

Aberracje cytogenetyczne długiego ramienia chromosomu 3 w nowotworach układu krwiotwórczego — opis trzech chorych

Cytogenetic rearrangements of the long arm of chromosome 3 in myeloid neoplasms — descriptions of three cases

Anna Ejduk¹, Barbara Nasiłowska-Adamska², Agnieszka Kołkowska-Leśniak¹, Katarzyna Borg³, Ilona Seferyńska¹, Kazimierz Hałaburda², Andrzej Szczepiński², Agnieszka Tomaszewska², Barbara Pieńkowska-Grela⁴, Ewa Lech-Marańda^{1, 5}, Krzysztof Warzocha¹

¹Klinika Hematologii

²Klinika Transplantacji Komórek Krwiotwórczych

³Pracownia Genetyki, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

⁴Zakład Patologii Nowotworów, Pracownia Genetyki, Centrum Onkologii — Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa

⁵Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Streszczenie

Aberracje długiego ramienia chromosomu 3 angażujące regiony 3q26 (gen *EVII*) i 3q21 (gen *RPN1*) opisywano u chorych na ostrą białaczkę szpikową (AML) *de novo*, AML wtórną do zespołu mielodysplastycznego (MDS), a także u pacjentów z MDS, kryzą blastyczną (BP) przewlekłej białaczki szpikowej (CML) oraz z innymi nowotworami mieloproliferacyjnymi (MPN). Powyższe aberracje genetyczne prowadzą do powstania genu fuzyjnego *RPN1-EVII*, który odgrywa istotną rolę w procesie leukemogenezy. W poniższej pracy zaprezentowano opis trzech przypadków chorych z rearanżacjami długiego ramienia chromosomu 3: pacjentkę z rozpoznaniem AML *de novo* i *t(3;3)*, u której mimo intensywnego leczenia i 2-krotnego allogenicznego przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych doszło do progresji choroby, oraz dwóch chorych z rozpoznaniem przewlekłych MPN. U jednego pacjenta z BP-CML w momencie rozpoznania do ewolucji klonalnej z pojawieniem się *t(3;3)* doszło w okresie progresji choroby po początkowo skutecznym leczeniu imatynibem. Mimo zastosowania terapii drugiej linii dazatynibem obserwowano progresję choroby z pojawieniem się pozaszpikowych nacieków białaczki. U drugiego pacjenta AML z *inv(3)* stwierdzono po okresie 10 lat od momentu rozpoznania nadpłytkowość samoistnej. Chorego poddano leczeniu indukującemu daunorubicyną i arabinozydem cytozyny, w wyniku którego uzyskano całkowitą remisję. Mimo początkowo skutecznego leczenia w trakcie dalszej obserwacji nastąpiła progresja choroby. Chory otrzymał kolejną reindukcję, jednak zmarł z powodu obustronnego zapalenia płuc przed uzyskaniem regeneracji hematopoezy. Powyższe obserwacje kliniczne potwierdzają, że wystąpienie aberracji długiego ramienia chromosomu 3 w przebiegu nowotworów układu krwiotwórczego jest czynnikiem predykcyjnym niekorzystnego przebiegu klinicznego choroby.

Hematologia 2013; 4, 3: 271–278

Słowa kluczowe: ostra białaczka szpikowa, przewlekła białaczka szpikowa, nadpłytkowość samoistna, aberracje cytogenetyczne chromosomu 3

Adres do korespondencji: Anna Ejduk, Klinika Hematologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel.: 22 34 96 334, faks: 22 34 96 335, e-mail: aejudk@onet.eu

Abstract

Aberrant rearrangements in the 3q26 and 3q21 regions on the long arm of chromosome 3 have been observed in many conditions, including de novo acute myeloid leukemia (AML), in AML with antecedent myelodysplastic syndrome (MDS), as well as in MDS itself, the blastic phase of chronic myelogenous leukemia (BP-CML) and also in other myeloproliferative neoplasms (MPN). Such cytogenetic aberrations lead to abnormal expression of the RPN1-EVII fusion gene transcripts which involve the ecotropic viral integration site-1 (EVI1) at 3q26 and ribophorin I (RPN1) at 3q21; these playing important roles in leukemogenesis and disease progression. Three case studies are presented of patients with the selfsame rearrangements on the long arm of chromosome 3. The first patient presented with de novo AML and t(3;3) (q21;q26) who, in spite of having double allogeneic hematopoietic stem cell transplantations, had fatal outcome. The other two patients had MPN. One was initially diagnosed with CML and whilst being treated with imatinib, the t(3;3) abnormality was nevertheless acquired even though at first the treatment had been effective. Despite subsequent second line treatment with dasatinab, the leukemia progressed with the appearance of extramedullary infiltration. The second patient developed AML with inv(3) after essential thrombocythemia had been diagnosed 10 years ago. At first, the patient went into complete remission following induction chemotherapy with daunorubicine and cytarabine. This therapy was however re-implemented, when disease progression had again occurred during further observation. The patient then unfortunately developed pneumonia and died before hematopoietic recovery. These clinical findings thus indicate that cytogenetic aberrations on the long arm of chromosome 3 predict a poor outcome in patients with myeloid neoplasms.

Hematologia 2013; 4, 3: 271–278

Key words: acute myeloid leukemia, chronic myelogenous leukemia, essential thrombocythemia, cytogenetic aberrations of chromosome 3

Wprowadzenie

Zaburzenia strukturalne dotyczące długiego ramienia chromosomu 3, takie jak inwersja chromosomu 3 [inv(3)(q21;q26)], insercja chromosomu 3 [ins(3)(q21;q25;q26)], homologiczna translokacja [t(3;3)(q21;q26)], jak również translokacje między regionem 3q26 i innymi chromosomami, takie jak na przykład t(3;21)(q26;q22), t(3;12)(q26;p13) oraz t(2;3)(q21;q26), opisano dotychczas u około 140 pacjentów z nowotworami mieloproliferacyjnymi (MPN, *myeloproliferative neoplasms*). Powyższe aberracje chromosomalne obserwowano we wszystkich podtypach ostrych białaczek szpikowych (AML, *acute myeloid leukemia*) według klasyfikacji FAB (*French–American–British*), w zespołach mielodysplastycznych (MDS, *myelodysplastic syndrome*), w fazie kryzy blastycznej (BP, *blast phase*) przewlekłej białaczki szpikowej (CML, *chronic myelogenous leukemia*) oraz w innych przewlekłych MPN [1–3].

