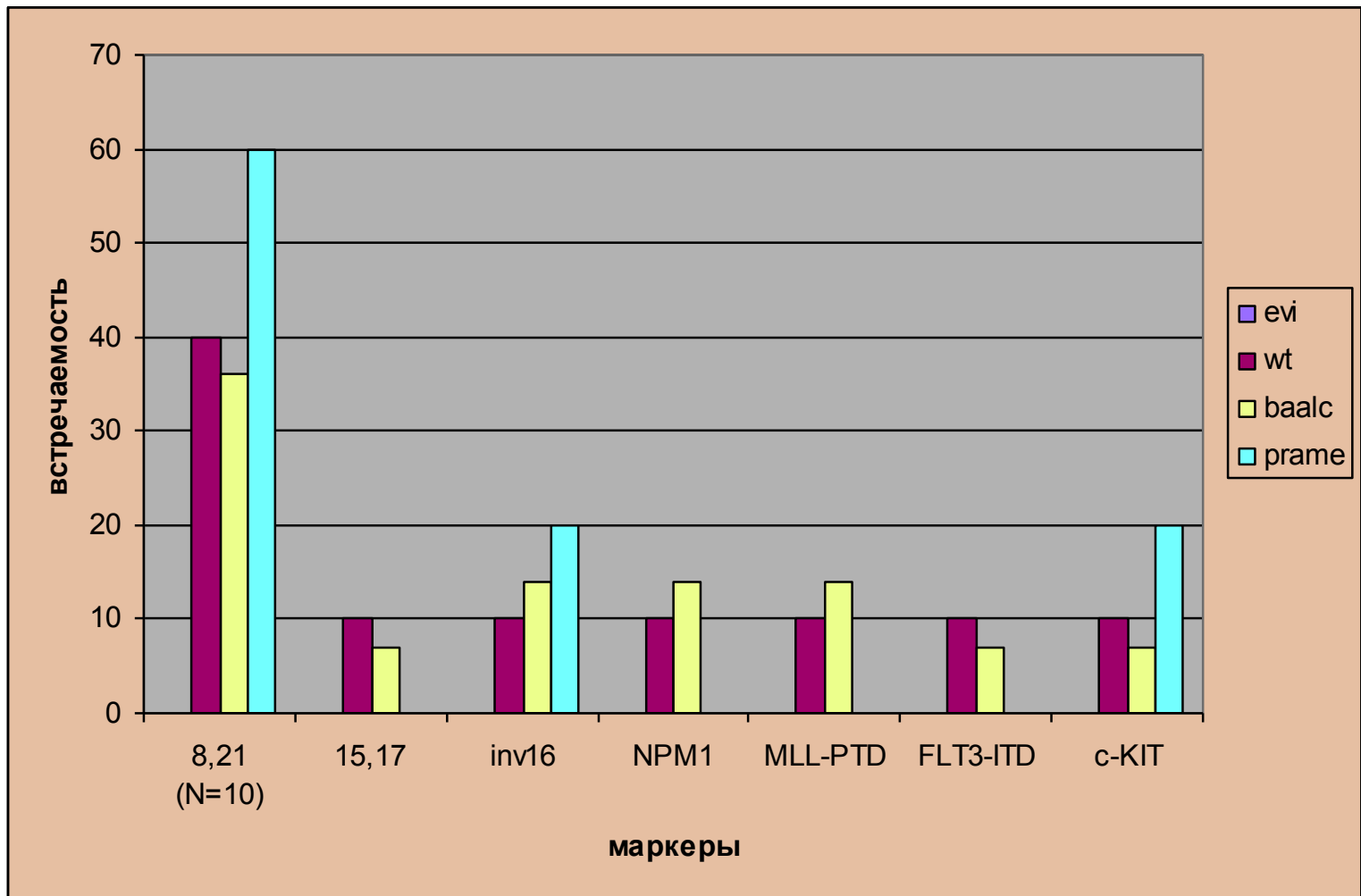
Уровень экспрессии гена **EVI1** у здоровых доноров



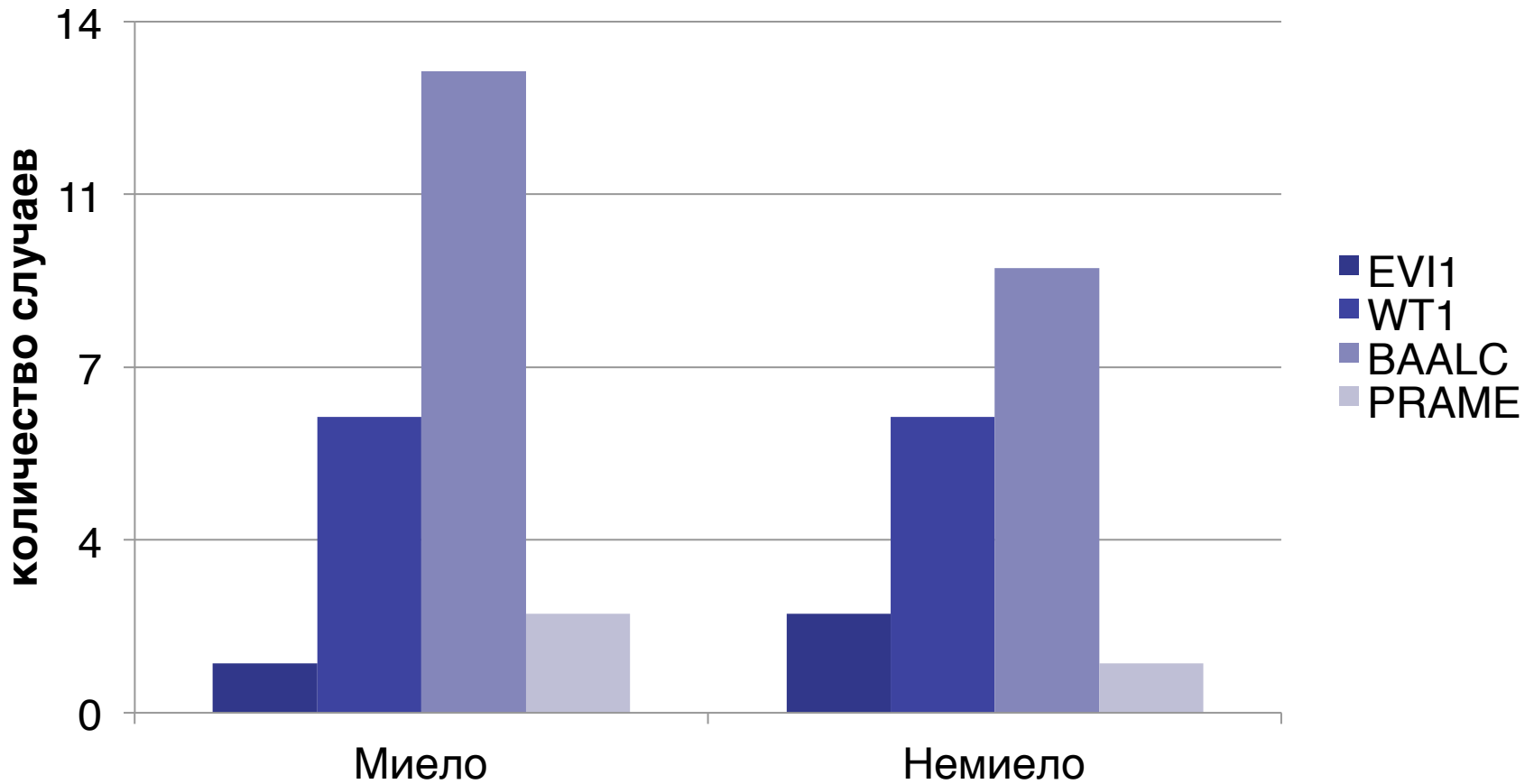
Ассоциация гиперэкспрессии исследуемых генов с FAB вариантом ОМЛ



