



TRANSFUZE A HEMATOLOGIE *dnes*

ČASOPIS SPOLEČNOSTI PRO TRANSFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ
A ČESKÉ HEMATOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI



XXIV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí

XIV. Konference ošetrovatelských profesí v hematologii

XIII. Konference zdravotních laborantů v hematologii

3rd Symposium on Advances in Molecular Hematology

Olomouc, 24. 6. – 26. 6. 2010

Supplementum

VYDÁVÁ ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ
ISSN 1213-5763
INDEXED IN EMBASE/Excerpta Medica
Excerptováno v BIBLIOGRAPHIA MEDICA ČECHOSLOVACA

2

TRANSFUZE A HEMATOLOGIE

dněs

SUPPLEMENTUM 2 • ČERVEN • ROČNÍK 16/2010

VEDOUcí REDAKTOR

MUDr. Jiří Masopust

Transfuzní oddělení, Krajská zdravotní - Masarykova nemocnice, Ústí nad Labem

ZÁSTUPCE VEDOUcíHO REDAKTORA

Doc. MUDr. Edgar Faber, CSc.

Hemato-onkologická klinika Fakultní nemocnice, Olomouc

REDAKCE

ZA SPOLEČNOST PRO TRANSFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ

MUDr. Jiří Masopust – hlavní redaktor pro transfuzní lékařství

MUDr. Ivana Meluzínová

Hematologické a transfuzní oddělení Nemocnice Boskovice

MUDr. Martin Písačka

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

MUDr. Vít Řeháček

Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice, Hradec Králové

MUDr. Petr Turek, CSc.

Transfuzní oddělení, Thomayerova nemocnice, Praha

ZA HEMATOLOGICKOU SPOLEČNOST

Doc. MUDr. Edgar Faber, CSc. – hlavní redaktor pro hematologii

Doc. MUDr. Jaroslav Čermák, CSc.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

MUDr. Jan Haber – I. interní klinika 1. LF UK Praha a VFN

Doc. MUDr. Tomáš Kozák, Ph. D., MBA

Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha

Prof. MUDr. Jan Trka, Ph. D.

Laboratoř molekulární genetiky Kliniky dětské hematologie a onkologie Fakultní nemocnice Motol, Praha

Doc. MUDr. Pavel Žák, Ph. D.

Oddělení klinické hematologie FN, Hradec Králové

REDAKČNÍ RADA

ZA SPOLEČNOST PRO TRANSFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ

MUDr. Petr Biedermann

Transfuzní oddělení Nemocnice, České Budějovice

Doc. MUDr. Zdenka Gašová, CSc.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

MUDr. Jitka Kracíková

Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha

MUDr. Vladimír Kulich, Štěnovice

MUDr. Josef Nedvěd

Karviná – Mizerov

Zuzana Pospíšilová

Fakultní transfuzní oddělení Všeobecné fakultní nemocnice, Praha

MUDr. Walid Sireis

Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie,

Frankfurt am Main, Germany

Prof. MUDr. Walter Stangel

Hannover, Germany

MUDr. Vladimír Veselý, CSc.

Fakultní transfuzní oddělení Všeobecné fakultní nemocnice, Praha

MUDr. Lenka Walterová

Hematologické oddělení Krajské nemocnice, Liberec

ZA HEMATOLOGICKOU SPOLEČNOST

Doc. MUDr. Petr Cetkovský, Ph. D.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Prof. MUDr. Karel Indrák, DrSc.

Hemato-onkologická klinika Fakultní nemocnice, Olomouc

Prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová, CSc.

Hemato-onkologická klinika Fakultní nemocnice, Olomouc

Prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc.

I. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha

MUDr. Vladimír Koza

Transplantační oddělení Fakultní nemocnice, Plzeň-Lochtín

Prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc.

I. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha

Prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.

II. interní klinika Fakultní nemocnice, Hradec Králové

Prof. MUDr. Miroslav Penka, CSc.

Oddělení klinické hematologie

Fakultní nemocnice, Brno-Bohunice

Prof. MUDr. Jan Starý, CSc.

Klinika dětské hematologie a onkologie Fakultní nemocnice

Motol, Praha

Prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc.

Interní hemato-onkologická klinika Fakultní nemocnice,

Brno-Bohunice



Česká hematologická
společnost ČLS JEP

OBSAH

Morfologie I.	7	3rd Symposium on advances in molecular hematology III.	52
XIV. Konference ošetrovatelských profesí v hematologii	7	Hemostáza	55
CLL I.	8	Mnohočetný myelom II.	55
Transplantace	11	CML/Myeloproliferace	58
Morfologie II.	14	Experimentální hematologie	62
XIV. Konference ošetrovatelských profesí v hematologii	15		
CLL II.	17	POSTERY	
CML - Edukační sekce.....	19	Ošetrovatelství	66
Edukace	20	CLL	67
XIII. Konference zdravotních laborantů	22	Transplantace	67
Podpůrná péče	23	Podpůrná péče	71
Laboratorní hematologie	25	Zdravotní laboranti.....	72
XIII. Konference zdravotních laborantů	28	CML/myeloproliferace	73
Lymfomy I.	29	Experimentální hematologie	80
MDS	32	Lymfomy	82
3rd Symposium on advances in molecular hematology I.	35	MDS	87
Lymfomy II.	37	Akutní leukemie	88
Akutní leukemie I.	40	Transfuzní lékařství	91
3rd Symposium on advances in molecular hematology II.	43	Mnohočetný myelom	92
Transfuzní lékařství	45	Hemostáza	99
Mnohočetný myelom I.	47		
Akutní leukemie II.	50	POUZE K PUBLIKACI	104

Redakce neručí za odbornou ani jazykovou správnost abstrakt.

Časopis *Transfuze a hematologie dnes* je v roce 2010 poskytován členům ČHS a STL zdarma díky podpoře společnosti Janssen-Cilag.



<http://www.cls.cz>

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2010

TRANSFUZE A HEMATOLOGIE DNES

Vydává Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, Sokolská 31, 120 26 Praha 2.

Vedoucí redaktor: MUDr. Jiří Masopust, **zástupce vedoucího redaktora:** doc. MUDr. E. Faber, Ph.D.

Odpovědná redaktorka: RNDr. Marie Forejtová.

Tiskne: Tiskárna Prager-LD, s. r. o., Kováků 9, 150 00 Praha 5. **Rozšiřuje:** V ČR-Nakladatelství Olympia, a. s., Praha, **do zahraničí (kromě SR):**

Myris Trade s. r. o., V Štíhlách 1311/3, P.O. Box 2, 142 01 Praha 4, **v SR:** Mediaprint-Kappa Pressegrasso, a. s., oddelenie inej formy predaja,

Vajnorská 137, P. O. BOX 183, 830 00 Bratislava 3, tel.: 00421/244 488 821, 00421/244 442 773, 00421/458 816, fax: 00421/244 458 819,

e-mail: predplatne@abompkapa.sk.

Vychází: 4krát ročně. **Předplatné:** na rok 280 Kč, SR 16,80 €, jednotlivé číslo 70 Kč, SR 4,20 €

Informace o předplatném podává a objednávky českých předplatitelů přijímá: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP,

Sokolská 31, 120 26 Praha 2, tel.: 296 181 805 – J. Spalová, e-mail: spalova@cls.cz. **Informace o podmínkách inzerce poskytuje a objednávky**

přijímá: Inzertní oddělení ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, tel.: 224 266 252-3, fax: 224 266 265, e-mail: ntsinzerce@cls.cz,

Registrační značka MK ČR E 7391.

Rukopisy zasílejte vždy v elektronické i tištěné formě (1 výtisk) na adresy: Transfuzní tematika - jiri.masopust@mnul.cz,

prim. MUDr. Jiří Masopust, Krajská zdravotní, a.s. - Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o.z., Transfuzní oddělení,

Sociální péče 3316/12a, 401 13 Ústí nad Labem;

Hematologická tematika - Edgar.Faber@fnol.cz, doc. MUDr. Edgar Faber, CSc., Hemato-onkologická klinika FN Olomouc,

I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc

Rukopis byl předán do výroby 1. 6. 2010

Zaslané příspěvky se nevracejí. **Vydavatel získá otištěním příspěvku výlučné nakladatelské právo k jeho užití.**

Otištěné příspěvky autorů nejsou honorovány, autoři obdrží bezplatně jeden výtisk časopisu. Vydavatel a redakční rada upozorňují, že za obsah a jazykové zpracování inzerátů a reklam odpovídá výhradně inzerent. Žádná část tohoto časopisu nesmí být kopírována a rozmnožována za účelem dalšího rozšiřování v jakékoli formě či jakýmkoliv způsobem, ať již mechanickým nebo elektronickým, včetně pořizování fotokopíí, nahrávek, informačních databází na magnetických nosičích bez písemného souhlasu vlastníka autorských práv a vydavatelského oprávnění.

**Česká hematologická společnost ČLS JEP,
Společnost pro transfúzní lékařství ČLS JEP,
Česká asociace sester,
Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc a HAIMAOM,
nadace na podporu transplantace kostní dřeně**

pod záštitou:

rektora UP v Olomouci prof. RNDr. M. Mašláně, CSc.
děkana LF UP v Olomouci prof. MUDr. Z. Koláře, CSc.
ředitele FN Olomouc MUDr. R. Maráčka
primátora města Olomouce M. Novotného
hejtmana Olomouckého kraje Ing. M. Tesaříka

pořádají

XXIV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí

**XIV. Konference ošetrovatelských profesí v hematologii
XIII. Konference zdravotních laborantů v hematologii
3rd Symposium on Advances in Molecular Hematology**

24. 6. – 26. 6. 2010

Místo konání: NH Olomouc Congress, Legionářská 21, Olomouc

Program kongresu

XXIV. Olomoucké hematologické dny

čtvrtek 24. června 2010, 13:00- 18:00 (sál Pegasus, RCO) – satelitní sympózia farmaceutických společností
pátek 25. června 2010, 9:00 – 19:00 (sály NH Olomouc Congress) – oficiální zahájení kongresu,
Wiedermannova přednáška, odborný program, posterová sekce, satelitní sympózia
sobota 26. června 2010, 9:00 – 18:00 (sály NH Olomouc Congress) – odborný program,
posterová sekce, satelitní sympózia farmaceutických společností

XIV. Konference ošetrovatelských profesí v hematologii

pátek 25. června 2010, 9:00 – 12:30 (NH Hotel)

