

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)**Acta Haematologica Polonica**journal homepage: [www.elsevier.com/locate/achaem](http://www.elsevier.com/locate/achaem)**Kazuistyka/Case report**

# Długotrwała odpowiedź na leczenie azacytydyną pacjentki z ostrą białaczką szpikową z niekorzystnym profilem cytogenetycznym – prezentacja przypadku



## Long-term response to azacitidine treatment in female with acute myeloid leukaemia and adverse cytogenetics – Case report

**Kamila Kruczkowska-Tarantowicz<sup>\*</sup>, Klaudia Grądzka, Marzenna B. Klimiuk, Izabela Łapuć, Janusz Kłoczko**

Klinika Hematologii z Pododdziałem Chorób Naczyń, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Kierownik: prof. dr hab. Janusz Kłoczko, Białystok, Poland

**INFORMACJE O ARTYKULE****Historia artykułu:**

Otrzymano: 03.01.2014

Zaakceptowano: 10.01.2014

Dostępne online: 21.01.2014

**Słowa kluczowe:**

- ostra białaczka szpikowa
- azacytydyna
- double minutes
- metylacja DNA
- epigenetyka

**Keywords:**

- Acute myeloid leukemia
- Azacitidine
- Double minutes
- DNA methylation
- Epigenetics

**A B S T R A C T**

Acute myeloid leukemia (AML) is the most common type of leukaemia found in adults and the number of disease cases increases with age. Despite the advances in the AML treatment, the results in patients over the age of 60 remain unsatisfactory.

In this study we present the case of a 73-year-old female patient with an unfavourable cytogenetic profile, in whom we observe long-term response to azacitidine, after previous failures of classic polychemotherapy.

In February 2010, a 70-year-old patient was admitted to the Department of Haematology USK in Białystok on suspicion of AML. The patient was qualified for intensive chemotherapy regimen of daunorubicin (DNR) and cytarabine (Ara-C).

Cytogenetic examination revealed the presence of double minutes – acentric fragments of extrachromosomal DNA, which is associated with resistance to standard chemotherapy. Induction chemotherapy was complicated by febrile neutropenia, pneumonia and episodes of atrial fibrillation. Due to the lack of remission and severe after-induction period, a brief reinduction chemotherapy with DNR and Ara-C was applied to obtain complete remission with incomplete regeneration (CRI).

Due to the recurrence in October 2010, reinduction chemotherapy was given followed by two cycles of maintenance chemotherapy. After another relapse in February 2011 (23,6% blasts in the bone marrow), a chemotherapy regimen designed for refractory and relapsed leukaemia was given, without any effect. In April 2011, the patient began azacitidine treatment. By the end of March 2013, the patient received twenty-one treatment cycles. The twelfth cycle of chemotherapy was complicated by pulmonary embolism which was treated successfully. The complete blood count remains at normal values.

<sup>\*</sup> Adres do korespondencji: Klinika Hematologii z Pododdziałem Chorób Naczyń ul. M. Skłodowskiej-Curie 24A 15-276 Białystok, Polska. Tel.: +48 85 746 86 03; fax: +48 85 744 70 26.

Adres email: [kruczkowska.k@gmail.com](mailto:kruczkowska.k@gmail.com) (K. Kruczkowska-Tarantowicz).

Recent reports indicate a clear relationship processes such as epigenetic regulation of DNA methylation with leukaemogenesis. The use of hypomethylating drugs in AML is yielding promising results.

© 2014 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

## Wstęp

Ostra białaczka szpikowa (AML) jest najczęstszą postacią białaczek u dorosłych, a liczba zachorowań wzrasta z wiekiem [1]. Wyniki leczenia u pacjentów > 60. rż. są znamienne gorsze, głównie z powodu częstszego występowania niekorzystnych zaburzeń cytogenetycznych i molekularnych, zwiększonej ekspresji białek, oporności wielolekowej (MDR1; *multidrug resistance*) oraz obecności schorzeń współistniejących, uniemożliwiających zastosowanie wysokodawkowanej chemioterapii [2]. Prezentowany opis przypadku dotyczy 73-letniej pacjentki, u której obserwujemy długotrwałą odpowiedź na leczenie inhibitorem metylotransferazy DNA – azacytydyną, po wcześniejszych niepowodzeniach konwencjonalnej polichemioterapii.