Ostre białaczki szpikowe stanowią heterogenną grupę chorób różniących się morfologią komórek, przebiegiem klinicznym i rokowaniem. Od 2001 roku, w którym Światowa Organizacja Zdrowia

(WHO, *World Health Organization*) zaproponowała nowy podział AML uwzględniający występowanie zaburzeń cytogenetycznych i odpowiadających im genów fuzyjnych, zmiany w kariotypie stały się jednym z najważniejszych czynników prognostycznych wpływających na odpowiedź na leczenie indukujące i całkowite przeżycie (OS, *overall survival*) chorych. W klasyfikacji WHO zaktualizowanej w 2008 roku AML z inv(3)(q21;q26) lub t(3;3)(q21;q26) zostały wyodrębnione jako oddzielna podgrupa w kategorii ostrych białaczek z powtarzalnymi zmianami cytogenetycznymi [4, 5]. Powyższe dwie aberracje obejmują gen *EVI1* (*ecotropic viral integration site 1*) zlokalizowany w regionie 3q26 oraz gen *RPN1* (*ribophorin 1*) w regionie 3q21 i prowadzą do powstania genu fuzyjnego *RPN1-EVII* [4, 6–8].

Gen *EVI1* jest protoonkogenem kodującym białko o typie palca cynkowego, które — będąc aktywatorem transkrypcji — wiąże specyficzne sekwencje DNA i wpływa na wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe [6]. Niski poziom ekspresji genu *EVI1* jest spotykany w prawidłowych komórkach krwiotwórczych, natomiast u chorych na AML z aberracjami w regionie 3q26 wykazano znaczną nadekspresję tego genu. Wysoka ekspresja *EVI1*,

niezależnie od tego, czy jest związana ze zmianami z obrębie 3q26, czy też z obecnością alternatywnego transkryptu *EVII*, wiąże się z niekorzystnym rokowaniem [6–8].

Ostre białaczki szpikowe z *inv(3)* lub *t(3;3)* stanowią 2–3% wszystkich AML. Występują zwykle w starszej grupie wiekowej bez predylekcji do płci [3, 4, 6]. Aberracje 3q26 często stwierdza się w AML wtórnej do MDS. Zmianom tym często towarzyszą strukturalne lub ilościowe zaburzenia chromosomu 7 i 5 (–7/7q, 5/5q–), jak również złożony kariotyp [4]. Monosomia chromosomu 7 występuje u 50–66% chorych na AML z *inv(3)/t(3;3)* [4]. Chorzy z występującą dodatkową monosomią chromosomu 7 spełniają kryteria rozpoznania kariotypu monosomalnego i cechuje ich bardzo niekorzystne rokowanie. U 20% pacjentów z *inv(3)* można stwierdzić także *t(9;22)(q34;q11)* z obecnością genu fuzyjnego *BCR/ABL1* [9, 10]. U chorych z aberracją 3q26 najczęściej liczba płytek krwi (PLT, *platelets*) jest podwyższona. W badaniu szpiku stwierdza się cechy wieloliniowej dysplazji z obecnością atypowych megakariocytów i w różnym stopniu nasilone włóknienie podścieliska [4, 6, 9–18]. Komórki białaczkowe wykazują silną ekspresję antygenów charakterystycznych dla linii mieloidalnej (CD33, CD13, CD117), a także wczesnych markerów CD34 i HLA-DR. Często wykazują również koekspresję antygeny CD7, charakterystycznego dla linii limfoidalnej T komórkowej, oraz antygenów CD56, CD11c i MPO [19].

Chorych na AML z *inv(3)* lub *t(3;3)* charakteryzuje niekorzystny przebieg kliniczny z niskim odsetkiem uzyskiwanych całkowitych remisji (CR), tj. poniżej 50%, i z 5-letnim OS poniżej 10% [4, 10, 20–23]. W przypadku dostępnego dawcy decyzje o allogenicznym przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych (allo-HSCT, *allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*) są często podejmowane już w momencie uzyskania CR, po pierwszym leczeniu indukującym [24, 25]. Chorych nieposiadających dawcy rodzinnego powinno się kwalifikować do allo-HSCT od zgodnego dawcy niespokrewnionego. Należy jednak pamiętać, że u takich chorych odsetek wznów po allo-HSCT jest wyższy niż w grupie korzystnego i pośredniego ryzyka cytogenetycznego [24–28]. Rola autologicznego przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych (auto-HSCT, *autologous hematopoietic stem cell transplantation*) w tej grupie chorych jest ograniczona ze względu na wysokie ryzyko nawrotu choroby [29]. W odróżnieniu od chorych z grupy niskiego ryzyka cytogenetycznego, tj. z obecnością *t(8;21)* lub *inv(16)*, lub z prawidłowym kariotypem, nie wykazano w tej grupie chorych korzyści ze

stosowania dużych dawek arabinozydu cytozyny (Ara-C) w leczeniu konsolidującym [30].