XIII. Konference zdravotních laborantů v hematologii

pátek 25. června 2010, 14:30 – 18:45 (NH Hotel)

3rd Symposium on Advances in Molecular Hematology

sobota 26. června 2010, 9:00 – 18:00 (NH Hotel)

Prezident sjezdu:

Karel Indrák

Předseda organizačního výboru:

Tomáš Papajík

Organizační výbor:

D. Bendová, V. Divoký, E. Faber, M. Fingerová, A. Hluší, M. Hofmanová, J. Hubáček, K. Indrák, J. Indráková, M. Jarošová, V. Kajaba, T. Papajík, Z. Pikalová, T. Sotkowski, J. Ščudlová, L. Štursová

Předseda vědeckého výboru:

Edgar Faber

Vědecký výbor:

E. Bystřická, J. Čermák, V. Divoký, M. Doubek, E. Faber, D. Galuszková, R. Hájek, J. Hubáček, K. Indrák, J. Indráková, M. Jarošová, V. Kajaba, T. Kozák, J. Malý, J. Masopust, M. Mistrík, T. Papajík, L. Plank, D. Pospíšilová, L. Raida, V. Řeháček, J. Starý, V. Ščudla, J. Ščudlová, D. Starostka, T. Stopka, V. Tóthová, J. Trka, M. Trněný, J. Vondráková

Čestné předsednictvo:

Ing. Martin Tesařík

hejtman Olomouckého kraje

Martin Novotný

primátor statutárního města Olomouce

prof. RNDr. Miroslav Mašláň, CSc.

rektor University Palackého v Olomouci

MUDr. Radomír Maráček

ředitel FN Olomouc

prof. MUDr. Karel Indrák, DrSc.

prezident sjezdu, místopředseda ČHS ČLS JEP

prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc.

děkan Lékařské fakulty University Palackého v Olomouci

doc. PhDr. Jana Marečková, Ph.D.

děkanka Fakulty zdravotnických věd UP

MUDr. Zdeněk Mrozek, Ph.D.

viceprezident České lékařské komory

doc. MUDr. Jaroslav Čermák, PhD.

předseda České hematologické společnosti ČLS JEP

doc. MUDr. Tomáš Lipšic, CSc.

předseda Slovenskej hematologickej a transfúziologickej spoločnosti

doc. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.

předseda organizačního výboru sjezdu, předseda nadace Haimaom

prof. MUDr. Jan Starý, CSc.

Vědecký sekretář ČHS ČLS JEP

Jarmila Indráková

předsedkyně Sekce zdravotních laborantů České asociace sester

Jana Ščudlová

členka výboru Sekce onkologie ČAS

Mgr. Václav Kajaba, Ph.D.

předseda Sekce onkologie České asociace sester

GENERÁLNÍ PARTNEŘI

AMGEN s.r.o. / Astellas Pharma s.r.o. / Novartis s.r.o.



Hlavní PARTNEŘI

Bristol-Myers Squibb spol.s.r.o. / Celgene s.r.o. / Roche s.r.o. / Sysmex CZ, s.r.o.



VÝZNAMNÍ PARTNEŘI

ADP Orphan Pharmaceuticals AG / Genzyme Czech s.r.o.
Janssen - Cilag s.r.o. / Pfizer spol. s r.o.



MEDIÁLNÍ PARTNEŘI

Farmakon Press s.r.o. / Remedia s.r.o. / We Make Media
Mladá fronta a.s. / BastArt / Redigy



PARTNEŘI

Abbott Laboratories s.r.o.
Alexion Europe
Auto Hlaváček a.s.
Baxter Czech s.r.o.
Bayer s.r.o., Bayer Shering Pharma
Beckman Coulter Česká republika s.r.o.
Berlin-Chemie/ A.Menarini Česká republika s.r.o.
BIOHEM spol. s r.o.
CaridianBCT
Carl Zeiss spol. s r.o.
Cephalon Sp.z o.o.
EXBIO Praha a.s.
Fresenius Medical Care Česká republika s.r.o.
GlaxoSmithKline s.r.o.
GRIFOLS s.r.o.
Medicom International s.r.o.
Medista, spol. s r.o.
Merck Sharp & Dohme Idea INC.
Mundipharma Ges.m.b.H Austria, Representative Office CZ
Novo Nordisk s.r.o.
Octapharma CZ, s.r.o.
S.A.B.Impex s.r.o.
The Binding Site s.r.o.
Lymphom Help
Olomoucký kraj



VŠEM SRDEČNĚ DĚKUJEME!

MORFOLOGIE I.**Hematologic Morphology in the Age of Molecular Genetics****Blood morphology and cytogenetic predictivity in leukemia**Zini G. (*Rome-Italy*)**Role of bone marrow morphology in myeloproliferative diseases and its correlation with other diagnostic tools**Mustjoki S. (*Helsinki-Finland*)**Morphology and immune cytology of pleural effusions**Hastka J. (*Mannheim-Germany*)**Externí laboratorní kontrola v hematologické morfologii**

Matýšková M., Penka M.

(*Fakultní nemocnice Brno Bohunice*)**XIV. KONFERENCE OŠETŘOVATELSKÝCH PROFESÍ V HEMATOLOGII****1832.****Jak se léčí léky**Strojil Jan (*Ústav farmakologie LF UP, Olomouc*)

Nežádoucí účinky léčiv patří v současné době mezi významné příčiny mortality a morbidity, způsobují více úmrtí než dopravní nehody. Nežádoucí účinky, kterým lze předcházet, vedou k 4,3 % všech hospitalizací, nejčastějšími léky jsou antiagregancia (16%), diuretika (16%), NSAIDs (11%) a antikoagulancia (8%). [1] U jednoho ze sedmi pacientů dojde během hospitalizace k výskytu alespoň jednoho nežádoucího účinku, které zvyšují náklady a prodlužují hospitalizaci. [2] Přesto není riziko farmakoterapie populací vnímáno tak negativně například ve srovnání s rizikem terorismu, násilných trestných činů či nehod, přestože objektivní riziko je nižší. Stejně tak i náklady vynaložené na ochranu populace před nežádoucími účinky léků jsou často nižší než náklady na „ochranu“ před jinými riziky. Přednáška se zabývá obecnými příčinami rizika představovaného i správně indikovanou a monitorovanou farmakoterapií. Selhání současných vědomostí na úrovni poznání (patofyziologie chorob, nedostatečné popsání účinků léku po dostatečně dlouhou dobu, genetická a fenotypická variabilita populace, rozdíly v compliance, očekávání pacientů i lékařů, ekonomické tlaky jako příčiny komplexního a často nepředvídatelného dopadu léku. Dále se prezentace zabývá rolí regulátorů v procesu uvádění léků na trh s uvedením některých významných případů z minulosti (talidomid, beta blokátory, COX-2 inhibitory, antiobesitika) a rolí médií a marketingu při vytváření obrazu léků (vakcíny, klinické studie). Uvedeny jsou nejčastější typy nežádoucíh

ků vedoucích ke stažení léku či omezení indikací a přehled základních epidemiologických metod zkoumání bezpečnosti léků včetně jejich výhod a limitací (např. databázové studie, spontánní hlášení, kohoutové studie). Závěrem jsou probány možné reakce na zjištěná bezpečnostní rizika a racionální způsoby jeho minimalizace (od úplného stažení z trhu přes omezení registrace po edukaci zdravotníků a pacientů). „Všechny léky jsou nebezpečné. Některé mohou být účinné.“ (T. Moore, EACPT 2005) Vybraná literatura: [1] R.L. Howard, A.J. Avery, S. Slavenburg, S. Royal, G. Pipe, P. Lucassen, and M. Pirmohamed, “Which drugs cause preventable admissions to hospital? A systematic review,” *British journal of clinical pharmacology*, vol. 63, 2006, pp. 136–147. [2] E.C. Davies, C.F. Green, S. Taylor, P.R. Williamson, D.R. Mottram, and M. Pirmohamed, “Adverse Drug Reactions in Hospital In-Patients: A Prospective Analysis of 3695 Patient-Episodes,” *PLoS ONE*, vol. 4, 2009, p. e4439.

1849.**Virus A (H1N1) jako komplikace hematoonkologického onemocnění**Vachová Petra, Hájková Veronika, Ščudlová Jana, Kajaba Václav, Rohoň Peter (*HOK FN, Olomouc*)

Mexická (prasečí) chřipka je akutní virové onemocnění respiračního traktu prasat způsobené virem typu A (H1N1). Virus způsobuje u prasat vysokou nemocnost ale nízkou úmrtnost. V nejvyšší míře propuká ke konci podzimu a v zimních měsících. Hlavními symptomy lidské formy prasečí chřipky jsou horečka, kašel, bolest v krku, bolest svalů a hlavy, únava, někdy průjem a zvracení. Člověk se prasečí chřipkou může nakazit přímým kontaktem s nemocným zvířetem. Virus získaný ze současných lidských případů prasečí chřipky je citlivý na antivirotika oseltamivir a zanamivir, většina nakažených lidí se uzdravila bez lékařského dohledu. Kazuistika: 42letý muž, který byl přijat v 12/2009 ze spádové interní nemocnice s difúzními bolestmi břicha a dušností při sebemenší námaze. Stanovena diagnóza Burkittův lymfom, po předfázi kortikoidy zahájena chemoterapie. Poté dochází k akutnímu renálnímu selhání s nutností opakované dialyzační terapie. Následně se objevuje progredující dušnost, kašel, hyposaturace 80% – dle RTG nález oboustranné pneumonie, zjištěna pozitivita viru H1N1. Jaká je ošetrovatelská péče o klienta s virem H1N1 je předmětem našeho sdělení.

1826.**Novinky v kreditním systému celoživotního vzdělávání nelékařských pracovníků**Kajaba Václav, Sukopová Věra (*HOK FN, Olomouc; Odd. vzdělávání, FN, Olomouc*)

Celoživotní vzdělávání nelékařských zdravotnických pracovníků doznalo v posledních letech výrazných změn. Nedostatek odborných akcí hodnocených kreditními bo-

dy vystřídal stav, kdy jsou každoročně pořádány tisíce odborných setkání/kurzů, kde je možné načerpat nové poznatky a získat kredity potřebné pro uznání způsobilosti k výkonu nelékařského zdravotnického povolání (dle zákona č. 96/2004 Sb.). Tolik diskutovaná "honba za kredity" ustupuje do pozadí a zdravotničtí pracovníci mají možnost většího výběru z odborných akcí, kurzů, e-learningu a školení blízkých k jejich odbornému zaměření.