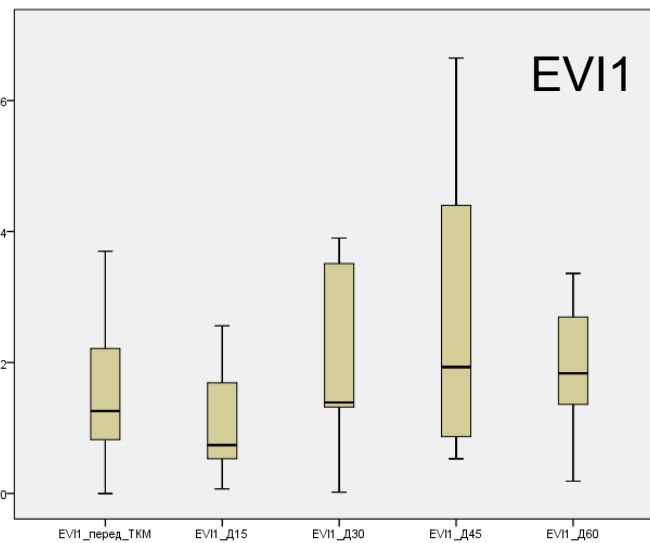
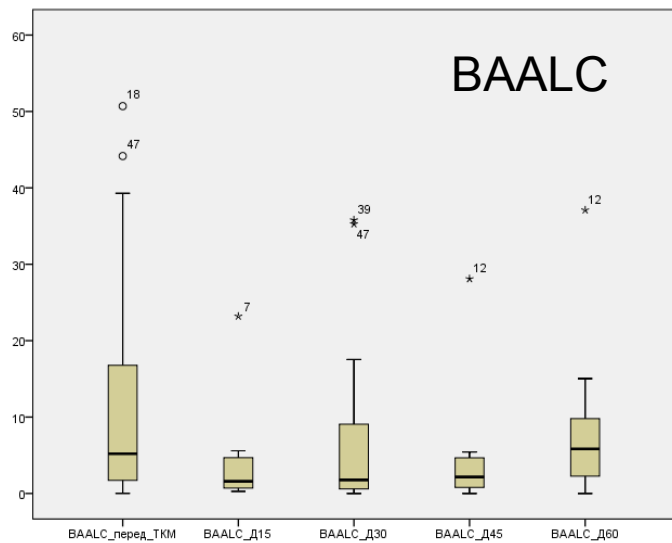
Взаимосвязь гиперэкспрессии исследуемых генов с другими молекулярными маркерами ОМЛ



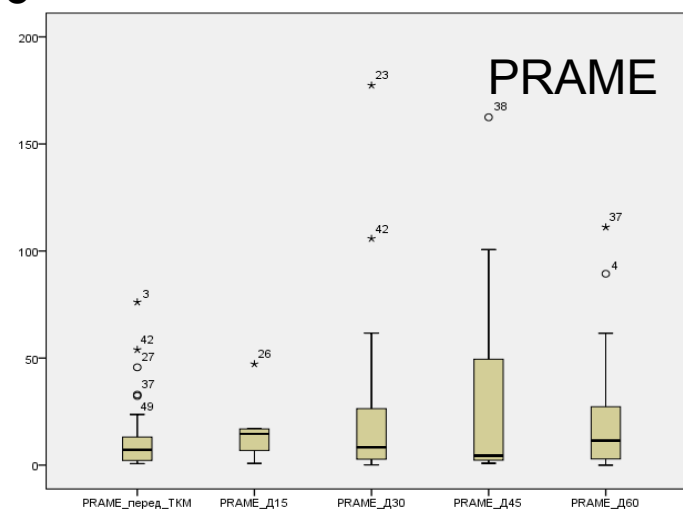
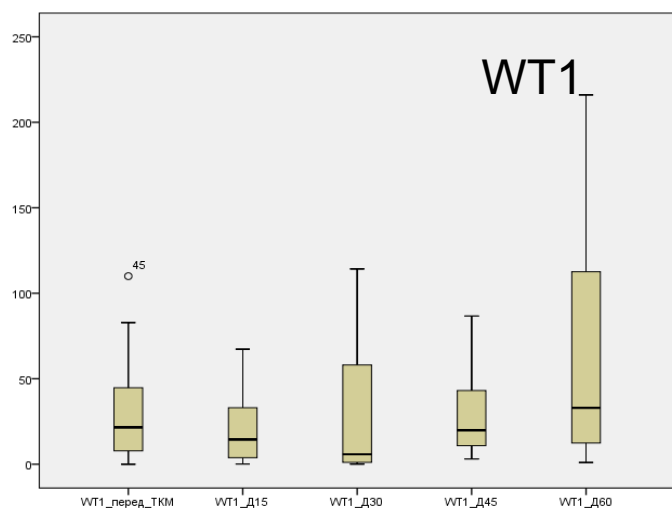
Влияние режима кондиционирования на снижение экспрессии исследуемых маркеров в посттрансплантационном периоде