Inne zrównoważone aberracje obejmujące regiony 3q26 i 3q21 występują rzadko u chorych na AML. Dwie z nich, tj. *t(1;3)(p36;q21)* i *t(3;21)(q26;q22)*, obecnie zalicza się do aberracji, na podstawie których można zidentyfikować chorych należących do grupy AML związanych z mielodysplazją według klasyfikacji WHO [31, 32]. Niektóre grupy badawcze stratyfikują wszystkich chorych z aberracjami 3q, niezależnie od ich rodzaju, do grupy wysokiego ryzyka cytogenetycznego. Jednak w aktualnych zaleceniach dotyczących rozpoznawania i leczenia AML tylko *inv(3)/t(3;3)* wymienia się jako aberracje związane z niekorzystnym rokowaniem. Znaczenie prognostyczne innych zrównoważonych i niezrównoważonych aberracji 3q jest w dalszym ciągu nierozstrzygnięte. Sprzeczne doniesienia dotyczące ich wartości prognostycznej wynikają z braku badań w dostatecznie dużych grupach chorych [4, 10, 20, 27, 28].

Aberracje polegające na *inv(3)* lub *t(3;3)* opisywano nie tylko u chorych na AML, ale również jako dodatkowe zaburzenie cytogenetyczne u pacjentów z MDS, BP-CML oraz innymi przewlekłymi MPN [2, 4, 6, 9, 11, 16]. Transformacja do fazy akceleracji (AP, *accelerated phase*) lub BP u chorych na CML jest związana z pojawieniem się wtórnych aberracji genetycznych w klonie *Philadelphia*-dodatnim (Ph+) [33–37]. Ocenia się, że ewolucja klonalna dotyczy 30% chorych w AP i 80% chorych w BP [38, 39]. W trakcie ewolucji klonalnej może się pojawić wiele różnych aberracji genetycznych dotyczących praktycznie wszystkich chromosomów. Najczęściej spotykane wtórne aberracje cytogenetyczne u chorych na CML to dodatkowy chromosom Ph, trisomia chromosomu 8 (+8) i 19 (+19), izochromosom 17 [i(17q)] [35–37]. Inne zmiany w kariotypie występują rzadziej. Wykazano, że translokacja w miejscu złamania chromosomu 3 przed ostatnim eksonem kodującym gen *EVII* (ekson12) może prowadzić do BP-CML [8, 40].

Ewolucja klonalna u chorych na CML jest zjawiskiem złożonym. Chorzy ci zwykle gorzej odpowiadają na leczenie inhibitorami kinazy tyrozynowych (TKI, *tyrosine kinase inhibitor*) drugiej generacji, jednak skuteczność terapii jest różna u poszczególnych osób i zależy od rodzaju aberracji genetycznych, jak również współwystępowania innych cech świadczących o progresji choroby [33, 41]. Obecność aberracji długiego ramienia chromosomu 3, podobnie jak u chorych na AML, koreluje z niekorzystnym rokowaniem i opornością na leczenie [1, 2, 9, 10]. W ostatnim czasie po

raz pierwszy opisano nową translokację t(3;12) (q21;p13) u chorego na CML, której obecność — podobnie jak inv(3)/t(3;3) — jest zapowiedzią szybkiej progresji choroby do AP i BP oraz wiąże się z wyjątkowo złym rokowaniem [1].

W chwili rozpoznania u chorych z nadpłytkowością samoistną (ET, *essential thrombocythaemia*) aberracje cytogenetyczne stwierdza się u około 5% z nich [42–46]. Najczęściej opisywane zmiany w chwili rozpoznania ET to +8, +9, del(20q) [43, 45, 46]. Żadna z aberracji nie jest jednak typowa dla ET, a zmiany mogą dotyczyć każdego chromosomu. U większości chorych, u których stwierdza się transformację ET do wtórnej mielofibrozy, obserwuje się obecność aberracji genetycznych już przy rozpoznaniu ET, a przebieg kliniczny mielofibrozy po transformacji z ET nie różni się do przebiegu klinicznego w pierwotnej mielofibrozie [43]. U chorych na ET z cechami progresji do AML aberracje pojawiają się w momencie transformacji blastycznej [43, 45]. Dane te wydają się niekompletne ze względu na fakt, że u większości pacjentów z ET nie ocenia się rutynowo kariotypu w chwili rozpoznania choroby. Większość dostępnych danych pochodzi od chorych, u których już stosowano leczenie cytotoksyczne bądź u których wystąpiła progresja do AML. Transformacja blastyczna jest zjawiskiem stosunkowo rzadkim i dotyczy 2–5% chorych na ET [46–48]. Na podstawie dużych badań nie potwierdzono leukemogennego wpływu takich leków, jak hydroksymocznik (HU, *hydroxyurea*) czy pipobroman stosowanych w monoterapii. Nie wykazano również leukemogennego wpływu trombareduktyny [43]. Dane z piśmiennictwa wskazują, że w fazie transformacji blastycznej ET występują takie aberracje, jak: t(1;7), t(1;17), t(8;21), der(9), add(14), t(1;9), del17(p). Opisywano również występowanie innych niespecyficznych zaburzeń cytogenetycznych [45, 46]. Dotychczas opublikowano tylko jedną pracę, w której opisano wystąpienie inv(3)(q21;q26) u chorego w okresie transformacji blastycznej ET [49].

Poniżej przedstawiono opisy trzech chorych, w tym z AML *de novo* oraz z kryzą blastyczną w przebiegu CML i ET, u których w trakcie diagnostyki i dalszej obserwacji klinicznej stwierdzono aberracje chromosomalne dotyczące długiego ramienia chromosomu 3.

Opisy przypadków

Przypadek 1.