Sdělení se zaměřuje na aktuální změny (Vyhl. č. 4/2010 Sb.) v kreditním systému pro vydání osvědčení k výkonu zdravotnického povolání bez přímého vedení nebo odborného dohledu zdravotnických pracovníků (ve znění Vyhl. č. 321/2008 Sb.). Současně v prezentaci zazní nejčastější dotazy a odpovědi plynoucí z končící platnosti registračního období, které opravňuje zdravotnické pracovníky k výkonu povolání bez odborného dohledu. V případě nezískání dostatečného počtu "kreditů" lze tuto podmínku nahradit zkouškou, jejíž úhradu definuje Nařízení vlády ze dne 8.6.2009 (č. 184/2009) o stanovení výše úhrad za zkoušky. Bližší podmínky těchto zkoušek ošetřuje vyhláška č. 189/2009 Sb.

Cílem prezentace je tedy poskytnout ve stručnosti zdravotnickým pracovníkům - sestřám přehledný rámec aktuálních právních norem, které se dotýkají jejich výkonu povolání a celoživotního vzdělávání s reflexí nejčastějších dotazů, které docházejí na Odbor vzdělávání Fakultní nemocnice v Olomouci.

1852.

Bezpečná manipulace s cytostatiky

Koubková Petra, Kubíčková Jana, Scholzová Soňa, Mjartanová Dagmar, Holbíková Marta, Vlasáková Hana
(*HOK FN, Olomouc*)

Cytostatika jsou chemické látky, které mají vliv na růst a množení buněk, ovšem i s efektem na zdravé tkáně. Proto může práce s nimi představovat riziko pro zdravotnický personál i pro samotné pacienty a jejich okolí. Proto je nutné dodržovat pravidla při zacházení s cytostatiky. Zdravotní sestry mohou být vystaveny toxickému působení cytostatik například při manipulaci s infuzemi, zajišťování aplikace, manipulace s exkrementy pacienta, manipulace s prádlem a s cyto odpadem. Účinky cytostatik mohou být karcinogenní, teratogenní a genotoxické i v malých dávkách. Zdravotničtí pracovníci jsou nejčastěji vystavováni cytostatickým látkám formou inhalační, orální a dermální. Cytostatická léčba by měla být prováděna v dobře větraných a snadno čistitelných místnostech. Velice důležitá je manipulace s exkrementy pacienta. Produkty metabolického rozpadu mohou být nebezpečné ještě 2-3 dny po skončení léčby. Nejvíce odpadních produktů bývá vyloučeno močí nebo stolicí, dále kůží nebo dechem. Moč je kontaminovaná 1-3 dny po léčbě (6 dní u doxorubicinu, 7 dní u cisplatinu nebo dacarbazinu), stolice 5-7 dnů. Cytotoxický odpad je veškerý materiál, který přišel do styku s cytostatiky během procesu přípravy roztoků a jejich podání. Vše je potřeba ukládat do speciálních označených žlutých kontejne-

rů z pevných materiálů. Cytotoxický odpad by měl být spálen na popel. Postup při rozlití cytostatika - při likvidaci použijte jednorázové pomůcky - cytostatika ve formě prášku stírejte opatrně vlhkou utěrkou - kontaminované místo umyjte opakovaně vodou se saponátem - vyměňte okamžitě potřísněné prádlo - veškeré použité pomůcky při úklidu ukládejte do spec. kontejnerů na cyto - po ukončení práce řádně vyvětrejte Obecné zásady bezpečnosti - zákaz manipulace s cytostatiky mají těhotné, kojící ženy, osoby plánující rodinu, mladší 18 let, nepověřený personál - nejezte, nepijte a používejte ochranný oděv při manipulaci s cytostatiky - likvidujte veškeré kontaminované pomůcky do určených kontejnerů - absolvujte pravidelné lékařské prohlídky - nahlaste každý úraz, nehodu či kontakt s cytostatikem Zásady první pomoci Potřísnění kůže - oplachujte tekoucí vodou, pak omyjte mýdlem a opět opláchněte, nedrhnout žínkou Kontakt se sliznicí - pouze výplachy vodou Zasažení oka - opakovaně výplachy vodou Náhodné požití - vypijte velké množství vody a vyvolejte zvracení

1853.

Akutní leukémie – kazuistika

Frančevová Alena, Sůvová J., (*HOO FN, Plzeň*)

Akutní leukémie je zhoubné nádorové onemocnění vycházející z nekontrolovatelného bujení nezralých krvetvorných buněk v kostní dřeni, tzv. blastů. Jedná se o onemocnění s rychlým a agresivním průběhem, vyžaduje rychlou, intenzivní léčbu. U neléčených pacientů je možnost přežití pouze několik týdnů. V našem příspěvku Vás seznámíme s průběhem onemocnění pacientky H.F, 54 let. Od objevení se prvních příznaků, diagnostiku, léčbu cytostatiky i její komplikace až po transplantaci krvetvorných buněk. Měsíc po transplantaci, po propuštění do domácí péče, nastala další komplikace v podobě CMP. Po celé toto období vyžadoval zdravotní stav pacientky specifickou ošetrovatelskou péči. Pacientka byla po náročné rehabilitaci v uspokojivé fyzické kondici propuštěna do domácí péče.

CLL I.

1631.

Epidemiologie chronické lymfocytární leukemie (CLL), aneb kde končí monoklonální B lymfocytóza a začíná CLL

Doubek Michael, Panovská Anna
(*Interní hematologická klinika LF MU a FN, Brno*)

V současnosti jsou v případě CLL často diskutovanými otázkami moderní prognostické faktory či terapie. Nicméně dosud jsme neměli přesná data o skutečné epidemiologické situaci CLL a o epidemiologické situaci monoklonální B lymfocytózy (MBL). Nevěděli jsme také, kolik nemocných s CLL ve skutečnosti vyžaduje léčbu. Podle recentní analýzy provedené Interní hematologickou klinikou FN Brno byla zjištěna incidence CLL v naší popula-

Tabulka. Incidence a prevalence CLL.

Incidence (na 100000 obyvatel a rok)	Svět					Jižní Morava
	USA (2009)	Běloši, muži, USA (1999)	Evropa, muži (1999)	Oceánie, muži (1999)	Asie, jižní a východní, muži (1999)	5,8 – 6,2
	5,04	3,35 – 3,69	2,2 – 3,36	2,81 – 2,96	0,14 – 0,58	
Prevalence (na 100000 obyvatel)	-					48
Poměr muži/ženy	Švýcarsko		Čína			1,3 : 1
	1,4 : 1		3,2 : 1			
Medián věku při diagnóze (roky)	72					65

ci 5,8-6,2 případů na 100000 obyvatel a rok. Prevalence nemoci je 48 na 100000 obyvatel. Léčba je indikována jen u 1/3 nemocných s CLL. Moderní prognostické faktory (cytogenetiku, molekulární genetiku a imunofenotypizační prognostické znaky) má vyšetřeno 50 % pacientů. Incidence nemoci zjištěná v naší populaci je vyšší než incidence, která byla u bělochů publikována v 90. letech 20. století, ale i v našem desetiletí (viz tabulka). Je velmi pravděpodobné, že incidence CLL je ve skutečnosti vyšší, protože spousta případů CLL nebyla v minulosti diagnostikována. S touto otázkou souvisí též definice nové klinické jednotky: monoklonální B lymfocytózy (MBL). MBL je definována přítomností klonální populace B lymfocytů při nesplnění diagnostických kritérií CLL a nepřítomností jiných známek lymfoproliferativního onemocnění. Její výskyt stoupá s věkem, v populaci nad 40 let je zjišťována u přibližně 3 % jedinců. Klinický význam MBL není zatím zcela jasný, u některých pacientů ale může přecházet do CLL či jiného lymfoproliferativního onemocnění. V přehledném sdělení bude diskutována incidence a prevalence CLL a MBL, diagnostická kritéria CLL a MBL a faktory, které vedou k rozvoji MBL a její progresi do CLL.

1847.

Chronická lymfatická leukemie – na cestě k vyléčení?

Trněný Marek, Obrtlíková Petra, Karban Josef, Pytlík Robert, Válková Veronika, Schwarz Jiří
(I.interní klinika I.LF UK a VFN, Praha; Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha)

Chronická lymfatická leukémie (CLL) je považována za inkurabilní onemocnění s výrazně heterogenním průběhem. Řada nemocných, podle některých analýz až 50%, žije dlouhodobě bez nutnosti zahájit léčbu. U nemocných, kde je nutné zahájit léčbu, byl obecně přijímán fakt, že zásadní je chemosensitivita, ale z pohledu celkového přežití již není rozhodující, zda nemocný dosáhne kompletní či parciální remise. V posledních letech se zavedením imunochemoterapie a rozšířením alogenních transplantací se ukazuje, že kvalita odpovědi je spojena nejen s delší dobou do progresu, ale může také být spojena s delším celkovým přežitím. Stanovení minimální reziduální nemoci je považováno stále za experimentální přístup bez přímého dopadu na další léčeb-

ný postup. V posledních letech se konsistentně ukázalo i na velkých souborech nemocných, že nemocní, kteří dosáhli negativy minimální reziduální nemoci mají signifikantně lepší dobu do progresu než nemocní s přetrvávající pozitivitou. Přestože i u těchto nemocných dochází k relapsům, a nelze stále mluvit o vyléčení ukazuje se zcela jednoznačně, že je zapotřebí u nemocných, u nichž je cílem prodloužit život použít léčebné metody, které povedou k dosažení co nejkvalitnější odpovědi (kompletní remise), pokud možno s dosažením MRD. Tento přístup totiž dává šanci přiblížit se k vyléčení. U mladých nemocných s relapsem je nutné zvážit i možnost alogenní transplantace.

1684.