Изменения экспрессии генов BAALC, WT1, EVI1, PRAME на фоне ТКМ

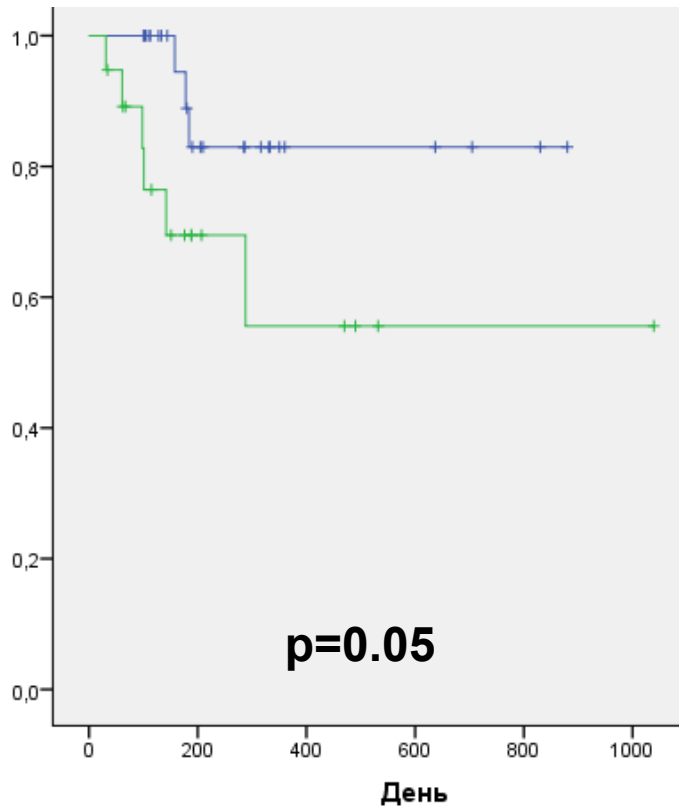


$p > 0.05$

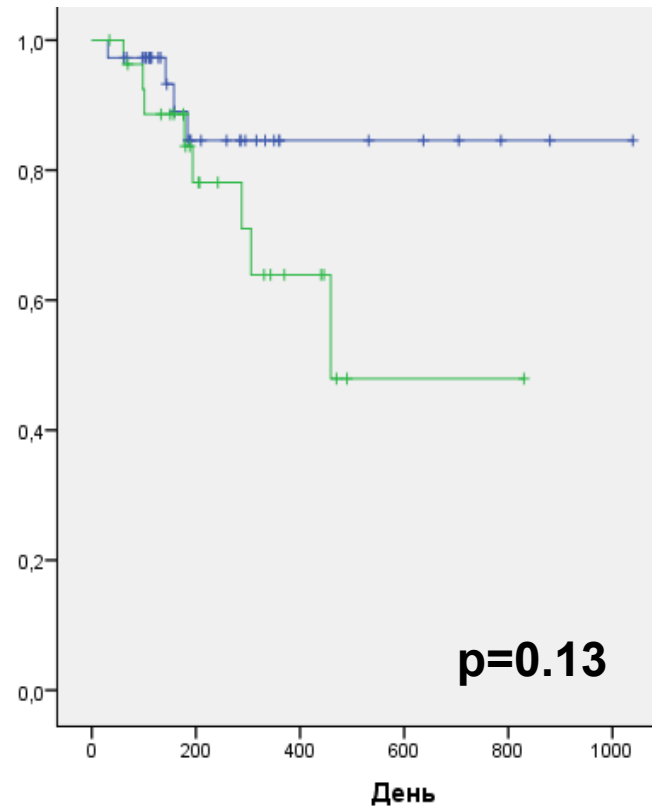


Общая выживаемость пациентов с ОМЛ в зависимости от гиперэкспрессии гена WT1

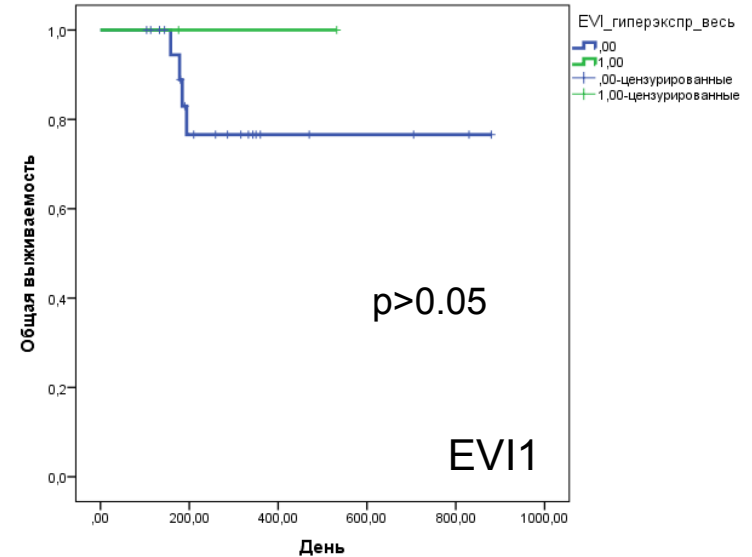
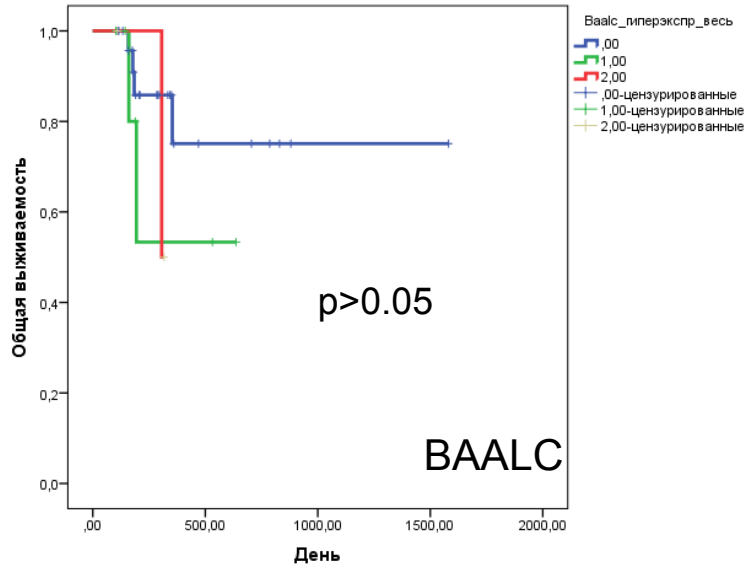
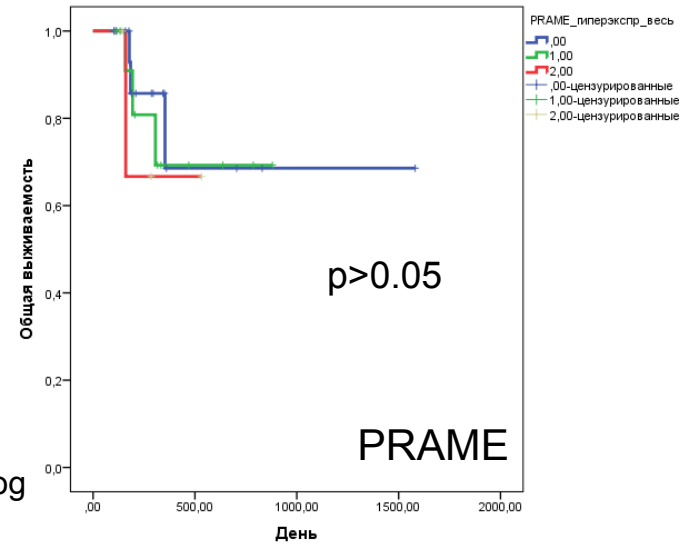
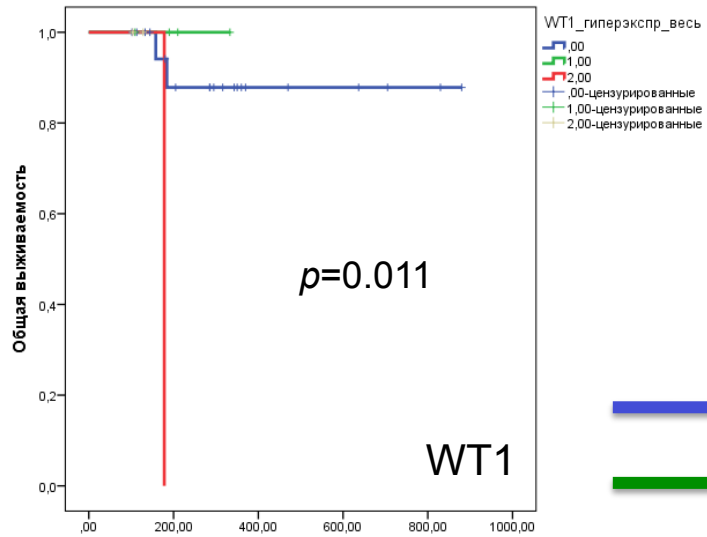
До ТКМ



После ТКМ

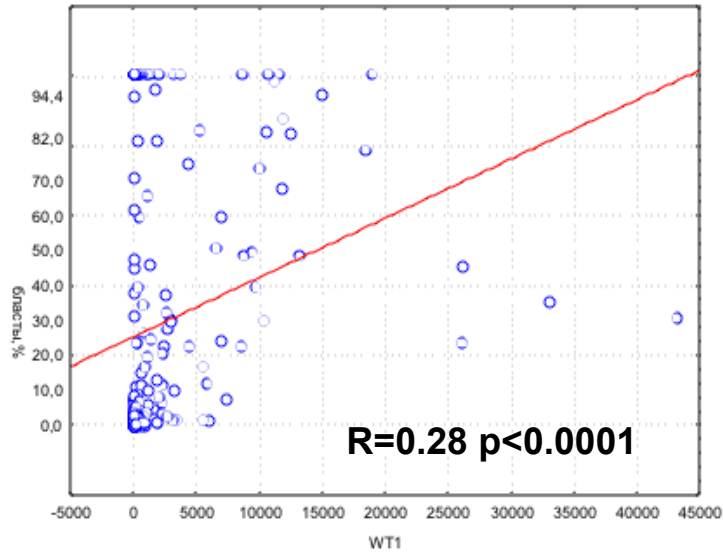


Влияние повышения уровня экспрессии генов после ТКМ относительно значения до ТКМ (на фоне ремиссии заболевания)

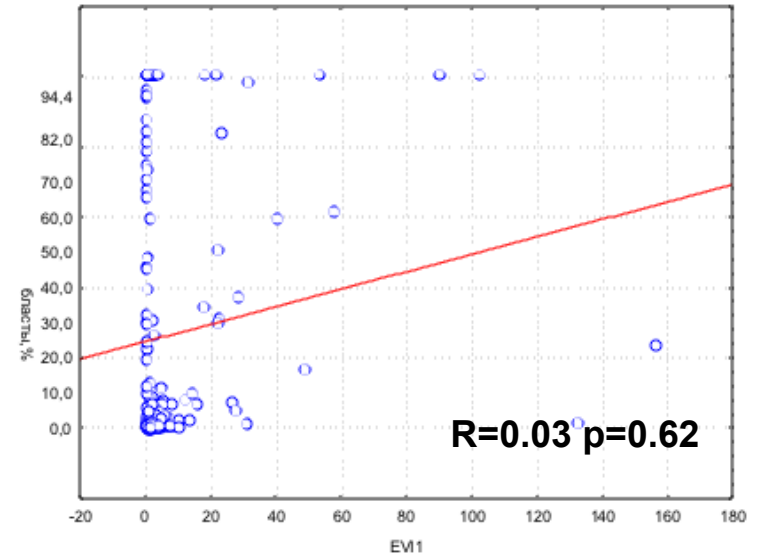


Соотношение количества бластных клеток в костном мозге и гиперэкспрессии исследуемых генов