## Opis przypadku

70-letnia pacjentka z wywiadem nadciśnienia tętniczego, niedoczynności tarczycy, przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, została przyjęta do Kliniki Hematologii USK w Białymstoku w lutym 2010 r. W chwili przyjęcia zgłaszała narastające od miesiąca uczucie ogólnego osłabienia, upośledzoną tolerancję wysiłku fizycznego oraz kołatanie serca od dnia poprzedzającego hospitalizację. Badaniem przedmiotowym z odchylen od normy stwierdzono całkowicie niemierną czynność serca, nad polami płucnymi pojedyncze świsty oraz bliznę w powłokach brzucha po appendektomii i laparoskopowej cholecystektomii. Analizy laboratoryjne wykazały: WBC (*white blood cells*; leukocyty) 16 800/ $\mu$ l, w tym 41% komórek blastycznych w rozmazie manualnym, ANC (*absolute neutrophil count*; bezwzględna liczba neutrofilii) 5880/ $\mu$ l, Hgb (*haemoglobin*; hemoglobina) 11,3 g/dl, Hct (*haematocrit*; hematokryt) 37,2%, PLT (*platelets*; płytki krwi) 84 tys/ $\mu$ l, LDH (*lactate dehydrogenase*; dehydrogenaza mleczanowa) 212 IU/ml (n 200–400), PT (*prothrombin time*; czas protrombinowy) 13,3 sek, APTT (*activated partial thromboplastin time*; czas częściowej tromboplastyny po aktywacji) 28 sek, fibrynogen 390 mg/dl, D-dimer 0,73  $\mu$ g/ml, CRP (*C-reactive protein*; białko C-reaktywne) 3 mg/l. W EKG potwierdzono migotanie przedsionków (AF) o częstości ok. 120/min, RR 90/70 mmHg. Przekłatkowe badanie echokardiograficzne potwierdziło migotanie przedsionków. Frakcję wyrzutową serca oceniono na 60%, przy prawidłowo zachowanej funkcji skurczowej lewej komory. Wymiar lewego przedsionka (LA) wyniósł 4 cm, co stanowi niezależny czynnik ryzyka wystąpienia kolejnego epizodu AF. Konsultujący kardiolog zalecił dożylną infuzję propafenonu, zwiększenie dawki beta-blokera oraz kontrolę i suplementację elektrolitów. Z uwagi na brak poprawy wykonano echokardiografię przezprzełykową (TEE) – nie stwierdzono skrzepliny w uszku lewego przedsionka,

utrzymano terapeutyczną dawkę heparyny drobnocząsteczkowej. Zabieg kardiowersji elektrycznej nie przyniósł efektu, a chora nie wyraziła zgody na następny. Wdrożono leczenie antyarytmiczne propafenonem. W trzeciej dobie hospitalizacji powrócił miarowy rytm zatokowy. Spirometria wykazała zaburzenia wentylacji o typie obturacji umiarkowanego stopnia (FEV1 68%) – zgodnie z zaleceniem alergologa zastosowano wziewny cholinolityk.

Uzyskany aspirat szpiku był bogatokomórkowy, z podwyższonym odsetkiem promielocytów, obecnością 32,2% komórek blastycznych o fenotypie CD33+, CD64+, CD117+, HLA-DR+, CD34 ujemne. Ponadto, w barwieniach cytoenzymatycznych aktywność peroksydazy była silnie dodatnia, aktywność nieswoistej esteraazy śladowa/ujemna, reakcja PAS ujemna. Rozpoznano ostrą białaczkę szpikową AML (M2). Analiza cytogenetyczna wykazała wyłączną obecność metafaz hiperdiploidalnych, niosących nielosowe zmiany kariotypowe. W większości z nich ujawniła się trisomia chromosomu 6 oraz dodatkowy niezidentyfikowany chromosom. We wszystkich zmienionych metafazach obecne były *double minutes* (dmin) w liczbie 4–34 kopii, co wiąże się z możliwością wystąpienia oporności na klasyczną chemioterapię, zwłaszcza w przypadku amplifikacji genu MYC. Kariotyp scharakteryzowano jako 47~48,XX, +6, +mar, 9~34 dmin{6}/46,XX, 4~10 dmin {5}/46,XX {1} i uzupełniono o badanie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Badanie FISH przy użyciu sondy 8q24 potwierdziło obecność amplifikacji genu MYC w 76% komórek. Przed rozpoczęciem leczenia stan ogólny chorej oceniono na stopień 2. wg skali WHO (*World Health Organization*). Pacjentkę zakwalifikowano do intensywnej chemioterapii z daunorubicyną (DNR) i cytarabiną (Ara-C), (DNR 45 mg/m<sup>2</sup> *iv* w dniach 1.–3., Ara-C 100 mg/m<sup>2</sup> *ci* w dniach 1.–7.). Cykl indukujący powikłany był gorączką neutropeniczną, zapaleniem płuc oraz napadami AF.