Chora w wieku 42 lat została przyjęta do Kliniki Hematologii Instytutu Hematologii i Transfuzjo-

logii (IHT) w październiku 2004 roku w celu przeprowadzenia diagnostyki głębokiej niedokrwistości. W badaniach podmiotowym i przedmiotowym dominowały objawy związane z niedokrwistością. W morfologii krwi obwodowej stwierdzono stężenie hemoglobiny (Hb) 6,4 g/dl, 5,0 G/l krwinek białych (WBC, *white blood cells*), 312 G/l PLT, a w rozmazie krwinek białych — 61% blastów. Spośród innych odchyłeń w badaniach laboratoryjnych stwierdzono podwyższoną aktywność dehydrogenazy mleczowej (LDH, *lactate dehydrogenase*) — 467 U/l, a w badaniach obrazowych powiększenie śledziony (146 mm). W badaniu płynu mózgowo-rdzeniowego nie wykazano cech zajęcia ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Na podstawie oceny mielogramu (46% blastów), badań cytochemicznych i immunofenotypowych dokonano rozpoznania AML M2 według FAB/WHO. W badaniach molekularnych nie stwierdzono obecności transkryptów AML1/ETO t(8;21) ani CBFB/MYH11 inv(16). W ocenie kariotypu natomiast we wszystkich analizowanych komórkach stwierdzono obecność translokacji obejmującej dwie kopie chromosomu 3 t(3;3)(q21;q26), co stratyfikowało chorą do grupy wysokiego ryzyka cytogenetycznego.

Pierwszy cykl leczenia indukującego przeprowadzono według schematu DAF (60 mg/m² daunorubicyny przez 3 dni, 200 mg/m² Ara-C przez 7 dni, 25 mg/m² fludarabiny przez 5 dni), który pozwolił na uzyskanie częściowej remisji (PR, *partial response*) choroby (20% blastów w mielogramie). W drugim leczeniu indukującym zastosowano idarubicynę w dawce 10 mg/m² przez 3 dni, Ara-C w dawce 1 g/m² przez 5 dni i etopozyd w dawce 100 mg/m² przez 5 dni, uzyskując CR, a następnie zastosowano leczenie konsolidujące dużymi dawkami Ara-C (2 g/m² co 12 h w dniach 1., 3. i 5.). Chorą zakwalifikowano do procedury allo-HSCT od siostry w pełni zgodnej w układzie ludzkich antygenów leukocytarnych (HLA, *human leukocyte antigen*). Zabieg przeprowadzono 18 maja 2005 roku, po zakończeniu pierwszego cyklu konsolidującego, w rozpoczynającej się już wznowie choroby. Zastosowano kondycjonowanie według schematu Bu/Cy2 (busulfan w dawce 12,8 mg/kg mc./d. dożylnie [*i.v.*, *intravenous*] przez 4 dni, cyklofosfamid w dawce 60 mg/kg m.c./d. *i.v.* przez 2 dni), a w profilaktyce choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD, *graft versus host disease*) — cyklosporynę A (CyA) w dawce 3 mg/kg mc. od doby –1. oraz metotreksat (MTX, *methotrexate*) w dawce 15 mg/m² w +1. dobie i 10 mg/m² w +3., +6., +11. dobie. Chorej przetoczono 5 × 10⁶/kg mc. komórek CD34+. Z powodu

obecności t(3;3) (q21;q26) w badaniach cytogenetycznych w +40. dobie oraz w +70. dobie rozpoczęto odstawianie CyA w celu nasilenia reakcji przeszczep przeciw białaczce (GvL, *graft versus leukemia*). Podczas odstawiania leczenia immunosupresyjnego wystąpiła ostra skórno-wątrobową postać GvHD w II stopniu, wymagająca dodatkowego leczenia immunosupresyjnego. W dobie +80. włączono kortykosteroidy w dawce 1 mg/kg mc. z dobrym efektem. W trakcie zmniejszania dawki kortykosteroidów nie obserwowano nasilenia objawów GvHD. Leczenie immunosupresyjne odstawiono całkowicie w +140. dobie. W wyniku allo-HSCT uzyskano CR (hematologiczną i cytogenetyczną), potwierdzoną w +140. dobie.

Badania chimeryzmu wykonywano ilościową metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*), uwzględniając polimorfizm w zakresie 24 markerów. W +160. dobie w badaniach tych zaobserwowano utratę cech dawcy, a w +180. dobie stwierdzono wznowę AML, potwierdzoną w badaniach cytologicznym, immunofenotypowym i cytogenetycznym szpiku. Podjęto decyzję o przeprowadzeniu kolejnego allo-HSCT od drugiej w pełni zgodnej w układzie HLA siostry bez poprzedzającej próby leczenia reindukującego remisję. Procedurę przeprowadzono 30 listopada 2005 roku po kondycjonowaniu napromienianiem całego ciała (TBI, *total body irradiation*)/Cy (12 Gy w 6 frakcjach po 2 Gy, cyklofosfamid w dawce 60 mg/kg mc./d. *i.v.* przez 2 dni). W profilaktyce GvHD zastosowano CsA/MTX. Przetoczono $6,9 \times 10^6$ /kg mc. komórek CD34+. Regeneracja układu krwiotwórczego przebiegała z opóźnieniem. Po transplantacji wystąpiły objawy ostrej skórno-wątrobowej postaci GvHD w II stopniu. Chora otrzymywała kortykosteroidy i mykofenolan mofetilu z dobrym efektem. Dawki leków immunosupresyjnych szybko zmniejszono, aby nie tłumić reakcji GvL. Remisję choroby potwierdzono w badaniu cytogenetycznym wykonanym w +40. dobie. Chorą wypisano do domu w +78. dobie, w trakcie odstawiania leczenia immunosupresyjnego (otrzymywała tylko 20 mg/d. prednizonu).

Po transplantacjach kilkakrotnie obserwowano u chorej reaktywację zakażenia cytomegalowirusem (CMV, *Cytomegalovirus*), potwierdzane narastaniem liczby kopii CMV-DNA we krwi obwodowej. W związku z powyższym stosowano gancyklowir według standardowego schematu do uzyskania wyniku negatywnego. Kolejną hematologiczną i cytogenetyczną wznowę AML stwierdzono 3 miesiące po wykonaniu drugiego allo-HSCT. W związku ze stwierdzoną opornością

na leczenie cytostatyczne, w tym 2-krotne leczenie mieloablacyjne, nie podejmowano kolejnej próby reindukcji remisji. Leczenie ograniczono do postępowania objawowego. W celu kontroli narastającej leukocytozy stosowano doustnie HU i 6-merkaptopurynę. Chora zmarła 18 miesięcy po ustaleniu rozpoznania AML z powodu progresji choroby powikłanej wstrząsem septycznym i niewydolnością wielonarządową.