Nemyeloablativní transplantace u 41 pacientů s CLL z jednoho centra: nepřibuzný dárcé zaručuje lepší kontrolu nemoci při srovnatelné TRM

Jindra Pavel, Koza Vladimír, Steinerová Kateřina, Jungová Alexandra, Karas Michal, Lysák Daniel, Svoboda Tomáš, Vozobulová Věra, Vokurka Samuel, Peková Soňa, Hrabětová Marcela, Schutzová Miroslava
(HOO FN, Plzeň; Chambon, Praha)

I přes moderní léčebné postupy zahrnující kombinaci purinových analog a monoklonálních protilátek, zůstává CLL ve své podstatě nevléčitelnou nemocí. Zvláště u skupiny pacientů s kumulací nepříznivých prognostických faktorů (nemutovaný IgVH gen, del17p, rezistence na puriny) jsou třeba alternativní postupy. Alogenní transplantace s redukcí přípravou (RIC SCT) se zdá být slibnou léčebnou alternativou, neboť při snížené toxicitě zachovává GVL efekt. Přibuzný dárcé je však omezeně dostupný a obava z vyšší transplantační mortality vede ke zdrženlivosti ve využití nepřibuzných dárců. Pacienti a metodika: Unicentrická retrospektivní analýza 41 konsekutivních pacientů s CLL (medián 60 let, rozmezí 48-70) transplantovaných v letech 2002-9 RIC protokoly (Flu-Cy či Flu-Mel) na HOO FN Plzeň buď sourozencem (SIB skupina, n=16, 39%) nebo s nepřibuzným dárcem (MUD, n=25, 61%). Cytogenetika byla známá u 39 (95%), z nich nepříznivá u 59%, u celkem 39 % byla přítomna del17p-. IgVH stav byl známý u 17 (41%) z nichž u 15 nemutovaný. Nem. dostali medián 3 linií léčby (1-6), všichni refrakterní na puriny. 20 (41%) transplantováno mimo CR/PR. Mezi skupinami SIB a MUD nebyly

signifikantní rozdíly v relevantních parametrech (věk, stadium, cytogenetika, IgVH, doba sledování). Dárci MUD byli signifikantně mladší než SIB (medián 29 vs. 56 let, $p < .0001$). Výsledky: Při mediánu sledování 22 měsíců (rozmezí 3-77) pro celý soubor je pravděpod. 3-r přežívání (OS) a přežívání bez nemoci (DFS) 41%, resp. 39% zatímco nerelapsová mortalita (NRM) je 41% (17/41) a incidence relapsů 22% (9/41). Celková incidence aGVHD a cGVHD byla 56%, respektive 48%. Nebyl zaznamenán rozdíl v OS/DFS mezi pacienty s del17p a bez ní, stejně tak mezi pacienty s nepříznivou a ostatní cytogenetikou. Srovnáním SIB a MUD skupin tyto měly podobnou 3-r pravděpodobnost OS (27% vs 55%, $p=0,42$), ale u MUD jsme zaznamenali významně lepší DFS (23% vs. 55%, $p=0,03$). To bylo způsobeno trendem k vyšší incidenci relapsů (44% vs. 8%, $P=0,06$) a významně vyšší incidencí rejekcí štěpu (38% vs. 0%, $p=0,0018$) u SIB. Pro NRM, aGVHD a cGVHD nebyl zaznamenán mezi oběma skupinami významný rozdíl. Závěr: RIC SCT je efektivní léčbou prognosticky nepříznivé CLL s kurativním potenciálem i u nemocných refrakterních na purinová analoga či s del17p. Nepříbuzný dárci neovlivňuje negativně výsledek SCT u těchto pacientů, naopak při nedostupnosti příbuzného dárce je vhodnou alternativou zaručující lepší kontrolu nemoci.

1740.

Nízkodávkovaný fludarabin a cyklofosfamid v kombinaci s rituximabem v léčbě starších a komorbidních nemocných s chronickou lymfocytární leukémií/lymfomem z malých lymfocytů (CLL/SLL): projekt Q-lite České skupiny pro CLL

Smolej Lukáš, Špaček Martin, Belada David, Hrudková Monika, Brychtová Yvona, Doubek Michael, Schwarz Jiří, Cmunt Eduard, Rohoň Peter, Klásková Kateřina, Kozák Tomáš

(II. interní klinika, oddělení klinické hematologie, FN a LF Univerzity Karlovy, Hradec Králové; Oddělení klinické hematologie, FN Královské Vinohrady, Praha; Interní hematoonkologická klinika LF Masarykovy univerzity a FN, Brno; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; I.interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice, Praha; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Česká CLL skupina, Praha)

Úvod: Kombinace fludarabinu, cyklofosfamidu a rituximabu (FCR) je nyní považována za léčbu volby v 1.linii i relapsu chronické lymfocytární leukémie (CLL), avšak pouze u nemocných v dobrém celkovém stavu bez závažných přidružených onemocnění. V současné době není jasné, zda jsou fludarabinové režimy přínosem i pro nemocné vyššího věku a/nebo s komorbiditami. Cílem projektu „Q-lite“ České skupiny pro CLL bylo posouzení účinnosti a bezpečnosti nízkodávkovaných fludarabinových režimů u starších/komorbidních nemocných s CLL/SLL. Nemocní a metodiky: Od 3/2009 do 4/2010 bylo na 14 pracovištích spolupracujících v rámci ČSCLL zařazeno 60 nemocných (CLL, $n=56$, SLL, $n=4$). Jednalo se o 35 mužů a 25 žen

s mediánem věku 70 let (rozmezí 58-83). Oproti standardnímu režimu FC byly dávky fludarabinu sníženy na 50 % a cyklofosfamidu na 60 % (fludarabin 12 mg/m² i.v. nebo 20 mg/m² p.o. D1-3, cyklofosfamid 150 mg/m² i.v. nebo p.o. D1-3); dávka rituximabu byla obvyklá (375 mg/m² D1, v 1.cyklu, 500 mg/m² od 2.cyklu). FCR byl použit u 58 nemocných, FC 2x. V 1.linii bylo léčeno 31 nemocných, v relapsu 29. Podrobnější vstupní data jsou k 4/2010 dostupná u 50 nemocných. Vysoké riziko dle Raie bylo přítomno u 30 nemocných (60%). IgVH geny byly nemutované u 29 z 38 (76 %) nemocných; delece 11q u 14 (38 %) a del 17p u 2 (5 %) nemocných. Masivní lymfadenopatie byla přítomna u 21 (44 %) nemocných. Výsledky účinnosti a toxicity jsou zatím dostupné u 34, resp. 51 nemocných: Při hodnocení „intention to treat“ byla celková odpověď u 20 z 34 nemocných (58 %); kompletní remise u 7 nemocných (38 %). 4 nemocní (12%) měli progresi na léčbě, stabilní choroba byla u 6 pacientů (18 %). U 4 nemocných (12 %) nebyla léčebná odpověď hodnotitelná. V léčbě pokračuje 25 nemocných. Těžká neutropenie (III./IV. stupně) se vyskytla u 54 %, těžká trombocytopenie u 13 % a těžká anémie u 11 % nemocných. Závažné infekce se objevily u 10 % nemocných. Tři nemocní zemřeli po ukončení léčby (všichni bez léčebné odpovědi). Závěr: Úvodní data z projektu Q-lite ukazují, že léčba starších či komorbidních nemocných s CLL/SLL nízkodávkovanými protokoly FC/FCR jeví slibnou účinnost; hematologická i infekční toxicita jsou přijatelné. Pokračování v náborech do protokolu Q-lite se na základě těchto dat jeví jako oprávněné. Projekt finančně podpořily firmy Roche a Bayer-Schering Pharma. Podpořeno výzkumným záměrem MZO 00179906 Ministerstva zdravotnictví České republiky.

1805.

Možnosti a limity 18F-FDG PET/CT vyšetření u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií a lymfomem z malých lymfocytů

Papajík Tomáš, Mysliveček Miroslav, Šedová Zuzana, Buriánková Eva, Urbanová Renata, Koranda Pavel, Turcsanyi Peter, Procházka Vít, Pikalová Zuzana, Kučerová Ladislava, Jarošová Marie, Indrák Karel
(Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc; Klinika nukleární medicíny FN a LF UP, Olomouc; Ústav patologie FN a LF UP, Olomouc)

Pozitronová emisní tomografie (PET) s použitím 18F-fluorodeoxyglukózy (18F-FDG) kombinovaná s výpočetní tomografií (CT) představuje nejpřínosnější zobrazovací vyšetření při iniciačním určení stádia u nemocných s ne-hodgkinskými lymfomy (NHL). Přínos PET/CT u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií/lymfomem z malých lymfocytů (CLL/SLL) nebyl do dnešního dne systematicky analyzován. Původní práce zkoumající 18F-FDG aviditu u jednotlivých typů lymfoidních neoplázií prokázaly, že citlivost 18F-FDG PET se u CLL/SLL pohybuje ve srovnání s CT jen kolem 50%. V naší prospektivně hodnocené studii jsme analyzovali PET/CT nálezy u 18 nemocných

s nově diagnostikovanou CLL/SLL většinou v pokročilém stádiu choroby a velkou masou lymfatické tkáně a 6 nemocných s podezřením na Richterovu transformaci onemocnění. Z pacientů vyšetřených při diagnóze choroby bylo 6 nemocných hodnoceno jako 18F-FDG PET neavidních, u 5 nemocných některé lymfatické uzliny akumulovaly 18F-FDG zvýšeně, jiné však ne. U všech 18 nemocných byla vypočtena hodnota SUV_{max}. Medián hodnot SUV_{max} byl 3,2 (rozmezí 1,5 – 5,6). U 2 nemocných byl na PET/CT identifikován podezřelý extranodální útvar, který byl podroben dalším vyšetřením. U prvního nemocného byl prokázán karcinom tračnicku, u druhé nemocné karcinom dělohy. 6 nemocných bylo metodou PET/CT vyšetřeno při podezření na Richterovu transformaci CLL/SLL. U všech nemocných byla konstatována jednoznačná 18F-FDG avidita choroby, což bylo potvrzeno také vypočtenými hodnotami SUV_{max} (medián 16,4; rozmezí 7,2 – 25,3). U všech 6 nemocných byla histologicky potvrzena transformace CLL/SLL. U 2 nemocných byl identifikován difuzní B-velkobuněčný lymfom, u 3 nemocných lymfom Hodgkinův, u 1 nemocného CD30+ ALK+ anaplastický velkobuněčný lymfom. Rozdíly SUV_{max} obou vyšetřených skupin byly i přes malý počet pacientů statisticky významně rozdílné (Mann Whitney U test, $p < 0,001$). I když 18F-FDG PET/CT nepatří mezi standardní zobrazovací metody indikované při vyšetření nově diagnostikovaných nemocných s CLL/SLL, může jeho použití u nemocných s velkou nádorovou masou přinést cenné poznatky důležité pro další péči o nemocné. Naproti tomu při podezření na Richterovu transformaci představuje PET/CT vysoce senzitivní a specifickou metodu, která může mimo jiné sloužit k zacílení plánované biopsie do místa s vysokou biologickou aktivitou transformované tkáně. Podpořeno grantem IGA MZ ČR č. NR/9502-3.