Morfologia krwi obwodowej wykonana po czterech tygodniach od początku indukcji spełniała kryteria remisji hematologicznej. Odsetek blastów w aspiracie średniobogatomórkowego szpiku wyniósł 8%. Z uwagi na powikłany okres poindukcyjny podjęto decyzję o włączeniu leczenia wg skróconego schematu – DNR 45 mg/m<sup>2</sup> *iv* w dniach 1.–2., Ara-C 100 mg/m<sup>2</sup> *ci* w dniach 1.–5. Ze względu na liczne epizody arytmii nadkomorowej zastosowano deksrazoksan. Po kuracji powikłanej neutropenią i epizodami AF pacjentka uzyskała CRi (1,2% blastów w szpiku), przy następujących parametrach morfologii krwi obwodowej: WBC 5 670/ $\mu$ l, Hgb 8,9 g/dl, PLT 97 tys/ $\mu$ l. Chora nie wyraziła wówczas zgody na dalsze, tak intensywne leczenie. Jako kontynuację otrzymała trzy cykle z użyciem małych dawek Ara-C 50 mg *sc* w dniach 1.–10., w 6-tygodniowych odstępach, z dobrą tolerancją. W październiku 2010 r. przy prawidłowych wartościach morfologii krwi i braku odchylen w rozmazie mikroskopowym stwierdzono wznowę choroby (10% komórek blastycznych w aspiracie szpiku). Powtórzono cykl reindukujący (DNR 45 mg/m<sup>2</sup>

iv w dniach 1.–2., Ara-C 100 mg/m<sup>2</sup> ci w dniach 1.–5.), po którym uzyskano CR, następnie podano dwa cykle podtrzymujące remisję (I cykl DNR 30 mg/m<sup>2</sup> iv w dniach 1.–2., Ara-C 100 mg/m<sup>2</sup> sc w dniach 1.–5., II cykl 6-tioguanina 100 mg/m<sup>2</sup> co 12 godzin po w dniach 1.–5., Ara-C 100 mg/m<sup>2</sup> sc w dniach 1.–5.), bez istotnych powikłań. W lutym 2011 r., z powodu kolejnej wznowy (23,6% blastów w szpiku), pacjentkę reindukowano wg schematu przeznaczonego do leczenia opornych i nawrotowych białaczek (Ara-C 2,0 g/m<sup>2</sup> iv d. 1.–3., kladrybina 5 mg/m<sup>2</sup> iv d. 1.–3., GCS-F 300 µg sc d. 1.–3.), bez efektu. Kontrolna biopsja aspiracyjna szpiku kostnego wykazała obecność 22,2% komórek blastycznych. Podjęto decyzję leczenia inhibitorem metylotransferazy DNA (DNMTi; DNA methyltransferase inhibitor) – azacytydyną. Po uzyskaniu zgody Narodowego Funduszu Zdrowia w kwietniu 2011 r. rozpoczęto terapię wg schematu azacytydyna w dawce 75 mg/m<sup>2</sup> sc przez 7 kolejnych dni, co 28 dni. Po kolejnych kursach leczenia obserwowano przejściową neutropenię (stopień 2. wg WHO) oraz małopłytkowość (stopień 3. wg WHO), co wiązało się z koniecznością okresowej modyfikacji dawki heparyny drobnocząsteczkowej. W lipcu 2011 r. po trzech cyklach terapii odsetek blastów w aspiracie szpiku wynosił 4,2%. Morfologia krwi obwodowej wykazała: WBC 2760/µl, ANC 2 014/µl, Hgb 10,9 g/dl, PLT 134 tys/µl. Zapis EKG wskazywał AF, okresowo trzepotanie przedsionków, RR 120/80 mmHg. Pacjentka nie zgłaszała istotnych dolegliwości. Konsultujący kardiolog zaproponował pozostawienie AF pod kontrolą częstości rytmu serca oraz zmianę propafenonu na amiodaron. Ze względu na dobrą tolerancję chemioterapii kolejne cykle odbywały się w trybie hospitalizacji jednodniowych. W lipcu 2012 r., po dwunastym kursie azacytydyny, wystąpiła potwierdzona w badaniu angiografii tomografii komputerowej (angio-TK) klatki piersiowej zatorowość płucna. Leczenie przeciwkrzepliwie przyniosło szybką stabilizację i poprawę kliniczną, a datę kolejnej chemioterapii przesunięto w czasie. Do końca marca 2013 r. pacjentka otrzymała dwadzieścia jeden cykli leczenia. Stan ogólny pacjentki wg skali WHO oceniamy na 0.