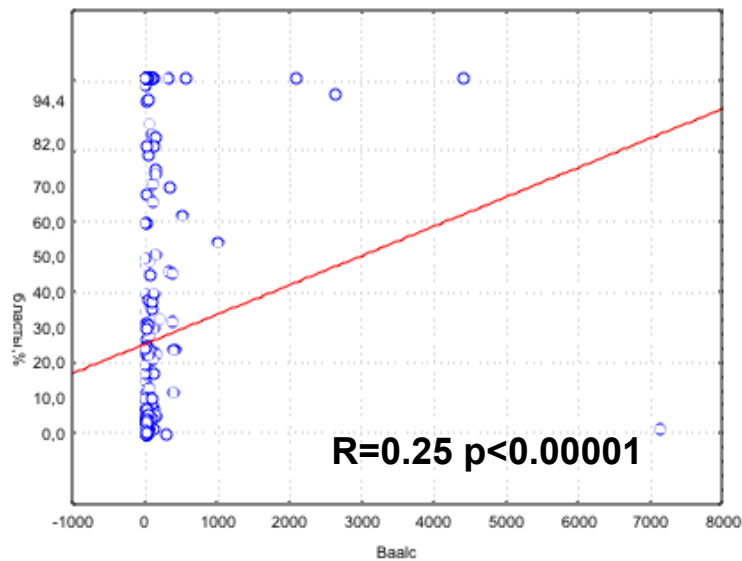
WT1 и бласты



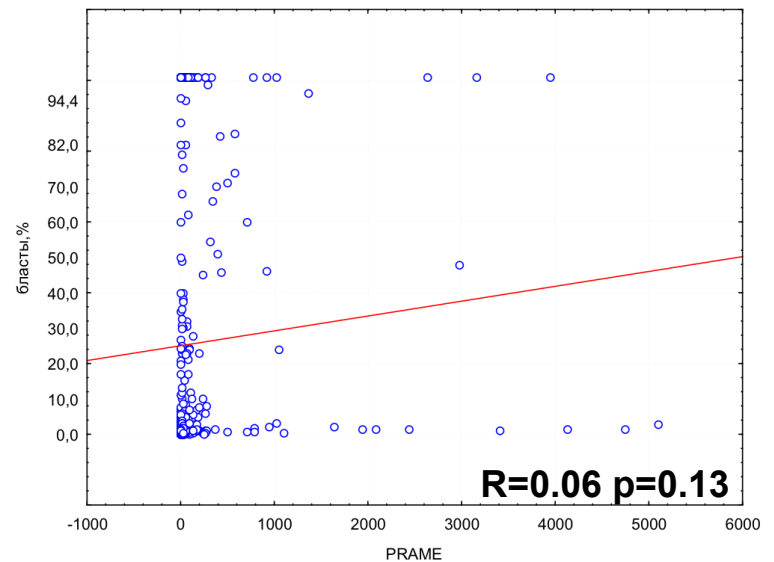
EVI1 и бласты



BAALC и бласты

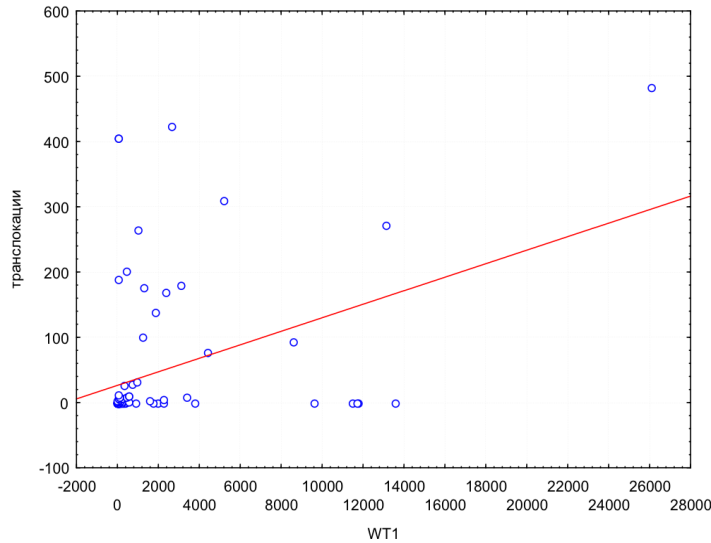


PRAME и бласты



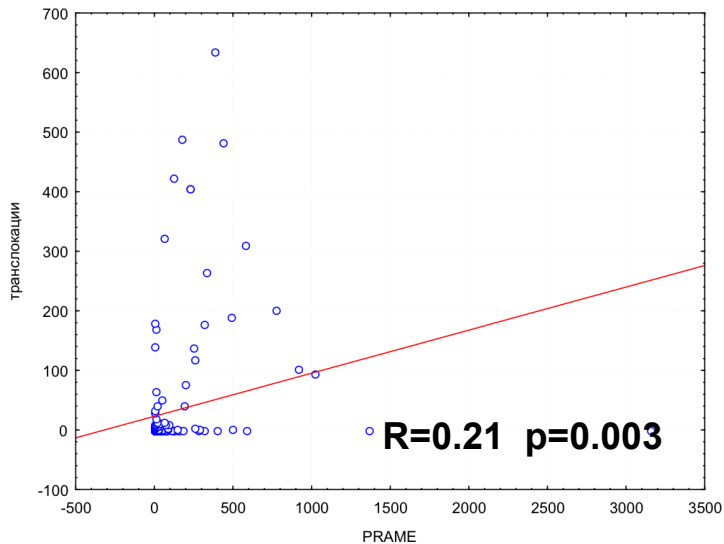
Исследование взаимосвязи уровня экспрессии химерных генов и гиперэкспрессии исследуемых генов

WT1 и хим. ген



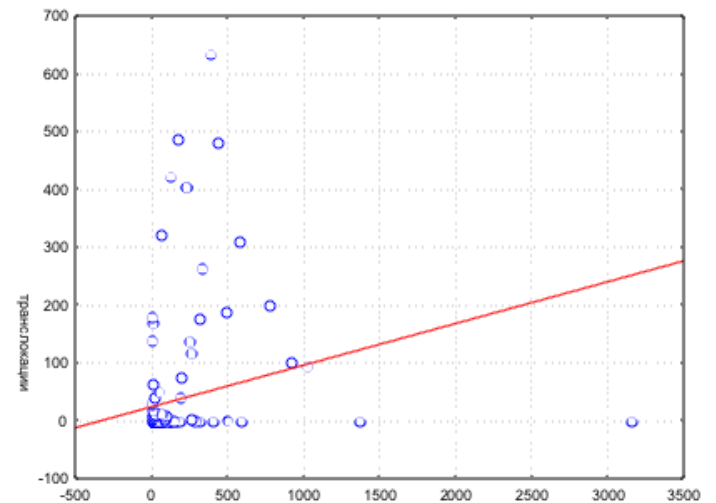
R=0.266 p=0.01

PRAME и хим. ген



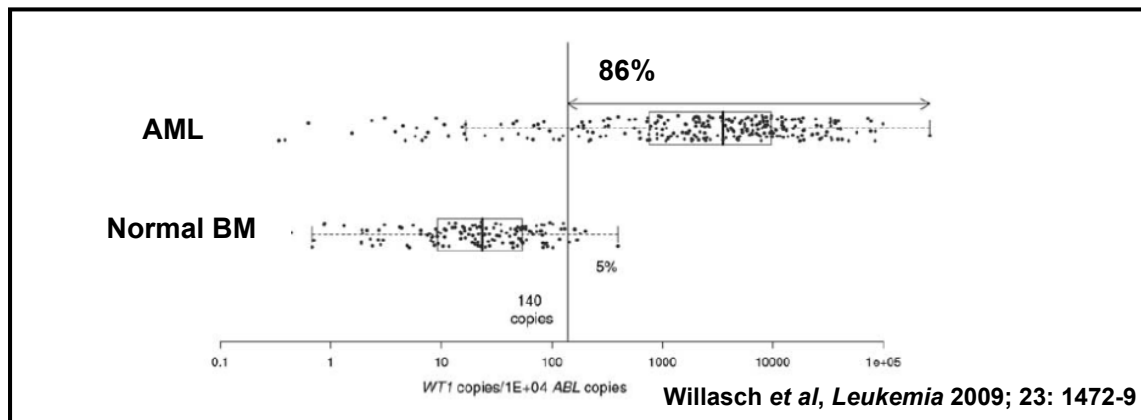
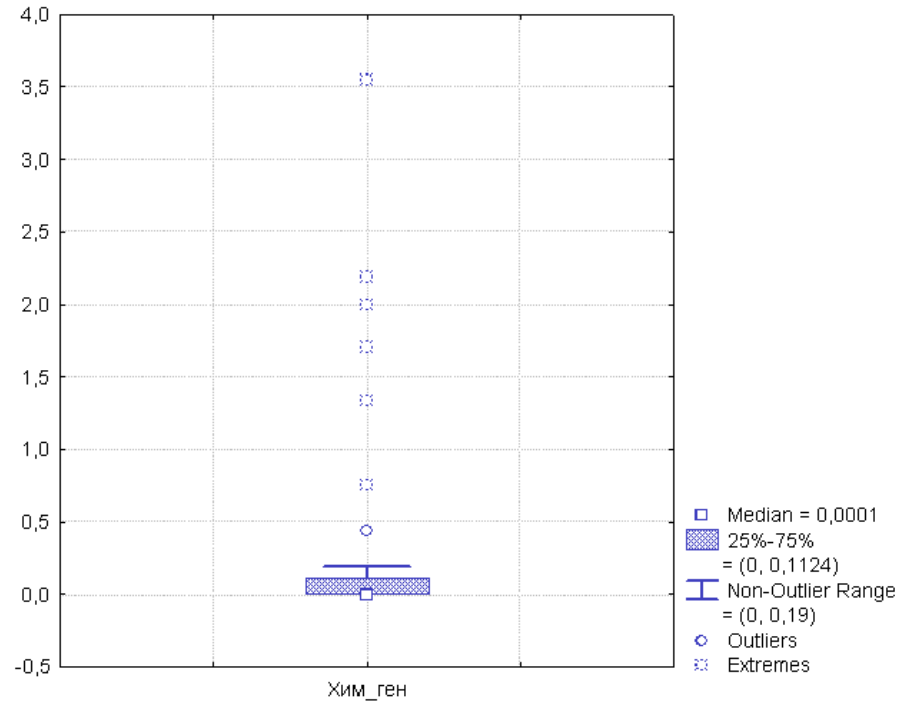
R=0.21 p=0.003