TRANSPLANTACE

1642.

Výsledky léčby mladších pacientů s akutní myeloidní leukémií s normálním karyotypem - role alogenní transplantace krvetvorných buněk v rámci konsolidační léčby v 1.kompletní remisi - analýza výsledků období 2003-2009

Karas Michal, Steinerová Kateřina, Jindra Pavel, Vokurka Samuel, Lysák Daniel, Svoboda Tomáš, Koza Vladimír (*Hematologicko-onkologické odd. FN, Plzeň*)

Úvod: alogenní transplantace krvetvorných buněk (alloSCT) po myeloablativní přípravě s příbuzným dárce u pacientů s akutní myeloidní leukémií s normálním karyotypem (AML-NK) v 1.kompletní remisi (CR) zlepšuje přežití bez nemoci (DFS), incidenci relapsů (RI) i celkové přežití (OS) ve srovnání s pacienty léčenými pouze chemoterapií (CHT). Tento pozitivní vliv nebyl dosud ověřen pro nepříbuzenského alloSCT a pro alloSCT po redukované přípravě (RIC). Významnou roli v prognóze nemocných s AML-NK hrají také molekulárně-genetické (MG) markery. K ověření potenciální role alloSCT v rámci konsoli-

dační léčby u pacientů s AML-NK jsme retrospektivně zhodnotili výsledky všech těchto pacientů léčených od roku 2003 na našem pracovišti včetně zhodnocení vlivu detekovaných MG markerů. Pacienti a metody: od roku 2003 z intenzivně léčených 55 pacientů s mediánem věku 52 let (23-59 let) s AML-NK dosáhlo po 1 nebo 2 cyklech CHT 49 pacientů CR. 45 pacientů s mediánem věku 51 let (23-59let) a s mediánem sledování 32 měsíců (7-86 měsíců) pak pokračovalo v léčbě chemoterapií (18 pacientů, HD-Ara-C) nebo podstoupilo alloSCT (27 pacientů, 59% RIC, 63% nepříbuzný dárce). Obě skupiny pacientů se nelišily v žádném ze vstupních prognostických faktorů (věk, doba dosažení CR, MG markery, doba sledování). Výsledky: v celém souboru 91% pacientů s AML-NK dosáhlo po 1 nebo 2 cyklech chemoterapie CR. 18 (33%) pacientů zrelabovalo a 7 (13%) pacientů zemřelo z důvodů léčebné mortality (TRM). Předpokládaný 4 letý DFS a OS jsou 52% resp. 53%. Ve skupině pacientů s AML-NK, kteří dosáhli CR a podstoupili alloSCT zrelabovali 2 (7%) pacienti a 3 (11%) pacienti zemřeli z důvodu TRM. Předpokládaný 4 letý DFS a OS je 78%. Způsob transplantační přípravy ani typ dárce neměly vliv na OS po alloSCT. Ve skupině CHT léčených pacientů v CR AML-NK zemřeli 2 (11%) pacienti z důvodu TRM a 9 (50%) pacientů zrelabovalo. Předpokládaný 4 letý DFS a OS jsou 31% a 33%. AlloSCT se srovnatelnou TRM ($p=NS$), snížila RI ($p=0,003$) a zlepšila DFS ($p=0,0003$) a OS ($p=0,009$). V našem souboru jsme neprokázali signifikantní ovlivnění prognózy prokázanými MG markery. Závěr: s určitou limitací velikostí souboru získané výsledky přinášejí několik potenciálních závěrů: 1) alloSCT v posledních letech při nízké TRM a RI zlepšila DFS a OS ve srovnání se samotnou CHT u pacientů s AML-NK v 1.CR 2) typ dárce ani přípravy neovlivnily výsledky alloSCT 3) význam MG markerů se nám v našem souboru nepodařilo jednoznačně prokázat.

1640.

Alogenní transplantace po redukované přípravě u pacientů nad 60 let s akutní myeloidní leukémií jako součást standardní léčby – zkušenosti jednoho centra

Karas Michal, Steinerová Kateřina, Jindra Pavel, Vokurka Samuel, Lysák Daniel, Svoboda Tomáš, Koza Vladimír (*Hematologicko-onkologické odd. FN, Plzeň*)

Úvod: nepříznivou prognózu pacientů starších 60 let s akutní myeloidní leukémií (AML) léčených intenzivní chemoterapií (3 letý OS < 20%) může u části nemocných zlepšit zařazení alogenní transplantace krvetvorných buněk po redukované přípravě (RIT) do léčebné strategie. V tomto sdělení shrnujeme naše zkušenosti s tímto postupem především s ohledem na možnost zařazení RIT do standardní léčby, na důvody bránící provedení RIT a na zhodnocení výsledků samotné RIT včetně zhodnocení role nepříbuzenské RIT. Pacienti a metody: od 1/2003 do 9/2009 podstoupilo z 69 intenzivně léčených pacientů starších 60 let s AML 30 nemocných s mediánem věku 62 let (rozmezí 60-68 let)

RIT (fludarabin+melfalan). 19 pacientů bylo v době RIT v 1.CR AML a 11 pacientů bylo mimo 1.CR. Zdrojem krvevorných buněk byla periferní krev s mediánem transplantovaných CD 34+ buněk $5,79 \times 10^6/\text{kg}$ (rozmezí $1,89-14,90 \times 10^6/\text{kg}$). V 12 (40%) případech se jednalo o příbuzného a v 18 (60%) případech o nepříbuzného dárce (9x s HLA neshodou). Vstupní prognostické parametry pacientů transplantovaných od příbuzného a nepříbuzného dárce se kromě nižšího věku a vyššího počtu CD34+ buněk u nepříbuzných RIT mezi oběma skupinami nelišily. Prevencí GVHD byla kombinace cyclosporinu A a methotrexátu. Další postupy, léčba komplikací, jejich hodnocení a hodnocení výsledků léčby probíhalo dle standardních kritérií. Výsledky: důvody neprovedení RIT u intenzivně léčených pacientů nad 60 let s AML byly: nedostupnost dárce (28%), špatný celkový stav (28%), úmrtí při intenzivní léčbě (25%) a odmítnutí transplantace (19%). 30 (43%) z intenzivně léčených pacientů pak podstoupilo RIT. U všech bylo v den +30 po RIT dosaženo kompletního chimerismu. Akutní GVHD se rozvinula u 13 (43%) pacientů a chronická GVHD se rozvinula u 10 (40%) z 25 hodnocených pacientů. S mediánem sledování žijících pacientů 19 měsíců (rozmezí 2-73 měsíců) žije 17 (57%) nemocných, z nichž 16 (53%) v trvající CR. 5 (17%) pacientů zrelabovalo a 4 z nich zemřeli. 9 (30%) pacientů zemřelo z důvodu NRM. NRM do dne +100 byla 10%. Předpokládaný EFS a OS ve 4 letech je 46% a 48%. Výsledky RIT nebyly statisticky významně ovlivněny typem dárce. Závěr: přes určitou limitaci velikostí souboru námi získané výsledky ukazují, že téměř polovina intenzivně léčených pacientů starších 60 let s AML byla schopna podstoupit RIT a že RIT (včetně nepříbuzenské) při tolerovatelné NRM a nízké incidenci relapsů může zlepšit nepříznivou prognózu těchto nemocných.

1643.

Efektivita protokolu FLAMSA-RIC s následnou alogenní transplantací krvevorných buněk u 51 vysoce rizikových pacientů s hematologickými malignitami

Krejčí Marta, Brychtová Yvona, Doubek Michael, Ráčil Zdeněk, Kořístek Zdeněk, Navrátil Milan, Tomáška Miroslav, Horký Ondřej, Dvořáková Dana, Mayer Jiří
(*Interní hematologická klinika, FN, Brno*)

Úvod: Podání chemoterapie a následná aplikace režimu s redukovanou intenzitou (RIC) a provedení alogenní transplantace (SCT) u vysoce rizikových pacientů (pac.) s hematologickými malignitami se jeví jako nadějně s dobrými výsledky. Metody: Bylo analyzováno 51 pac., kteří podstoupili chemoterapii a RIC v našem centru v období 2006-2009 (30x AML, 6x ALL; 6x NHL, 3x CLL, 6x ostatní). Kombinace fludarabin ($30 \text{ mg}/\text{m}^2$), cytarabin ($2 \text{ g}/\text{m}^2$) a amsakrin ($100 \text{ mg}/\text{m}^2$) po 4 dny (FLAMSA) byla použita k cytoredukci. Po třídní pauze byl aplikován RIC: 4 Gy TBI, dále ATG (Fresenius) $10-20 \text{ mg}/\text{kg}/\text{den}$ po 3 dny a cyklofosfamid $40-60 \text{ mg}/\text{kg}/\text{den}$ po 2 dny. Amsakrin nebyl podán u nemocných s lymfoidními malignitami. Medián věku byl

49 let (rozpětí 19-61). Stav onemocnění před SCT: 8x CR1, 11x CR2, 1x CR3, 31x refrakterní onemocnění nebo relaps. Typy dárce: 17x HLA identický sourozenec, 34x nepříbuzenský dárce. Použité štěpy: 47x PBSC, 4x kostní dřev. Výsledky: Medián přihojení neutrofilů (nad $0,5 \times 10^9/\text{l}$) byl 18 dní, přihojení štěpu bylo dosaženo u 45 pac., 6 pac. zemřelo v aplázii. Léčebná odpověď byla hodnocena u 45 pac.: 41x remise (91%), 4x progresse (9%). Úmrtí bez souvislosti s relapsem (NRM) do dne +100 a v 1 roce byla 17% (9/51) a 21% (11/51); příčiny NRM: 4x GVHD, 4x septický šok, 2x multiorgánové selhání, 1x krvácení do CNS. Incidence akutní GVHD byla 62% (28/45); 23x stupeň I+II, 5x stupeň III. Incidence chronické GVHD byla 53% (19/36), 14x forma limitovaná, 5x extenzivní. Medián sledování od SCT je 13 měsíců (rozpětí 0.03-47). U 41% pac. (17/41) došlo k relapsu. Žije 24 pac. (47%), z toho je 21 pac. v remisi, 3 pac. s relapsem; 27 pac. (53%) zemřelo (z toho NRM 11x, progresse 16x). V celé skupině 51 pac. je medián bezpříznakového období (EFS) 7 měsíců, medián celkového přežití (OS) 14 měsíců. U pac., kteří byli v CR před SCT a u pac. s chronickou GVHD, nebyly mediány EFS a OS dosaženy. U pac. s AML je medián EFS 6 měsíců a medián OS 7 měsíců. U pac. s lymfoidními malignitami je medián EFS 15 měsíců a medián OS nebyl dosažen. Závěr: FLAMSA-RIC protokol se jeví jako efektivní záchranná terapie u rizikových pacientů s hematologickými malignitami. Léčebná odpověď je 91%, NRM v 1 roce je 21%, frekvence závažné GVHD je nízká. Nejlepších léčebných výsledků dosahují pacienti, kteří byli v CR před SCT, dále pacienti s lymfoidními malignitami a pacienti s přítomností chronické GVHD. K definitivnímu zhodnocení je zapotřebí delší doba sledování souboru.