Przypadek 2.

Chory w wieku 53 lat został przyjęty do Kliniki Hematologii IHT w grudniu 2010 roku z podejrzeniem białaczki szpikowej. W momencie rozpoznania w morfologii krwi stwierdzono 152×10^9 /l WBC, niedokrwistość (stężenie Hb 8,0 g/dl) i małopłytkowość (liczba PLT 46 G/l) oraz przesunięcie w lewo w rozmazie krwinek białych z obecnością 23% komórek blastycznych. W badaniu ultrasonograficznym jamy brzusznej uwidoczono splenomegalię (200 mm) oraz powiększenie rozmiarów wątroby. W badaniu cytogenetycznym szpiku we wszystkich analizowanych metafazach wykazano obecność translokacji t(9;22)(q34;q11.2); zmianie tej towarzyszyła monosomia chromosomu 7 pary (46,XY, t(9;22)(q34;q11.2)[4]/45,sl,-7[11]). W trepanobiopsji stwierdzono nasilone włóknienie (+++). Ustalono rozpoznanie BP-CML i włączono leczenie imatynibem w dawce 600 mg/dobę, uzyskując całkowitą odpowiedź hematologiczną (CHR, *complete hematologic response*) po miesiącu leczenia TKI. Po 3 miesiącach terapii w kontrolnych badaniach genetycznych stwierdzono większą odpowiedź cytogenetyczną (MCyR, *major cytogenetic response*). Po 9 miesiącach uzyskano całkowitą remisję cytogenetyczną (CCyR, *complete cytogenetic remission*). Kontynuowano leczenie imatynibem w dawce 600 mg/dobę. W ocenie przeprowadzonej po 12 miesiącach terapii w badaniu kariotypu w 7 spośród 25 analizowanych metafaz obserwowano obecność translokacji t(9;22)(q34;q11.2) ze współwystępowaniem dodatkowych zmian w postaci translokacji t(3;3)(q21;q26) oraz monosomii chromosomu 7 pary (45,XY,t(3;3)(q21;q26),-7,t(9;22)(q34;q11.2)[7]/46,XY[18]. Równocześnie w ilościowym badaniu PCR obserwowano wzrost ilości transkryptu *BCR/ABL1* p210 do 94%. Chory pozostawał w CHR. Nie stwierdzono obecności mutacji w obrębie domeny kinazowej genu *BCR/ABL1*.

Chorego zakwalifikowano do leczenia TKI II generacji — dazatynibem w dawce 100 mg/dobę. Leczenie było nieskuteczne, gdyż po 3 miesiącach terapii stwierdzono progresję choroby do BP-CML. Jednocześnie w obrazie tomografii komputerowej,

wykonanej z powodu utrzymującego się suchego kaszlu, w prawym płucu stwierdzono guz wielkości $58 \times 77 \times 72$ mm. Chorego zakwalifikowano do biopsji wyżej wymienionej zmiany. W badaniu histopatologicznym stwierdzono obecność licznych komórek o morfologii blasta i immunofenotypie MPO+, CD34+ i CD7+, z towarzyszącymi licznymi makrofagami i pojedynczymi skupieniami nabłonków płucnych (CKAE1/AE3) z cechami atypii. Łącznie z cytometrycznie oznaczonym immunofenotypem komórek blastycznych obraz przemawiał za pozaszpikowym naciekiem AML w przebiegu BP-CML. Ze względu na ciężki stan ogólny chorego nie zakwalifikowano do intensywnej chemioterapii; włączono paliatywne leczenie cytoredukcyjne. Chory zmarł po 22 miesiącach od rozpoznania CML.

Przypadek 3.

Chory w wieku 58 lat został skierowany do Poradni Hematologicznej IHT w marcu 2001 roku z powodu nadpłytkowości (liczba PLT 897 G/l) w celu przeprowadzenia dalszej diagnostyki i leczenia. Na podstawie przeprowadzonych badań — histopatologii i badań cytogenetycznych szpiku kostnego — ustalono rozpoznanie ET. W związku z dynamicznie narastającą liczbą PLT pacjenta zakwalifikowano do leczenia za pomocą HU. Z powodu toksyczności pozahematologicznej HU w 2010 roku rozpoczęto leczenie tromboredukcyjną. Chory pozostawał pod obserwacją ambulatoryjną. W lipcu 2011 roku w badaniu morfologii krwi obserwowano leukopenię (liczba WBC 2,6 G/l), a z powodu spadku liczby PLT do 321 G/l początkowo zmniejszono dawkę, a następnie odstawiło tromboredukcyjną.