## Omówienie

Ostre białaczki szpikowe są heterogenną grupą chorób charakteryzujących się niekontrolowaną, klonalną proliferacją i kumulacją niedojrzałych morfologicznie oraz czynnościowo komórek blastycznych [3]. Nacieczenie szpiku przez komórki białaczkowe powoduje wyparcie prawidłowych układów krwiotwórczych, co w konsekwencji prowadzi do niedokrwistości, małopłytkowości i neutropenii [4]. Według statystyk amerykańskich, średnia zapadalność na AML rośnie z wiekiem i u osób po 60. rż. wynosi 10:100 000 na rok, a przeciętny wiek w momencie diagnozy to 65 lat [5]. Wyniki stosowania intensywnej chemioterapii u chorych > 60. rż., nie są zadowalające, a istotny problem stanowi terapia choroby odpornej i wznowy [6]. Anomalie cytogenetyczne stwierdza się u ponad połowy pacjentów. Kariotyp klonu białaczkowego w chwili rozpoznania jest najsilniejszym czynnikiem prognostycznym AML [7, 8]. U prezentowanej pacjentki nie uzyskano trwałej odpowiedzi na standardowe schematy leczenia, a przeprowadzona wyjściowo analiza kariotypu wskazywała na możliwość niekorzystnego przebiegu klinicznego. Terapia cytostatykami

z grupy antracyklin wiązała się ryzykiem nasilenia powikłań kardiologicznych. Zastosowanie azacytydyny pozwoliło na uzyskanie utrzymującej się remisji, przy zachowaniu dobrej tolerancji leczenia. Stwierdzona u chorej trisomia chromosomu 6 stanowi o pośrednim rokowaniu [9], a obecność dmin (*double minutes*) – acentrycznych fragmentów pozachromosomalnego DNA, wiązana jest ze złą prognozą oraz możliwością wystąpienia oporności na cytostatyki [10, 11]. Dmin to częste zaburzenie cytogenetyczne w guzach litych, zwłaszcza w komórkach raka nadnerczy i neuroblastoma [12]. W AML stwierdzane są u około 1% pacjentów, w większości przypadków zawierają amplifikację genu MYC [13], która jest charakterystyczna dla chłoniaków o agresywnym przebiegu [14].

Publikacje dokumentujące skuteczność azacytydyny u chorych na AML powyżej 60. rż., zarówno w pierwszej, jak i w kolejnych liniach leczenia, prezentują zachęcające wyniki – odpowiedź osiąga 32–48% chorych, a CR odnotowywano u 7–12% badanych. Interesującym faktem jest wydłużenie przeżycia chorych, zwłaszcza w grupie pacjentów, u których azacytydynę zastosowano w pierwszej linii leczenia [15]. Podczas terapii azacytydyną nie stwierdzano zwiększonego odsetka powikłań infekcyjnych i krwotocznych, ponad te występujące w przebiegu choroby zasadniczej [16]. Większość działań niepożądanych obserwowanych w czasie stosowania leku jest przejściowa i zmniejsza nasilenie w trakcie kolejnych podań [17]. Dotychczas brak szczegółowych danych w literaturze na temat związku stosowania azacytydyny z wystąpieniem zatorowości płucnej. U opisywanej chorej występowały niezależne czynniki ryzyka żyłnej choroby zakrzepowozatorowej, takie jak: wiek > 70. rż., AF, nowotwór złośliwy układu krwiotwórczego szpiku oraz wdrożona chemioterapia. Pacjenci z niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi, u których prawdopodobieństwo uzyskania odpowiedzi na standardową chemioterapię jest niewielkie, powinni być niezwłocznie kwalifikowani do leczenia z użyciem preparatów nowej generacji [18]. Aktualne doniesienia wskazują na wyraźne powiązania leukemogenezy z procesami epigenetycznymi [19]. Metylacja DNA jest jednym z głównych mechanizmów regulacji ekspresji genów, kontrolujących apoptozę i cykl komórkowy [20, 21]. Działanie leków hipometylujących nie jest do końca wyjaśnione. Inkorporacja nukleozydów azacytydyny do DNA odbywa się w fazie S cyklu komórkowego, stąd czas ekspozycji determinuje efektywność stosowanego leczenia [22].