1800.

Alogenní transplantace krvevorných buněk po režimu s redukovanou intenzitou fludarabin, busulfan a ATG, dlouhodobé výsledky

Brychtová Yvona, Krejčí Marta, Doubek Michael, Mužík Jan, Mayer Jiří, Vorlíček Jiří
(*Interní hematologická, onkologická klinika FN, Brno; Centrum biostatistiky a analýz, LF a PFF Masarykovy Univerzity, Brno*)

Úvod: Retrospektivní analýza výsledků alogenních transplantací krvevorných buněk po režimu s redukovanou intenzitou fludarabin ($30 \text{ mg}/\text{m}^2$, 5 dní), busulfan ($8-12 \text{ mg}/\text{kg}$ p.o.) a ATG Fresenius ($10 \text{ mg}/\text{kg}/\text{d}$, 4 dny) v našem centru od března 1998 do září 2008. Metody: 71 pacientů, medián věku 50 let, diagnóza 19 AML, 3 MDS, 24 CML, 2 idiopatická myelofibroza, 3 Hodgkinův lymfom, 9 NHL (3 DLBCL, 3 MCL, 1 FL, 2 T-NHL) a 8 B-CLL/SCLL, 3 MM. Periferní kmenové buňky byly použity pro 68 pacientů, kostní dřev u 3 pacientů, od 65 příbuzenských a 6 nepříbuzných dárce. Výsledky: Medián sledování byl 55 měsíců. Toxicita po transplantaci byla nízká [stupeň III 5,6% (4), stupeň IV 1,4% (1)]. Kompletní chimerismus byl dosažen u 31 pacientů (43,6%) do dne +100, 57 pacientů dosáhlo kom-

pletního chimerismu v mediánu 82 dní, 14 (19,7%) pacientů nedosáhlo kompletního chimerismu z důvodu rejekce štěpu (1), pro podání jeho autologního štěpu krvetvorných buněk pro těžkou GVHD (1), progresse nebo relapsu 9 (12,8%), úmrtí z důvodu infekce (2), krvácení (1). Akutní GVHD se rozvinula u 24 pacientů (34,9%) : 11, 8, 3, 2 pacienti maximalní grade I,II,III,IV. Chronická GVHD byla u 33 pacientů (52 %) : 25 limitovaná, 8 extenzivní. Sekundární rejekce štěpu byla u 3 pacientů s nepřibuzenským dárce. Infekci do dne +100 mělo 50 pacientů (70 %). Preemptivní terapii CMV mělo 24 % (17) pacientů. Infekci po dni +100 mělo 35 pacientů (55 %). Zemřelo 27 pacientů (38 %), příčiny úmrtí: 17 progresse (23,9%), 10 úmrtí z jiného důvodu než relaps onemocnění (14%) [úmrtí v souvislosti s transplantací 7 pacientů (3 infekce, 3 GVHD, 1 krvácení), 2 úmrtí na inekce po terapii relapsu nemoci, 1 Alzheimerova nemoc]. Medián celkového přežití (OS) pro všechny pacienty nebyl dosažen, přežití bez události (EFS) pro všechny pacienty byl 23 měsíců (Kaplan-Meier). Medián OS den +100, 1rok, 2 roky, 4 roky byl 88,7%, 74,7%, 73,2%, 62,6% . Median EFS den +100, 1 rok, 2 roky, 4 roky byl 84,5%, 63,4%, 49%, 40,3%. Závěr: RIC je asociovaný se statisticky signifikantně lepšími výsledky u pacientů s aGVHD nebo cGVHD podle OS, EFS Podporováno grantem IGA MZ ČR NS 9683/2008

1801.

Prevence GVHD a výsledky alogenních transplantací krvetvorných kmenových buněk (retrospektivní analýza).

Raida Luděk, Faber Edgar, Vondráková Jana, Rusiňáková Zuzana, Indrák Karel, Tuček Pavel
(HOK FN Olomouc; Katedra matematické analýzy a aplikací matematiky, Přírodovědecká fakulta UP; Olomouc)

Úvod: V prevenci nemoci štěpu proti hostiteli (GVHD) po alogenních transplantacích krvetvorných kmenových buněk (SCT) zůstává základním imunosupresivem cyklosporin A (CSP-A), nezřídka v kombinaci s malými dávkami methotrexátu (MTX) nebo mykofenolát mofetilem (MMF). Prezentovaná retrospektivní analýza hodnotí výsledky alogenních SCT (riziko výskytu akutní a chronické GVHD, relapsu základního onemocnění a úmrtí) v závislosti na třech různých režimech prevence GVHD. Soubor nemocných a metody: Prevence GvHD byla zajištěna samotným CSP-A u 56 (37%), kombinací CSP-A+MTX u 38 (26%) a CSP-A+MMF u 56 (37%) z celkově 150 alogenně transplantovaných pacientů (96% pro hematologickou malignitu). Tyto tři skupiny se významně lišily: věkem nemocných (medián 48 vs. 45 vs. 32, $P=0,0054$), diagnózou akutní leukémie (38% vs. 55% vs. 64%, $P=0,016$), zastoupením remisí choroby v době SCT (13% vs. 39% vs. 59%, $P=0,000002$), použitím ATG v přípravném režimu (68% vs. 24% vs. 36%, $P=0,000005$), SCT od příbuzného dárce (55% vs. 95% vs. 36%, $P=0,00000016$), SCT od HLA-identického dárce (93% vs. 97% vs. 68%, $P=0,000005$) a SCT po myeloablativní přípravě (4% vs. 41% vs. 55%, $P=0,00000014$).

Rozdíl mezi skupinami v riziku GVHD, relapsu a úmrtí byly hodnoceny multivariační Coxovou regresní analýzou, k sestrojení křivek pravděpodobného přežití bez nežádoucí události (EFS) a celkového přežití (OS) byla použita Kaplan-Meierova metoda. Výsledky: V uvedených třech skupinách nebyl zaznamenán rozdíl v riziku rozvoje akutní (32% vs. 39% vs. 36%, $P=0,58$; HR 1,18 [95%CI 0,86 - 1,62], $P=0,3$) nebo chronické GVHD (25% vs. 29% vs. 36%, $P=0,6$), relapsu choroby (20% vs. 30% vs. 14%, $P=0,15$; HR 0,87 [95%CI 0,56 - 1,37], $P=0,56$), TRM (20% vs. 42% vs. 32%, $P=0,13$; HR 1,27 [95%CI 0,9 - 1,79], $P=0,18$), pravděpodobném pětiletém EFS (52% vs. 32% vs. 43%, $P=0,13$; HR 1,0 [95%CI 0,73 - 1,34], $P=0,95$) a OS (53% vs. 34% vs. 53%, $P=0,25$; HR 1,03 [95%CI 0,78 - 1,35], $P=0,85$). Závěr: Při zohlednění základního onemocnění a jeho stavu, intenzity přípravného režimu základních charakteristik dárce a dalších parametrů, které mohou potenciálně ovlivnit výsledek SCT, nelze upřednostnit jeden určitý přístup v prevenci GVHD. Intenzita profylaktické imunosuprese by měla být u každého nemocného podstupujícího SCT volena individuálně, na základě důkladného zhodnocení všech prognostických faktorů a transplantacních rizik. Podpořeno Výzkumným záměrem MŠMT MSM-6198959205.

1784.

Polyfunkční CMV-specifické T-buňky jsou znakem úspěšné obrany proti reaktivaci CMV u dětí po HSCT

Kalina Tomáš, Król Ladislav, Kotus Dušan, Stuchlý Jan, Hubáček Petr, Sedláček Petr, Starý Jan, Hrušák Ondřej
(Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2.LF a FN Motol, Praha)

Cytomegalovirus (CMV) způsobuje závažné infekční komplikace u imunokompromitovaných pacientů po transplantaci kmenových buněk krvetvorby (HSCT). Studovali jsme četnost a funkční profil CMV-specifických T lymfocytů u zdravých dobrovolníků a u dětských pacientů po HSCT s cílem zjistit, které parametry mohou být známkou účinné kontroly CMV reaktivace. Pro studium CMV-specifických T lymfocytů jsme použili polychromatickou průtokovou cytometrii. Po krátkodobé in vitro stimulaci mononukleárních buněk periferní krve jsme stanovili produkci interferonu gamma (IFN γ), interleukinu-2 (IL2), expresi kostimulační molekuly CD40L a degranulaci pomocí CD107a u 191 vzorků od 118 pacientů a dobrovolníků. Zjistili jsme, že u pacientů, kteří byli schopni kontrolovat CMV reaktivace byly zastoupeny CD8+ T-lymfocyty produkující zároveň IL2 a IFN γ , jež u CMV nekontrolovaných pacientů chyběly. Nejčetnějšími CD8+ T-lymfocyty byly buňky produkující pouze IFN γ , které však neměly vztah ke kontrole CMV reaktivace a považujeme je tedy spíše za paměťové T-lymfocyty. Analýza vztahů mezi všemi typy funkční odpovědi metodou hierarchického klastrování ukázala, že tyto IFN γ produkující T-lymfocyty nejsou v souhře s ostatními polyfunkčními T-lymfocyty. Naše práce odhaluje funkční parametry T-lymfocytů, jež jsou potřebné pro monitora-

ci úspěšné imunitní odpovědi proti CMV po HSCT. Zároveň poskytuje možnost nové interpretace řady předešlých studií, které se omezily jen na detekci produkce IFNg. Podpořeno grantem IGA-NS/9996-4 a MZO 000064203

MORFOLOGIE II.

1851.