We wrześniu 2011 roku w wykonanej trepanobiopsji szpiku stwierdzono w połowie szpik o komórkowości odpowiedniej do wieku, a w połowie — szpik hipoplastyczny, ze zwiększoną liczbą komórek z ekspresją CD34+. W mielogramie odsetek komórek blastycznych wynosił 9,5%. W badaniu kariotypu uzyskano nieliczne metafazy; we wszystkich analizowanych metafazach (13/13) stwierdzono prawidłowy kariotyp męski. Chory pozostawał pod obserwacją ambulatoryjną, bez leczenia cytoredukcyjnego. W styczniu 2012 roku — w trakcie kolejnej oceny hematologicznej — odsetek komórek blastycznych w mielogramie wynosił 20,5%. Dokonano rozpoznania transformacji ET w AML i chorego zakwalifikowano do leczenia indukującego według schematu DA (daunorubicyna w dawce 60 mg/m^2 przez 3 dni, Ara-C w dawce 200 mg/m^2 przez 7 dni). Równocześnie rozpoczęto procedurę poszukiwania dawcy niespokrew-

nionego do allo-HSCT. W wyniku zastosowanej chemioterapii uzyskano CR. W marcu 2012 roku chory otrzymał pierwszy cykl konsolidujący według schematu HAM (Ara-C w dawce $1,5 \text{ g/m}^2$ w dniach 1.–3., mitoksantron w dawce 10 mg/m^2 w dniach 3.–5.). W okresie od maja 2012 roku do lipca 2012 roku, w trakcie oczekiwania na dobór dawcy do allo-HSCT, chory otrzymał dwa cykle leczenia konsolidującego dużymi dawkami Ara-C (3 g/m^2 co 12 h dniach 1., 3. i 5.).

W lutym 2013 roku — w trakcie wykonywania badań kontrolnych przed allo-HSCT — w mielogramie ponownie zaobserwowano wzrost odsetka komórek blastycznych do 16%. Jednocześnie w badaniu cytogenetycznym w 12 na 20 analizowanych metafaz stwierdzono obecność inwersji fragmentu q21q26 chromosomu 3 pary [inv(3)(q21; q26)] jako jedynej zmiany w kariotypie, zaś badanie techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* potwierdziło rearanżację genu *EVII* w 20% komórek. Chory otrzymał leczenie reindukujące remisję według schematu 10 mg/m^2 idarubicyny przez 3 dni, 1 g/m^2 Ara-C przez 5 dni i 100 mg/m^2 etopozyny przez 5 dni. W kontrolnym mielogramie, wykonanym po uzyskaniu regeneracji hematopoezy, odsetek komórek blastycznych wynosił 33,5%. Biorąc po uwagę dostępność w pełni zgodnego dawcy komórek macierzystych szpiku, podjęto decyzję o zastosowaniu wysokodawkowanej chemioterapii według schematu CLAG-M (kladrybina, Ara-C, mitoksantron, czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów [G-CSF, *granulocyte-colony stimulating factor*]) w celu zmniejszenia liczby komórek blastycznych przed planowanym allo-HSCT. Chemioterapię podano w kwietniu 2013 roku. W okresie agranulocytozy po chemioterapii u chorego rozwinęło się obustronne zapalenie płuc. Mimo stosowania antybiotyków o szerokim spektrum aktywności oraz profilaktyki przeciwgrzybiczej (pozakonazol) rozwinęła się niewydolność oddechowa. Chorego przeniesiono na oddział intensywnej terapii, gdzie mimo stosowanego leczenia zmarł z powodu niewydolności krążeniowo-oddechowej, bez uzyskania regeneracji hematopoezy.

Omówienie

W dostępnym piśmiennictwie jest niewiele publikacji dotyczących leczenia chorych na AML i z innymi MPN z towarzyszącymi aberracjami chromosomu 3. Dostępne dane wskazują na złe rokowanie, oporność na leczenie cytostatyczne i krótki OS w przypadku obecności inv(3)/t(3;3) [2–4, 9, 10]. Chociaż u opisaney chorej na AML

czas przeżycia był istotnie dłuższy niż to wynika z danych z piśmiennictwa i wynosił 1,5 roku od rozpoznania białaczki, to należy stwierdzić, że od samego początku choroba miała charakter progresywny, cechujący się opornością na stosowane leczenie. Pierwszą CR uzyskano dopiero po drugiej, alternatywnej chemioterapii indukującej remisję. Nawrót choroby nastąpił jeszcze w czasie leczenia konsolidującego remisję. Kolejne okresy remisji były krótkie i wynosiły odpowiednio 6 miesięcy po pierwszej allo-HSCT i 3 miesiące po drugiej allo-HSCT. Obserwacje te potwierdzają niekorzystny przebieg kliniczny AML z t(3;3)(q21;q26), niezależnie od rodzaju stosowanej chemioterapii indukującej (DAF, idarubicyna + Ara-C + etopozyd), leczenia mieloablacyjnego (Bu/Cy2, TBI/Cy) i reakcji immunologicznej GvL. Wskazuje to na potrzebę poszukiwania nowych opcji terapeutycznych dla tej grupy pacjentów z AML.

W piśmiennictwie istnieją pojedyncze doniesienia o występowaniu aberracji długiego ramienia chromosomu 3 u chorych z rozpoznaniem BP-CML [33, 35–37]. W przypadku drugiego prezentowanego chorego w momencie ustalania rozpoznania CML oprócz translokacji t(9;22) w badaniu kariotypu stwierdzono obecność monosomii chromosomu 7 w klonie Ph+. Obecność tej aberracji odgrywa istotną rolę w transformacji fazy przewlekłej CML do BP i jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym [41]. Mimo uzyskania CCyR po wstępnym leczeniu imatynibem u chorego doszło do dalszej ewolucji klonalnej z pojawieniem się t(3;3). Monosomia chromosomu 7 jest często opisywana jako dodatkowa aberracja cytogenetyczna u chorych z aberracjami długiego ramienia chromosomu 3. Współwystępowanie tych zmian jest czynnikiem predykcyjnym bardzo niekorzystnego rokowania [4]. Podobnie było u opisanego pacjenta; pojawienie się nowych zmian w klonie Ph+ doprowadziło nie tylko do utraty odpowiedzi cytogenetycznej, ale także do dalszej progresji choroby z obecnością pozaszpikowego nacieku białaczkowego w płucach mimo zmiany leczenia na TKI drugiej generacji. W ocenie immunofenotypowej antygenów na powierzchni komórek białaczkowych oprócz antygenów mieloidalnych — typowych dla AML — stwierdzono koekspresję antygeny linii T-komórkowej (CD7), co jest zgodne z profilem antygenowym opisywanym w przypadku zaburzeń 3q.