BAALC и хим. ген



R=0.27 p=0.0001

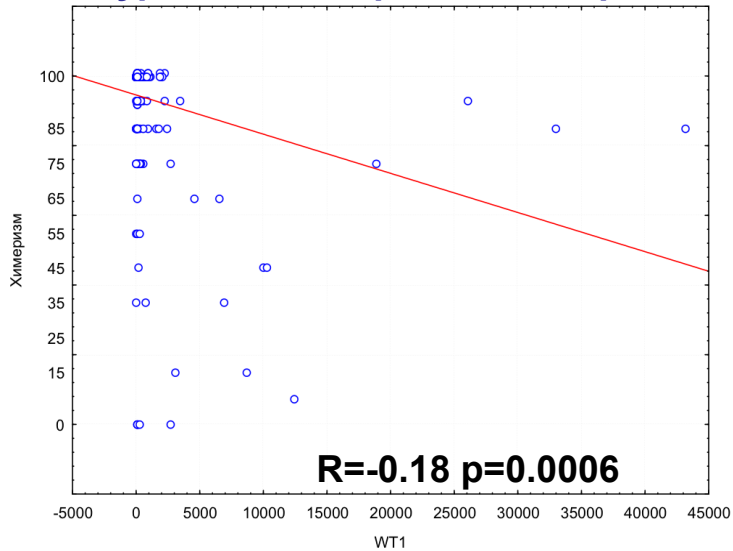
Выявление уровня экспрессии химерных транскриптов при экспрессии WT1, BAALC, PRAME ниже порогового уровня



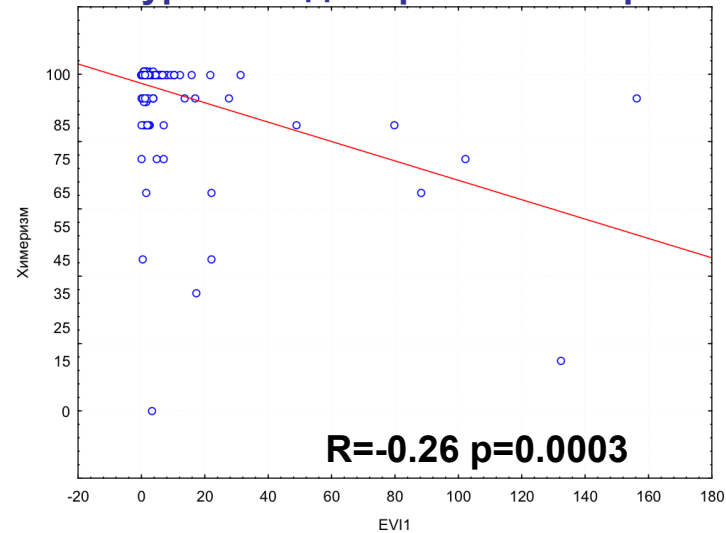
Исследование взаимосвязи уровня донорского химеризма и гиперэкспрессии исследуемых генов



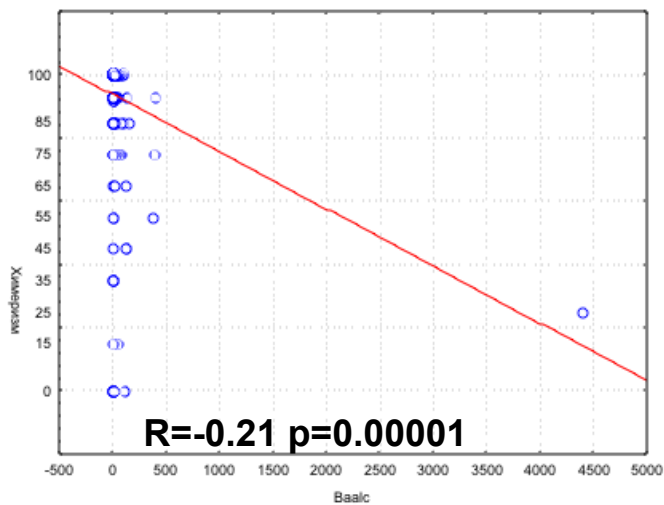
WT1 и уровень донорского химеризма



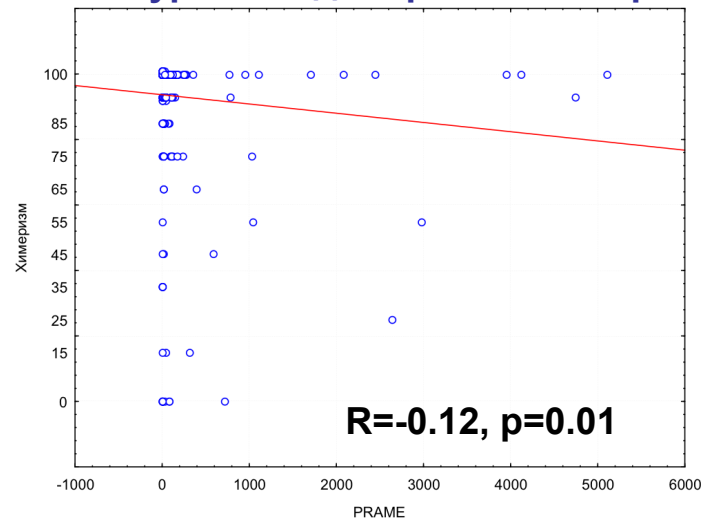
EV11 и уровень донорского химеризма



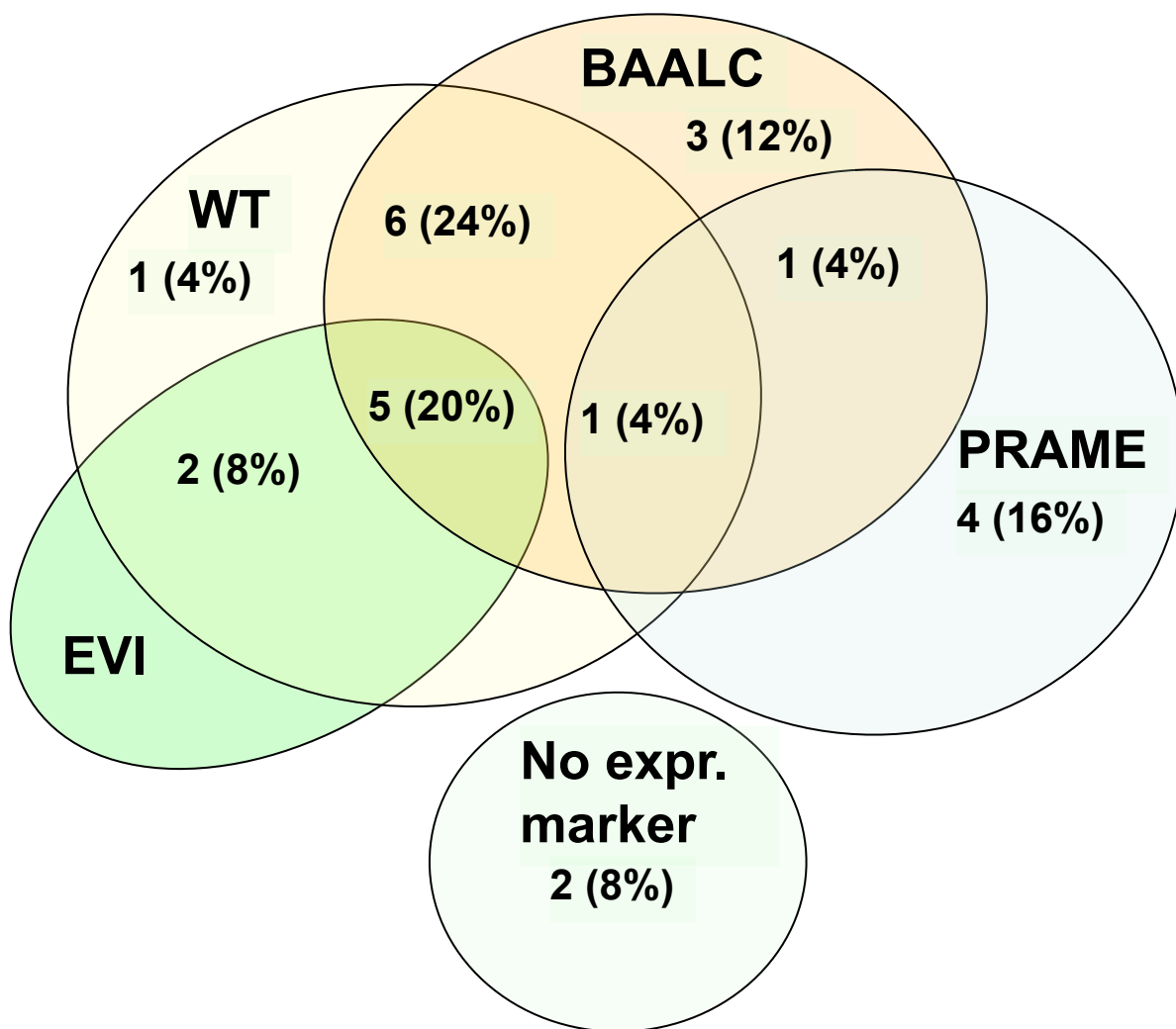
BAALC и уровень донорского химеризма



PRAME и уровень донорского химеризма



Информативность экспрессионных маркеров рецидива у пациентов с ОМЛ после аллоТГСК со снижением уровня донорского химеризма более, чем на 10% в посттрансплантационном периоде (n=25)