Vztah cytologických charakteristik a cytogenetických změn u nemocných s chronickou lymfatickou leukémií

Procházka Vít, Faber Edgar, Papajík Tomáš, Urbanová Renata, Lapčíková Anna, Juráňová Jarmila, Jarošová Marie, Indrák Karel

(Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc)

Úvod: Chronická lymfatická leukémie (CLL) je nejčastější leukémií dospělého věku. Klinický průběh a odpověď na terapii je extrémně variabilní. Suspicion na CLL je často vyjádřeno regionálním hematologem na základě klinického vyšetření a nátěru periferní krve. Cíl: Cílem sdělení je poskytnout přehled cytologických změn buněk CLL a jejich vztahu ke klinicky významným cytogenetickým změnám. Metoda: V éře moderní imunochemoterapie jsou nejsilnějším prediktorem přežití cytogenetické změny nádorových buněk. Od roku 2000, kdy byl publikován vliv „standardních“ cytogenetických změn (delece 17p, delece 11q, trisomie 12q a delece 13q) na prognózu, byla publikována řada dalších „přídavných“ chromosomových změn. Jakkoli je vztah mezi atypickou morfológií buněk CLL a prognózou nemocných znám – vztah mezi genetickými změnami a vzhledem buněk byl dosud studován jen minimálně. V éře virtuální mikroskopie a možnosti efektivního sdílení obrazů (telehematologie) získáváme nástroj pro maximální využití morfológie buněk jako doplňkového nástroje predikce prognózy onemocnění. Autoři budou prezentovat vlastní výsledky cytologické analýzy za pomoci systému CellaVision DM 96 a Expert viewer (Sysmex®) a demonstrovat vztah cytologických rysů a cytogenetických změn nádorových buněk. Závěr: Hodnocení kvalitních standardizovaných a precizních cytologických preparátů může přispět k hodnocení prognózy nemocného s CLL v co nejširším kontextu ostatních vyšetřovacích metod. Podpořeno granty: MSM 6198959205 a ESF CZ.1.07/2.2.00/07.0294.

1717.

Prínos klasické histopatologické analýzy pre dnešnú modernú interdisciplinárnu diagnostiku malobunkových B-NHL

Plank Lukáš (Ústav patologickej anatómie a Konzultačné centrum biopтической diagnostiky ochorení krvotvorby JLF UK a MFN a Martinské biopické centrum, s.r.o., Martin-SK)

Malobunkové B-NHL predstavujú heterogénnu skupinu nádorov, ktorú možno rozdeliť na 1) častejšie indolent-

né B-NHL (CLL/SLL, FL a NHL B-buniek marginálnej zóny MALT-typu), 2) menej časté indolentné B-NHL (LPL a Waldenströмова makroglobulinémia, splenický a nodálny lymfóm z B-buniek marginálnej zóny a HCL), 3) agresívnejší B-NHL typu MCL. Základom ich histopatologickej diagnostiky je identifikácia nasledovných črt: a) histocytologická verifikácia dominujúcich „malých lymfoidných buniek“ s nulovou alebo nízkou prímесou „blastov“ /okrem blastoidného MCL/, b) nízkej mitotickej aktivity /s výnimkou MCL a niektorých FL G1-2/, c) rozsah nádorovej infiltrácie v tkanive (parciálna versus totálna infiltrácia orgánu), d) spôsob rastu (difúzny, folikulový/nodulárny, pseudonodulárny, pseudofolikulový, na spôsob plášťovej, resp. marginálnej zóny), e) črt leukemizácie, infiltrácie tkanivových štruktúr orgánu, f) identifikácia prípadnej plazmocytovej alebo plazmocytoidnej diferenciácie nádorových buniek, ako aj f) identifikácia prípadnej veľkobunkovej transformácie primárne malobunkového B-NHL. Všetky uvedené histopatologicky identifikovateľné črty sú výsledkom interakcie vlastností nádorovej bunky a miestneho mikroprostredia. Medzi najdôležitejšie vlastnosti nádorovej bunky patrí zachovanie vlastností jej fyziologického proťajšku na príslušnom vývojovom stupni B-bunkového radu, zmeny pod vplyvom jej genetickej výbavy a produkcie tzv. homing receptora alebo iných funkčne podobných mediátorov (napr. integrínov), ako aj potenciál veľkobunkovej transformácie. Medzi najdôležitejšie vplyvy mikroprostredia patrí miestna tkanivová a bunková výbava, ako aj protinádorová T-lymfocytová alebo aktivácia histiocytov a epiteloidných buniek (vrátane tzv. sarkoid-like reakcie). Tieto vplyvy môžu predstavovať prognosticky významný parameter ochorenia a v extrémnych prípadoch „prekryť“ vlastnú nádorovú proliferáciu a sťažiť jej diagnostickú identifikáciu. Všetky uvedené črty sú dôležité pre biopickou diagnostiku a súčasne umožňujú pochopiť biologickú podstatu a klinickú manifestáciu ochorenia. Nie sú stabilné a v priebehu ochorenia sa môžu meniť a vyžadujú neraz rebiopické vyšetrenie. Ani pri zvyšovaní dostupnosti fenotypových a genotypových analýz B-NHL ich význam neklesá a tieto parametre sú výhodné aj z hľadiska časových a ekonomických nárokov diagnostického procesu. Podpořené projektom Centra excelentnosti pre perinatologický výskum na JLF UK v Martine (IMTS kód 26220120016).

1836.

Hodgkinův lymfom. Klasifikace WHO 2008 a problémy diferenciální diagnostiky

Boudová Ludmila, Veselá Pavla, Fakan František, Michal Michal (Šiklův patologický ústav, Plzeň)

Podle klasifikace WHO by se měl užívat název Hodgkinův lymfom (HL), neboť je prokázána lymfoidní povaha nádorových buněk, které jsou v naprosté většině B-původu. Starší názvy jsou lymfogranulomatóza, (maligní) lymfogranulom a Hodgkinova choroba. Hodgkinovy lym-

fomy dělíme na 2 zásadní podskupiny: klasický Hodgkinův lymfom (classical HL, cHL, 95% případů) a nodulární HL s lymfocytární predominancí (nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma, NLPHL, dříve nodulární paraganulom, 5% případů). Tyto dvě kategorie se liší: 1. klinickými vlastnostmi 2. nádorovými buňkami (morfologií a imunofenotypem) 3. nenádorovým pozadím (složením a architekturou) V rámci cHL rozlišujeme další 4 subtypy: nodulární sklerózu, smíšenou celularitu, cHL bohatý na lymfocyty (lymphocyte rich cHL – nejnovější podtyp) a lymfocytární depleci. Ve všech jsou podobné nádorové buňky: Reedové-Sternbergovy (RS, velké dvojjaderné s bohatou cytoplazmou, v každém jádře eozinofilní jádérko) a Hodgkinovy (H, jednojaderné – jinak obdobného vzhledu jako RS). Typicky exprimují CD30 a často i CD15, některé B-markery. RS jsou diagnostické buňky (bez nich nemůžeme stanovit diagnózu cHL). Pozadí cHL tvoří většinou malé T-lymfocyty, dále granulocyty, histiocyty, plazmatické buňky, fibroblasty. Subtypy cHL se však od sebe také liší – klinicky a morfologicky (složením pozadí, architekturou, počtem a stupněm atypie nádorových buněk, pozitivitou viru Epstein-Barr (EBV)). NLPHL se od cHL liší morfologicky i klinicky. Nádorové buňky se nazývají LP (lymphocyte predominance, dříve LH - lymphocytic and histiocytic) neboli “popcorn cells” (jádro vypadá jako pražená kukuřice). Považují se za zvláštní varianty RS buněk, které neexprimují CD30 a CD15, ale zato silně CD20 a často i epiteliální membránový antigen. Nemocní přicházejí ve stadiu I či II a mívají - i přes časté relapsy - výbornou prognózu. Problémy patologické diferenciální diagnózy vystávají zejména v těchto oblastech: 1. cHL versus lymfadenitida, zejména herpetická (EBV) 2. cHL versus DLBCL – pro hraniční neklasifikovatelné případy oddělila klasifikace WHO 2008 zvláštní kategorii 3. NLPHL versus DLBCL – zejména T-cell histiocyte rich B-cell lymphoma (THRBCL – B-lymfom bohatý na T-lymfocyty a histiocyty) 4. cHL, zejména NS, versus ALCL (anaplastic large cell lymphoma, anaplastický velkobuněčný lymfom) 5. NLPHL versus LR cHL

XIV. KONFERENCE OŠETŘOVATELSKÝCH PROFESÍ V HEMATOLOGII

1690.

Duchovní péče a kvalita života u hematologických nemocných

Čermáková Markéta, Murdychová Eva

(Ústav pro humanitní studia v lékařství I. LF UK, Praha; I. interní klinika hematologie VFN a I. LF UK, Praha)

Kvalitu života zkoumá mnoho oborů. Lze na ni nahlížet z mnoha úhlů. Samotnou kvalitu života můžeme rozdělit do tří rovin – roviny tělesné, jejíž metou je zdraví, duševní, jejímž cílem je štěstí a duchovní, která hledá smysl života, konkrétní životní situace atp. V tomto sdělení se zaměříme na duchovní, spirituální rovinu. Nemocniční ka-

plan je na naší 1. interní klinice hematologie VFN a I. LF UK v Praze součástí multidisciplinárního týmu, jako je to běžné ve většině západní zemí. Poskytuje neevangelizační službu, která není nijak denominačně limitována a je v kontextu se standardy Evropské sítě nemocničních kaplanů. Nemocniční kaplan pečuje o obecnou spiritualitu všech pacientů, kteří mají možnost se rozhodnout, jestli tuto službu chtějí využít nebo ne. Plně respektuje autonomii nemocných. Nemocniční kaplan slouží nejenom pacientům a jejich blízkým, ale i zdravotnickému personálu. Svou přítomností kultivuje a tím i zkvalitňuje prostředí kliniky. V rozhovorech s pacienty se často věnuje smyslu života pacientů, smyslu jejich aktuální životní situace a pomáhá jim vidět jejich život a další možnosti z různých úhlů. Doprovází pacienty po dobu opakovaných hospitalizací a je jim emocionálně i duchovně bezpečným průvodcem. Díky tomu, že slouží nejen nemocným ale i zdravotníkům, může pomoci řešit případné konflikty, které mohou v náročném prostředí hematologie nastat. Pomáhá pacientovi nahlížet na problém očima sestry a sestřím očima pacienta. Jelikož chceme na naší klinice poskytovat komplexní péči, a tím zvyšovat kvalitu života našich nemocných, spolupracujeme i s občanským sdružením Lymfom Help, které podporuje pacienty s maligním lymfomem, jejich rodiny a blízké. Pro hospitalizované pacienty máme společný projekt Doprovázení pacientů s lymfomem, ve kterém bývalí pacienti, kteří mají min. 1 rok od ukončení léčby, doprovázejí většinou nově diagnostikované pacienty a předávají jim své zkušenosti s nemocí a léčbou.