W dostępnym piśmiennictwie opisano, jak dotąd, tylko jeden przypadek inv(3) u chorego z rozpoznaniem ET w okresie transformacji blastycznej do AML [49]. U chorego inv(3) pojawiła się w okresie transformacji ET, po 10 latach od roz-

poznania (kariotyp był w tym czasie prawidłowy). Leczenie indukujące według schematu DA pozwoliło na uzyskanie CR, jednak chory zmarł w wyniku powikłań infekcyjnych po kolejnym cyklu leczenia konsolidującego. W prezentowanym przez autorów przypadku w początkowym okresie transformacji choroby badanie cytogenetyczne wykazało prawidłowy kariotyp męski. Chorego poddano leczeniu indukującemu według schematu DA, w wyniku którego uzyskano CR, a następnie zastosowano dwa cykle leczenia konsolidującego. Ewolucja klonalna z pojawieniem się inv(3) doprowadziła do dalszej progresji choroby, a zastosowane w tym czasie leczenie cytoredukcyjne było nieskuteczne.

Opisane przez autorów przypadki potwierdzają niekorzystne znaczenie prognostyczne wystąpienia aberracji cytogenetycznych w obrębie długiego ramienia chromosomu 3 u chorych na MPN. Nieskuteczność procedury allo-HSCT wraz z GvL w eradykacji klonu białaczkowego w przebiegu AML *de novo*, a także wystąpienie tych anomalii w okresie transformacji blastycznej przewlekłych MPN może świadczyć o dużym potencjale proliferacyjnym klonów nowotworowych powstałych w mechanizmie długo trwającej wcześniejszej presji selekcyjnej. Bez względu na rodzaj MPN chorzy ci powinni być kandydatami do uzupełniających terapii eksperymentalnych przed procedurą allo-HSCT lub po jej zastosowaniu.

Piśmiennictwo

1. Bennour A., Tabka I., Ben Youssef Y. i wsp. A novel t(3;12)(q21;p13) translocation in a patient with accelerated chronic myeloid leukemia after imatinib and nilotinib therapy. *Cancer Biol. Med.* 2013; 10: 47–51.
2. Fonatasch C., Gudat H., Lengfelder E. i wsp. Correlation of cytogenetic findings with clinical features in 18 patients with inv(3)(q21;q26) or t(3;3)(q21;q26). *Leukemia* 1994; 8: 1318–1326.
3. Horsman D.E., Gascoyne R.D., Barnett M.J. Acute leukemia with structural rearrangements of chromosome 3. *Leuk. Lymphoma* 1995; 16: 369–377.
4. Lugthart S., Gröschel S., Beverloo H.B. i wsp. Clinical, molecular, and prognostic significance of WHO type inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2) and various other 3q abnormalities in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: 3890–3898.
5. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. i wsp. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC Press, Lyon 2008.
6. Shearer B.M., Sukov W.R., Flynn H.C. i wsp. Development of a dual-color, double fusion FISH assay to detect RPN1/EVI1 gene fusion associated with inv(3), t(3;3), and ins(3;3) in patients with myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Am. J. Hematol.* 2010; 85: 569–574.
7. Ohyashiki K., Ohyashiki J.H., Fujieda H. i wsp. EVI1 expression associated with a 3q26 anomaly in a leukemia cell line derived from the blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1994; 8: 2169–2173.