## Podsumowanie

Pomimo postępu w terapii AML wyniki leczenia u pacjentów powyżej 60. rż. pozostają niezadowolające. Współczesna wiedza na temat ostrej białaczki szpikowej, a w szczególności analizy badań cytogenetycznych i molekularnych, wskazuje na znaczną heterogenność tego schorzenia. U opisywanej chorej stwierdzono rzadko występujące w nowotworach hematologicznych anomalie kariotypu – *double minutes*, wiążące się z opornością na klasyczną chemioterapię. Wobec braku reakcji na standardowe schematy leczenia zastosowano azacytydynę i uzyskano trzyliniową normalizację. Opracowanie i eksploracja nowych form terapii wpływających

na mechanizmy epigenetyczne stanowi obiecujący kierunek badań nad skutecznym leczeniem AML.

---

### Wkład autorów/Authors' contributions

Według kolejności.

---

### Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

---

### Finansowanie/Financial support

Nie występuje.

---

### Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

---

### PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J of Hematology* 2012;87:89-99.
- [2] Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM, et al. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. *A Southwest Oncology Groupstudy. Blood* 1997;89:3323-3329.
- [3] Gil L, Komarnicki M. Novel agents in treatment of acute myeloid leukemia. *Contemporary Oncology* 2007;11:181-185.
- [4] Wierzbowska A, Pluta A, Robak T. Standards of diagnostic and treatment procedures in adult patients with acute myeloid leukemia according to European Leukemia Net. *Acta Haematol Pol* 2010;41:371-379.
- [5] Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999;341:1051-1062.
- [6] Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, Giles F, Faderl S, Jabbour E, et al. Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Cancer* 2006;106:1090-1099.
- [7] Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 2004;18:115-136.
- [8] Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al., on behalf of the Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: Analysis of 1,612 Patients Entered Into the MRC AML 10 Trial. *Blood* 1998;92:2322-2333.
- [9] Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. 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.
- [10] Slovak ML, Ho JP, Pettenati MJ, Khan A, Douer D, Lal S, et al. Localization of amplified MYC gene sequences to double minute chromosomes in acute myelogenous leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;9:62-67.
- [11] Fegan CD, White D, Sweeney M. C-myc amplification, double minutes and homogenous staining regions in a case of AML. *Br J Hematol* 1995;90:486-488.
- [12] Movafagh A, Mirfakhraei R, Mousavi-Jarrahi A. Frequent incidence of double minute chromosomes in cancers, with special up-to-date reference to leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;12:3453-3456.
- [13] Storlazzi CT, Fioretos T, Surace C, Lonoce A, Mastrorilli A, Strömbeck B, et al. MYC-containing double minutes in hematologic malignancies: evidence in favor of the episome model and exclusion of MYC as the target gene. *Hum Mol Genet* 2006;15:933-942.
- [14] Setoodeh R, Schwartz S, Papenhausen P, Zhang L, Sagatys EM, Moscinski LC, et al. Double-hit mantle cell lymphoma with MYC gene rearrangement or amplification: a report of four cases and review of the literature. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;5:155-167.
- [15] Maurillo L, Venditti A, Spagnoli A, Gaidano G, Ferrero D, Oliva E, et al. Azacitidine for the treatment of patients with acute myeloid leukemia: report of 82 patients enrolled in an Italian Compassionate Program. *Cancer* 2012;118:1014-1022.
- [16] Silverman LR, McKenzie DR, Peterson BL, Holland JF, Backstrom JT, Beach CL. Further analysis of trials with azacitidine in patients with myelodysplastic syndrome: Studies 8421, 8921, and 9221 by the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol* 2006;24:3895-3903.
- [17] Santini V, Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, Silverman LR, List A, et al. Management and supportive care measures for adverse events in patients with myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Eur J Haematol* 2010;85:130-138.
- [18] Baer MR, Gojo I. Novel Agents for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia in the Older Patient. *J Natl Compr Canc Netw* 2011;9:3315.
- [19] Oki Y, Issa JP. Epigenetic mechanisms in AML – a target for therapy. *Cancer Treat Res* 2010;145:19-40.
- [20] Peters AH, Schwaller J. Epigenetic mechanisms in acute myeloid leukemia. *Prog Drug Res* 2011;67:197-219.
- [21] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-2054.
- [22] Suarez L, Gore SD. Demethylation demystification. *Blood* 2013;121:1488-1489.