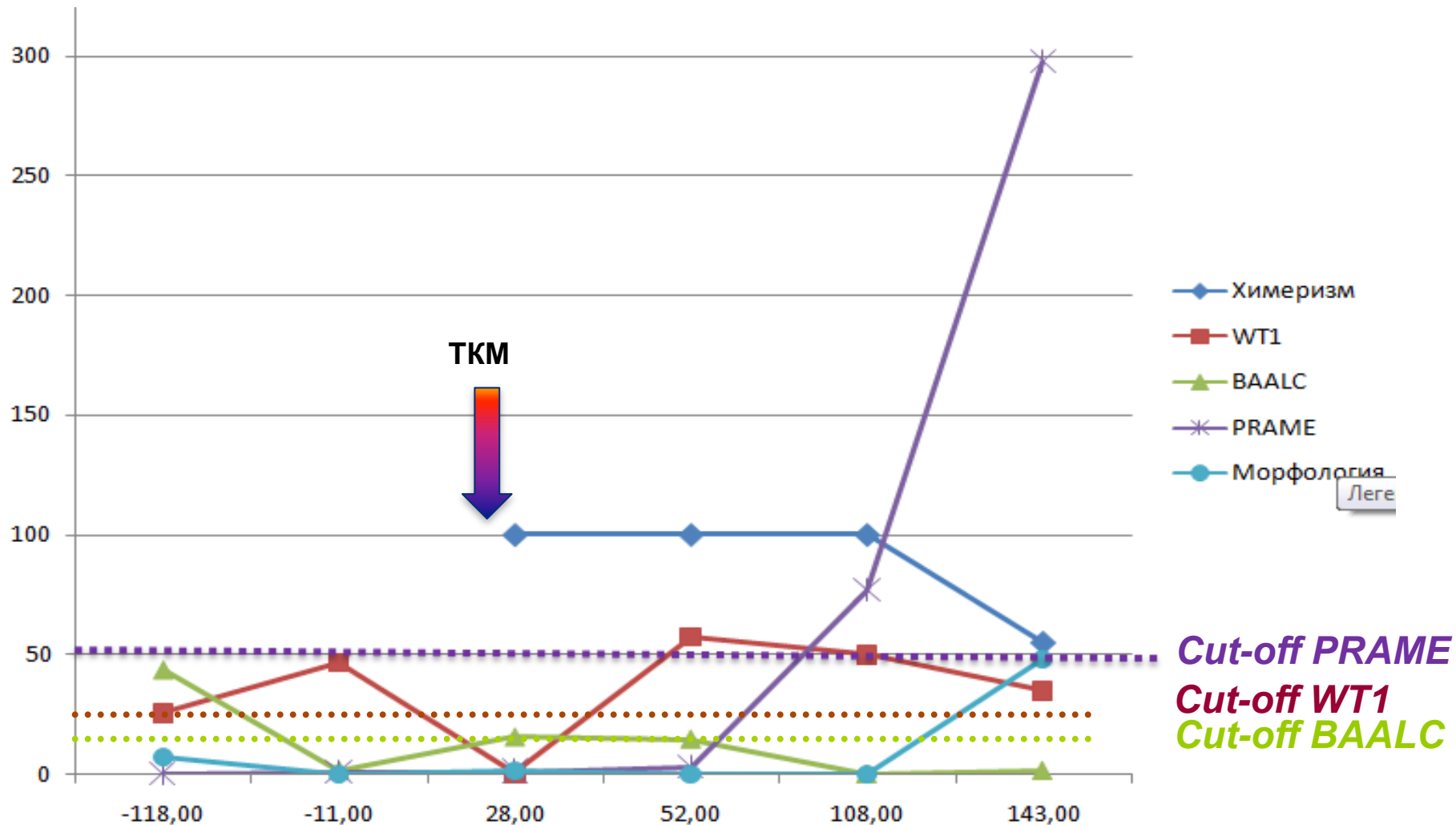
WT1 – 15 (60%)
PRAME – 6 (24%)
BAALC – 16 (64%)
EVI1 – 7 (28%)
нет маркера – 2 (8%)

Case report

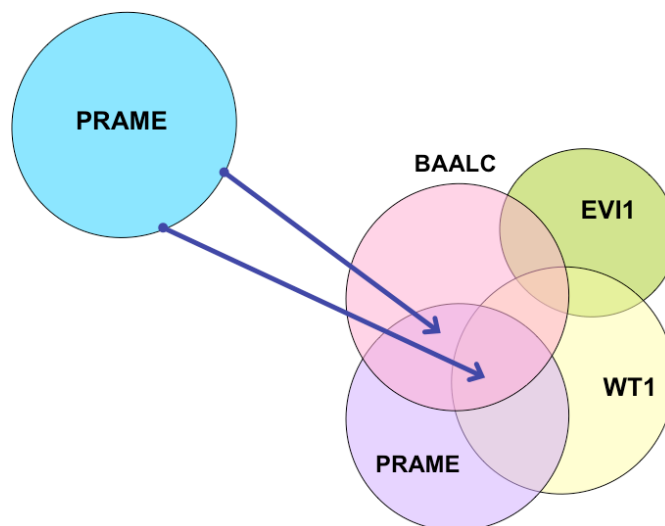
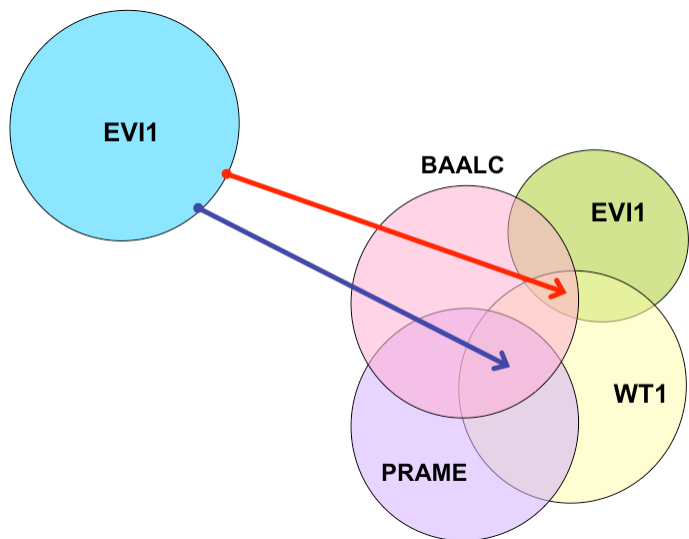
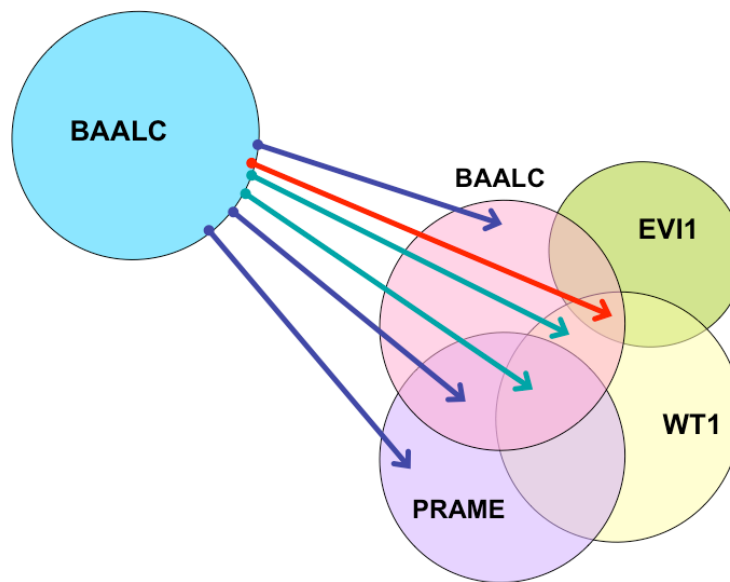
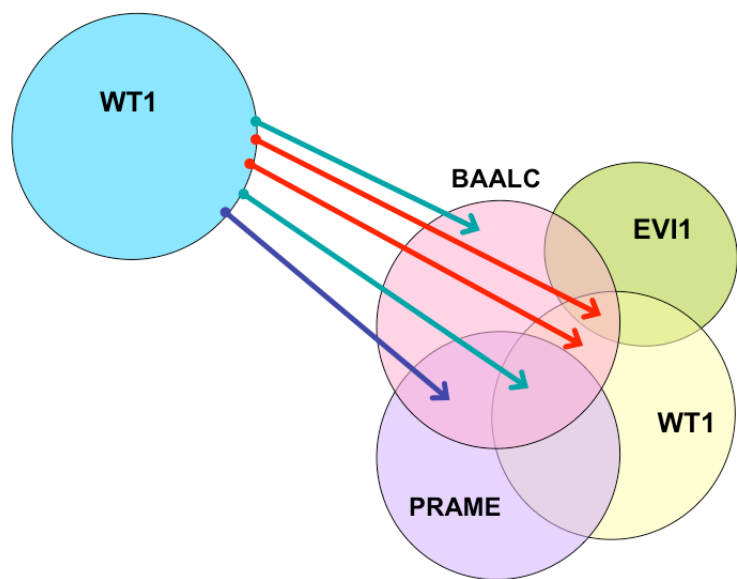
Пациент В (пол – м, 26 лет) НК ОМЛ, М1 FAB вариант,
Проведена аллогенная родственная трансплантация в 1 ремиссии, RIC