8. Piątkowska-Jakubas B., Skotnicki A. Czynniki prognostyczne w ostrej białaczce szpikowej. *Acta Hematol. Pol.* 2010; 41: 381–393.
9. Shi G., Weh H.J., Duhrsen U. i wsp. Chromosomal abnormality inv(3)(q21q26) associated with multilineage hematopoietic progenitor cells in hematopoietic malignancies. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1997; 96: 58–63.
10. Charrin C., Belhabri A., Treille-Ritouet D. i wsp. Structural rearrangements of chromosome 3 in 57 patients with acute myeloid leukemia: clinical, hematological and cytogenetic features. *Hematol. J.* 2002; 3: 21–31.
11. Cui W., Sun J., Cotta C.V., Medeiros L.J., Lin P. Myelodysplastic syndrome with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2) has a high risk for progression to acute myeloid leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 2011; 136: 282–288.
12. Schoch C., Heferlach T., Hasse D. i wsp. Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: study of 90 patients. *Br. J. Haematol.* 2001; 112: 118–126.
13. Visani G., Bernasconi P., Boni M. i wsp. The prognostic value of cytogenetics in reinforced by the kind of induction/consolidation therapy in influencing the outcome of acute myeloid leukemia — analysis of 848 patients. *Leukemia* 2001; 15: 903–909.
14. Huret J.L. inv(3)(q21q26), t(3;3)(q21;q26), ins(3;3)(q26;q21q26). *Atlas Genet. Cytogenet.*: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Anomalies/inv3.html>
15. Grigg A.P., Gascoyne R.D., Phillips G.L. i wsp. Clinical, haematological and cytogenetic features in 24 patients with structural rearrangements of the Q arm of chromosome 3. *Br. J. Haematol.* 1993; 83: 158–165.
16. Madahar C.J., Levin M., Roy J. i wsp. Translocation (3;3) in a patient with thrombocytopenia and erythroid dysplasia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1996; 87: 11–13.
17. Jenkins R.B., Tefferi A., Solberg L.A. Jr i wsp. Acute leukemia with abnormal thrombopoiesis and inversion of chromosome 3. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1989; 39: 167–179.
18. Jotterand Bellomo M., Parlier V., Muhlematter D. i wsp. Three new cases of chromosome 3 rearrangement in bands q21 and q26 with abnormal thrombopoiesis bring further evidence to the existence of a 3q21q26 syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1992; 59: 138–160.
19. Medeiros B.C., Kohrt H.E., Arber D.A. i wsp. Immunophenotypic features of acute myeloid leukemia with inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2). *Leuk. Res.* 2010; 34: 594–597.
20. Testoni N., Borsaru G., Martinelli G. i wsp. 3q21 and 3q26 cytogenetic abnormalities in acute myeloblastic leukemia: biological and clinical features. *Hematologica* 1999; 84: 690–694.
21. Byrd J.C., Mrózek K., Dodge R.K. i wsp. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALBG 8461). *Blood* 2002; 100: 4325–4336.
22. Slovak M.L., Kopecky K.J., Cassileth P.A. i wsp. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000; 96: 4075–4083.
23. Grimwade D., Hills R.K., Moorman A.V. i wsp. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the UK Medical Research Council trials. *Blood* 2010; 116: 354–365.
24. Cornelissen J.J., Löwenberg B. Role of allogeneic stem cell transplantation in current treatment of acute myeloid leukemia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2005: 151–155.
25. Drobyski W.R. The role of allogeneic transplantation in high-risk acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 2004; 18: 1565–1568.
26. Visani G., Bernasconi P., Boni M. i wsp. The prognostic value of cytogenetics in reinforced by the kind of induction/consolidation therapy in influencing the outcome of acute myeloid leukemia — analysis of 848 patients. *Leukemia* 2001; 15: 903–909.
27. Jenkins R.B., Tefferi A., Solberg L.A. Jr i wsp. Acute leukemia with abnormal thrombopoiesis and inversion of chromosome 3. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1989; 39: 167–179.
28. Reiter E., Grenix H., Rabitsch W. i wsp. Low curative potential of bone marrow transplantation for highly aggressive acute myelogenous leukemia with inversion inv(3)(q21q26) or homologous translocation t(3;3)(q21;q26). *Ann. Hematol.* 2000; 79: 374–377.
29. Weisser M., Haferlach C., Haferlach T. i wsp. Advanced age and high initial WBC influence the outcome of inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) positive AML. *Leuk. Lymphoma* 2007; 48: 2145–2151.
30. Linker C.A. Autologous stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2003; 31: 731–738.
31. Braess J., Jahns-Streubel C., Schoch D. i wsp. Proliferative activity of leukaemic blasts and cytosine arabinoside pharmacodynamics are associated with cytogenetically defined prognostic subgroups in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2001; 113: 975–982.
32. Lahortiga I., Agirre X., Belloni E. i wsp. Molecular characterization of a t(1;3)(p36;q21) in a patient with MDS. MEL 1 is widely expressed in normal tissues, including bone marrow, and it is not overexpressed in the t(1;3) cells. *Oncogene* 2004; 23: 311–316.
33. Rubbin C.M., Larson R.A., Anastasi J. i wsp. t(3;21)(q26;q22): a recurring chromosomal abnormality in therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia. *Blood* 1990; 76: 2594–2598.
34. Verma D., Kantarjian H., Shan J. i wsp. Survival outcomes for clonal evolution in chronic myeloid leukemia patients on second generation tyrosine kinase inhibitor therapy. *Cancer* 2010; 1: 2673–2681.
35. Anastasi J., Feng J., Le Beau M.M. i wsp. The relationship between secondary chromosomal abnormalities and blast transformation in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 1995; 9: 628–633.
36. Cortes J., O'Dwyer M.E. Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2004; 18: 671–684.
37. Fabarius A., Haferlach C., Muller M.C. i wsp. Dynamics of cytogenetic aberrations in Philadelphia chromosome positive and negative hematopoiesis during dasatinib therapy of chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure. *Haematologica* 2007; 92: 834–837.
38. Bennour A., Tabaka I., Youssef Y.B. i wsp. A novel t(3;12)(q21;p13) translocation in a patient with accelerated chronic myeloid leukemia after imatinib and nilotinib therapy. *Cancer Biol. Med.* 2013; 10: 47–51.
39. Cortes J., Talpaz M., Giles F. i wsp. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood* 2003; 101: 3794–3800.
40. Cortes J., O'Dwyer M.E. Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2004; 18: 671–684.
41. Syzykawa K., Taki T., Abe T. i wsp. Identification of translocational breakpoint within the intron region before the last coding exon (exon12) of theEVI 1 gene in two cases of CML-BC with inv(3)(q21q26). *Genomics* 1997; 42: 356–360.
42. Radich J.P. The biology of CML blast crisis. *Hematology* 2007; 1: 384–391.
43. Panani A.D. Cytogenetic findings in untreated patient with essential thrombocythemia. *In vivo* 2006; 20: 381–384.
44. Sever M., Kantarjian H., Pierce S. i wsp. Cytogenetic abnormalities in essential thrombocythemia at presentation and transformation. *Int. J. Hematol.* 2009; 90: 522–525.
45. Gangat N., Tefferi A., Thanarajasingam G. i wsp. Cytogenetic abnormalities in essential thrombocythemia: prevalence and prognostic significance. *Eur. J. Haematol.* 2009; 83: 17–21.
46. Bench A.J., Pahl H.L. Chromosomal abnormalities and molecular markers in myeloproliferative disorders. *Semin. Hematol.* 2005; 42: 196–205.
47. Hirose Y., Masaki Y., Sugai S. Leukemic transformation with trisomy 8 in essential thrombocythemia: a report of four cases. *Eur. J. Haematol.* 2002; 68: 112–116.
48. Paolini R., Bonaldi L., Bianchini E. i wsp. Spontaneous evolution of essential thrombocythemia into acute megakaryoblastic leukemia with trisomy 8, trisomy 21 and cutaneous involvement. *Eur. J. Haematol.* 2003; 71: 466–469.
49. Talavera M.T., Sordo M., Gracia-Sagredo J.M. i wsp. Association of inv(3)(q21q26) with essential thrombocythemia in transformation. Letter to editor. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2008; 184: 122–123.