Наличие молекулярных aberrаций: **ОТРИЦ**

Экспрессионные маркеры: **WT+/PRAME+**



Изменение профиля экспрессии генов на фоне развития посттрансплантационных рецидивов



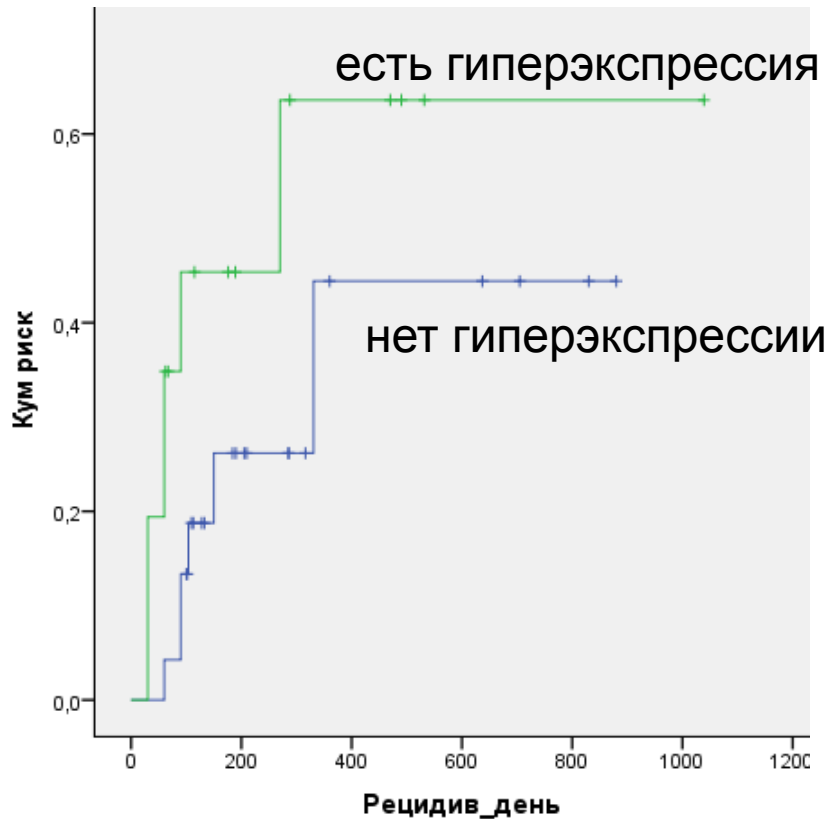
N=1

N=2

N=3

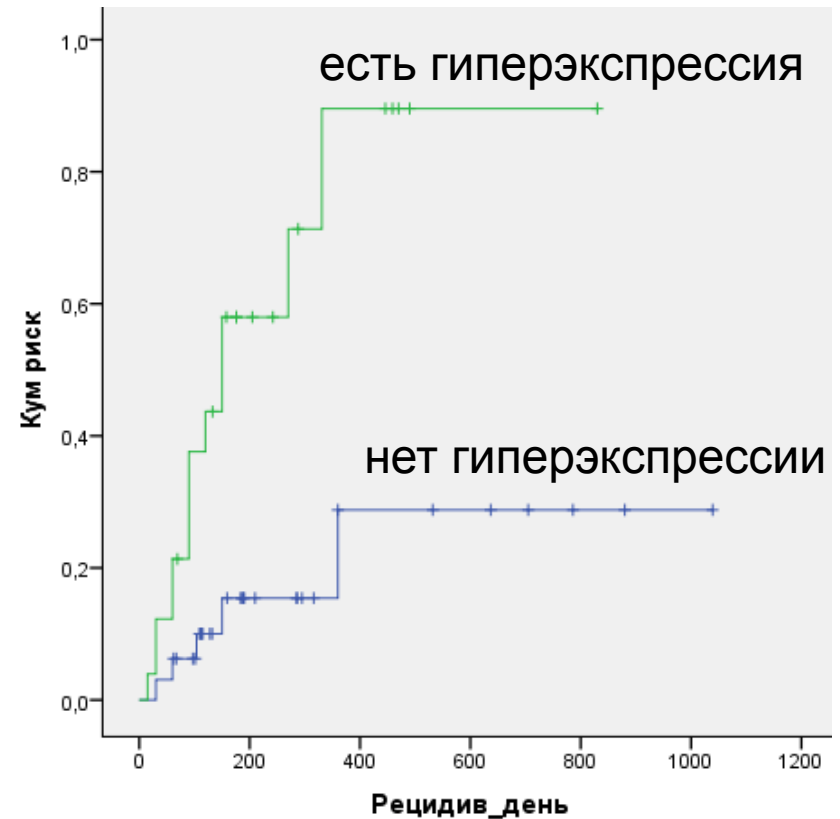
Исследование информативности экспрессионных маркеров для оценки риска развития рецидива ОМЛ

WT1 до ТКМ



P=0.18

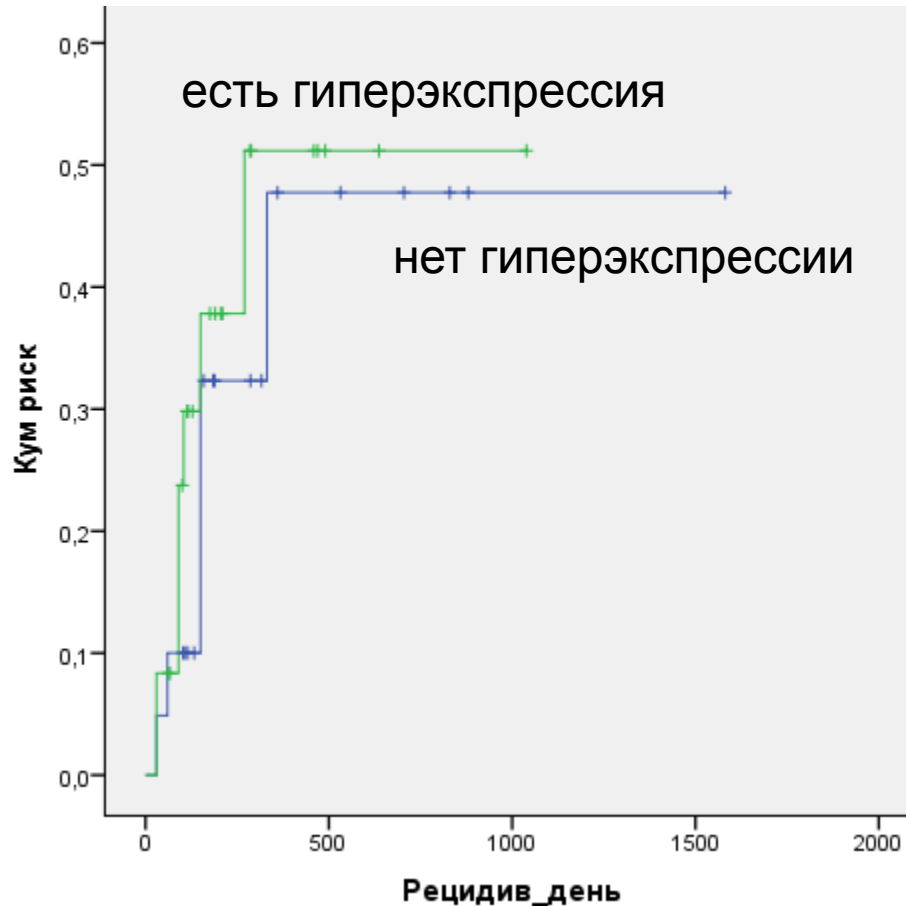
WT1 после ТКМ



P=0.009

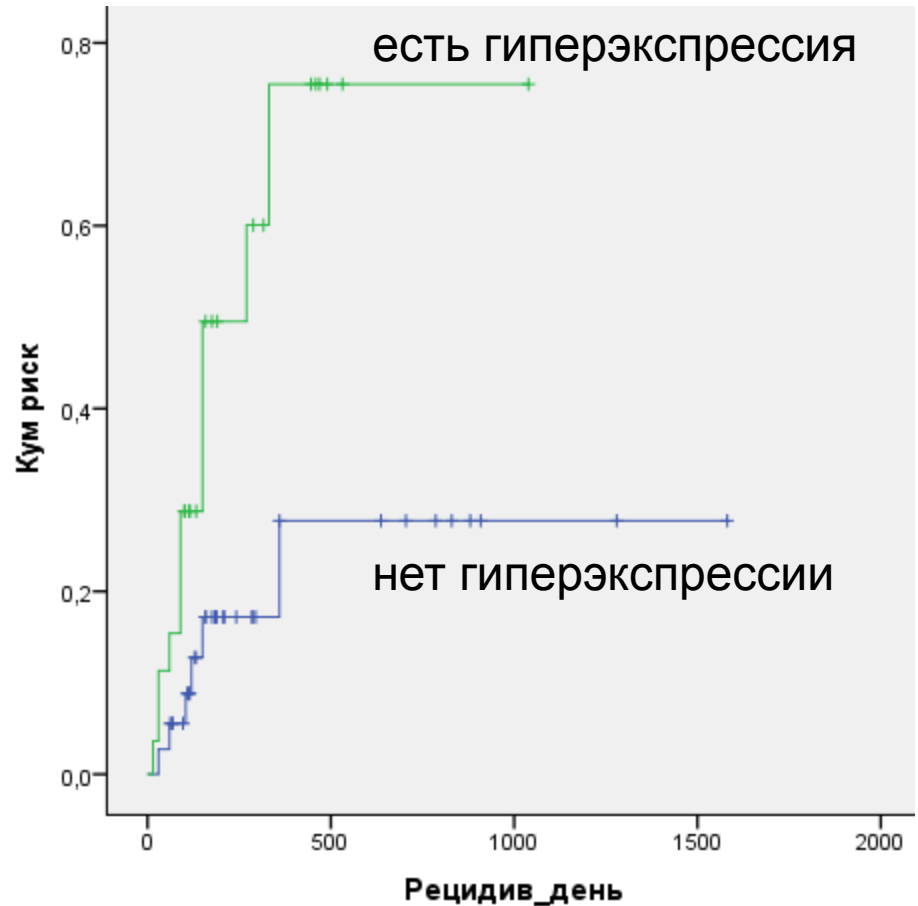
Исследование информативности экспрессионных маркеров для оценки риска развития рецидива ОМЛ

BAALC до ТКМ



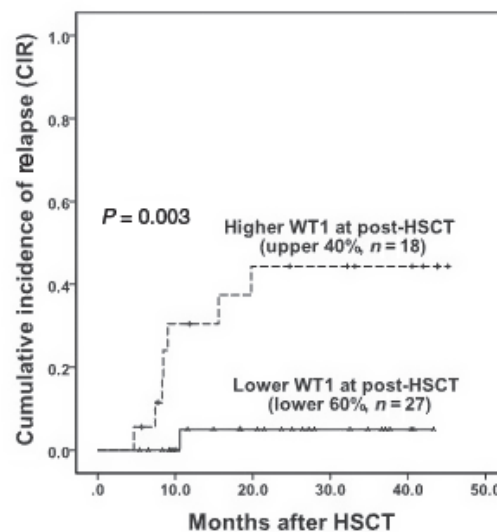
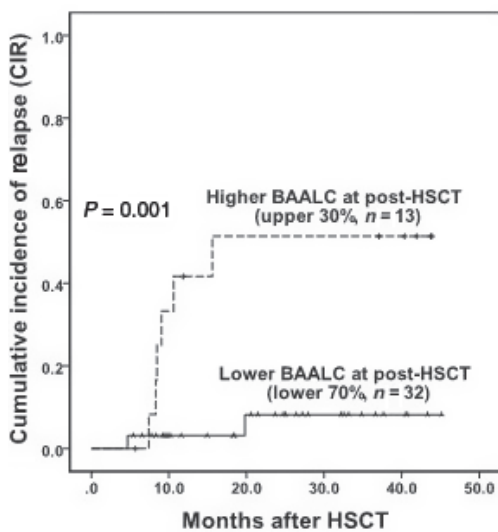
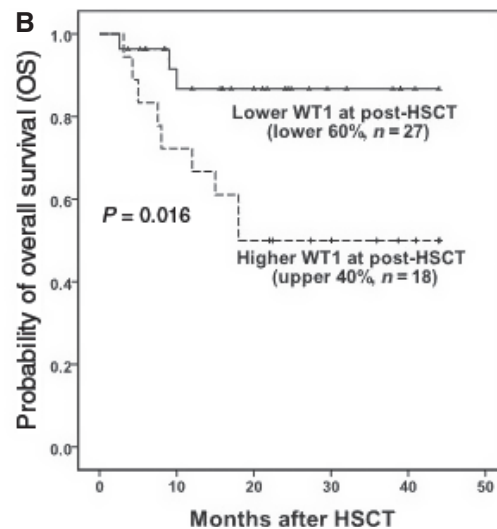
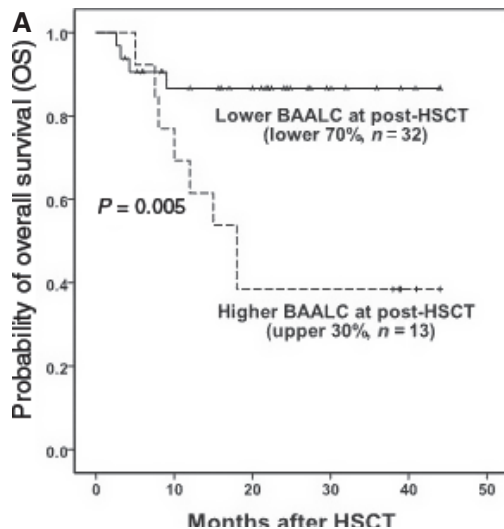
$p=0.57$

BAALC после ТКМ



$p=0.027$

Общая выживаемость и вероятность развития рецидива на фоне гиперэкспрессии генов WT1 и BAALC



Исследование значимости серийного мониторинга исследуемых генов для оценки риска развития рецидива ОМЛ

	Клинико-гематологический рецидив (Д+)	Дни до рецидива	Гиперэкспрессия EVI1 выявлена на Д+	Дни до рецидива	Гиперэкспрессия WT1 выявлена на Д+	Дни до рецидива	Гиперэкспрессия BAALC выявлена на Д+	Дни до рецидива	Гиперэкспрессия PRAME выявлена на Д+
Пациент 1	150			-105	45	0	150	0	150
Пациент 2	150						30	-30	120
Пациент 3	150	0	150	0	150	-60	30		
Пациент 4	30			0	30				
Пациент 5	90	30	120	-60	30	-60	30		
Пациент 6	30					0	30		
Пациент 7	90			60	150	-45	45		
Пациент 8	270	-120	150	-210	60	-120	150		
Пациент 9	30			0	30	0	30		
Пациент 10	150			120	270	0	150		
Пациент 11	90			0	90	0	90		
Пациент 12	60			-30	30				
Пациент 13	150								
Пациент 14	120			-90	30				
Пациент 15	15			0	15				

ВЫВОДЫ:



- Обнаружены достоверные различия в уровне базальной экспрессии генов WT1 и EVI1 ($p=0.023$ и $p=0.019$ соответственно) в периферической крови и костном мозге здоровых доноров;
- Определены пороговые значения для генов BAALC (15), WT1 (250), EVI1 (10) и PRAME (500) на основе экспрессии данных генов в костном мозге здоровых доноров;
- Согласно полученным данным наличие гиперэкспрессии любого из исследуемых генов до проведения ТКМ не влияет на течение посттрансплантационного периода при использовании миелоаблативного или немиелоаблативного режимов кондиционирования;
- Мониторинг МОБ с помощью экспрессионных маркеров WT1, BAALC и PRAME является достаточно информативным в сравнении с референтным методом исследования однако обладает более низкой чувствительностью в связи наличием базальной экспрессии этих генов;
- Наличие гиперэкспрессии генов WT1 ассоциировано со снижением общей выживаемости в посттрансплантационном периоде;
- Гены BAALC, WT1 и PRAME могут быть рекомендованы в качестве включения в панель экспрессионных маркеров рецидива ОМЛ после проведения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов с ОМЛ с нормальным кариотипом.

Лаборатория трансплантологии и молекулярной гематологии НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М.Горбачевой

Шакирова А.И.
Катерина В.А.
Тепляшина В.В.
Романюк Д.С.
Евдокимов А.
Лебединова Н.М.
Роор Р. А.
Попова П.И.



<https://sites.google.com/site/molhemat/>

Лаборатория трансплантологии и молекулярной гематологии НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М.Горбачевой

Шакирова А.И.
Катерина В.А.
Тепляшина В.В.
Романюк Д.С.
Евдокимов А.
Лебединова Н.М.
Роор Р. А.
Попова П.И.



<https://sites.google.com/site/molhemat/>

Спасибо за внимание!