1808.

Multikulturní ošetrovatelství ve zdravotnickém zařízení

Kratochvílová Lucie, Murdychová Eva

(I. Interní klinika Hematologie, VFN, Praha)

Multikulturní ošetrovatelství ve zdravotnickém zařízení zaměřená na teorii i praxi multikulturního přístupu v ošetrovatelství. Cílem práce je jednak pozorovat úroveň informovanosti osob pracujících ve zdravotnictví a poukázat na nebezpečí jistého kulturního nedorozumění, které může plynout z neznalosti specifických potřeb etnických či národnostních skupin, s nimiž se může zdravotnický personál ve své praxi setkat. Dalším cílem je zjistit možné nedostatky v ošetrování osob vietnamské národnosti. Metodou vedoucí k zjištění údajů byl dotazníkový průzkum na odborných pracovištích nemocnice v Praze. Dotazník v počtu šedesáti kusů byl koncipován jako zjednodušený test znalosti z oblasti multikulturního ošetrovatelství, přitom důraz byl kladen na specifika péče o osoby vietnamské národnosti. Shromážděné dotazníky byly vyhodnoceny a jejich výsledky zpracovány do grafů, čímž bylo možno upozorovat a porovnávat konkrétní zjištěná fakta, která byla dále zdrojem pro závěrečnou část práce, pojednává o výsledcích výzkumu. Uvedené výsledky se shodují s předem stanovenými hypotézami. Bylo tedy zjištěno, že informovanost sester v oblasti multikulturního ošetrovatelství ne-

ní vysoká. Na základě zjištěného jsem se pokusila navrhnout opatření vedoucí ke zlepšení situace v dané oblasti.

1634.

Zkušenosti sestry jako operátora separátorů při registraci údajů do Světového hemaferetického registru

Tomšová Hana, Strnadová Blanka, Kňourková Ludmila, Bláha Milan (*II. interní klinika - OKH, Separátorové centrum, Hradec Králové*)

ÚVOD: Léčebné hemaferézy jsou poměrně komplikované a ekonomicky náročné procedury. Je velmi užitečné registrovat údaje o jejich průběhu ve světovém registru a tak získávat mnohem větší zkušenosti zejména u chorob, které nejsou časté. R.2003 vznikl světový registr (WAA - World Apheresis Registry), do kterého se naše pracoviště přihlásilo. Od obdržení samostatného kódu zasíláme údaje o procedurách e-mailem do centra, které je analyzuje (na podkladě zásad quality assurance measurements). **METODIKA A SOUBOR NEMOCNÝCH:** WAA je řízen z centrály v Umea ve Švédsku, která analyzuje údaje. Registrujeme všechny terapeutické hemaferézy. Každý pacient je kódován a jsou registrovány podrobné údaje o průběhu procedur, např. typ procedury a přístrojů, použité roztoky a jejich spotřeba, nežádoucí příhody během léčby, způsob žilního přístupu atd. Relativně podrobně je zaznamenáván výskyt vedlejších reakcí a okamžité hodnocení klinického stavu. Zápis provádí sestra (operátorka) hned po ukončení procedury. **VÝSLEDKY:** Dosud jsme registrovali 1886 procedur u 314 nemocných. Vedlejších příhod bylo registrováno 5,8%. Počáteční chyby při registraci odstraňovala centrála po vzájemné dohodě. Analyzované výsledky jsou z centra pro naše pracoviště zasílány pravidelně ročně anebo na vyžádání. Spojení s centrem je bez obtíží i pro dotazy, také technika záznamu se stala rutinní záležitostí. Po jistém zácvičku je zadávání údajů záležitostí několika minut. **DISKUSE:** Registrace hemaferéz je důležitým předpokladem pro validaci výkonů, kontrolu výskytu vedlejších reakcí a srovnávání výsledků činnosti s jinými centry. Po krátkém zacvičení provádějí registraci bez obtíží sestry. separátorového centra ihned po výkonu. Registr je veden v angličtině, ale základní seznam slov nebylo těžké zvládnout. Plánuje se však přeložení dat do češtiny. **ZÁVĚR:** Registr umožňuje relativně jednoduše a bezplatně vyhodnocování vlastních výsledků a porovnávání s ostatními centry na základě posledních poznatků vědy. Práce je podporována granty IGA MZ ČR NS/9743-4, MZO 00179906, MSM 0021620820.

1622.

Problematika ošetrovatelské péče o žilní porty

Vodičková Petra, Šemrová Lucie (*HOO FN, Plzeň*)

Potřeba zajištění dlouhodobého přístupu do žilního řečiště vedla k vývoji systémů, které tento opakovaný přís-

stup umožňují a současně minimalizují rizika související s implantací cizorodého materiálu. Jedním z nich je žilní port, který je typem permanentního centrálního žilního katétru se speciálním zakončením. Jedná se o komůrku se silikonovou membránou, která je umístěná v podkoží a ze které vede katetr do centrální žíly. Takový vstup je bezpečný a při správném ošetřování jej lze používat po dobu několika let. Zavedení žilního portu je jednoduchý výkon, jeho průběh bývá nekomplikovaný a port samotný je pacientem obvykle dobře snášen. Během několika posledních let se žilní porty staly běžnou součástí léčby různých chronických onemocnění, nejčastěji jsou využívány u pacientů s maligním onemocněním k podávání opakovaných cyklů protinádorové chemoterapie. Výhody využívání portů lze spatřit nejen ve snížení nutnosti a počtu invazivních výkonů k při podávání chemoterapie, jako je např. zavedení centrálního žilního katétru. Umožňují volnost pohybu pacienta během aplikace cytostatik, lze jej použít k odběrům krevních vzorků i k podávání léčiv potřebných k udržení uspokojivého celkového stavu pacienta. Kvalitní ošetrovatelská péče o žilní port je základním předpokladem pro jeho dlouhodobou a bezproblémovou funkci. Pro péči o žilní port platí speciální zásady, mezi které patří např. používání Hubertovy jehly o správné délce a průměru, proplachování a uzavírání žilního portu heparinovou zátkou po ukončení léčby, proplachy nepoužívaného portu. Nezbytnou součástí péče je edukace pacienta. Efektivní komunikace a dostatek informací je motivací k aktivnímu zapojení pacienta do péče o svůj port. Autorky ve svém sdělení prezentují problematiku ošetrovatelské péče o žilní porty včetně edukace pacientů.

1854.

Incidence plicních a bronchiálních infekcí u pacientů po transplantaci krvevorných buněk realizovaných v pokojích s HEPA a bez HEPA filtrace vzduchu - observační studie

Bystřická Eva, Brandejsová R., Ščudlová Jana, Vokurka Samuel (*HOO FN, Plzeň; HOK FN, Olomouc*)

Úvod: Reverzní izolace je formou přísného bariérového ošetrovatelství. Cílem této izolace je ochránit imunitně oslabené pacienty, např. po transplantaci krvevorných buněk, před infekcí. Jsou realizovány různé postupy s cílem zabránit přenosu infekce přímým kontaktem, vzduchem, vodou a potravinami. Existují však významné rozdíly v rozsahu a charakteristikách reverzní izolace mezi jednotlivými centry a podle některých studií je účinnost přísné izolace transplantovaných pacientů – s výjimkou základního bariérového ošetrovatelství (pečlivá hygiena rukou) - diskutabilní a kontroverzní. HEPA (High efficiency particulate air) filtrace minimalizuje mikrobiální kontaminaci vzduchu v HEPA filtrovaných pokojích. HEPA filtrace je obecně doporučována při transplantacích krvevorných buněk, především pak u alogenních. Některá centra však takovou filtraci nemohou zajistit nebo ji nemají. Publikované zkušenosti s transplantacemi bez za-

jištěné HEPA filtrace vzduchu se jeví jako dobré. Tato sledovací studie si klade za cíl zmapovat dostupnost HEPA filtrací vzduchu u transplantčních center a analyzovat výskyt plicních a bronchiálních infekcí v případech zajištěné a nezajištěné HEPA filtrace vzduchu. Metodika: sledovací, prospektivní, nerandomizovaná, srovnávací multicentrická studie. Sledování: Monitorovací karta: věk, pohlaví, diagnóza, přípravný režim, typ transplantace, type filtrace transplantčního pokoje, antimikrobiální profylaxe, trvání neutropenie $<1,0 \times 10^9/l$, den dimise po transplantaci, výskyt plicní nebo bronchiální infekce s případnou definicí patogenu, den rozvoje infekce, léčba kortikoidy v době rozvoje infekce, stavební úpravy a rekonstrukce na transplantční jednotce v období posledních 12 měsíců, pravidelné revize funkčnosti a účinnosti HEPA filtrace) Přesný popis nové studie i první zkušenosti s monitorací pacientů uvedou autoři v příspěvku.

1855.

Možnosti, přehled a aktivity sester v rámci profesních a odborných hematologických skupin

Bystřická Eva, Koukalová Alena, Kajaba Václav
(HOO FN, Plzeň; FN, Olomouc; HOK FN, Olomouc)

Souhrn nedodán.

CLL II.

1702.

Rituximab v kombinaci s vysokodávkovaným Dexamethasonem: efektivní léčebná modalita u pacientů s relabující/refrakterní chronickou lymfocytární leukemií

Panovská Anna, Šimkovič Martin, Belada David, Hrudková Monika, Smolej Lukáš, Mayer Jiří, Doubek Michael
(Interní hematologická klinika LF MU a FN, Brno; 2. Interní klinika - oddělení klinické hematologie FN a LF UK, Hradec Králové)

Úvod: Pacienti s refrakterní chronickou lymfocytární leukemií (CLL) mají nepříznivou prognózu. Režimy s vysokodávkovanými (HD) kortikosteroidy se zdají být slibnou modalitou pro tyto pacienty. Kombinace HD methylprednisolonu s rituximabem (R-HDMP) je efektivní, avšak často provázena závažnými infekčními komplikacemi. Pilotní data naznačují, že kombinace rituximabu s dexamethasonem (R-Dex) poskytuje srovnatelné výsledky s nižší toxicitou. Cíle a Metodika: Provedli jsme retrospektivní analýzu účinnosti a bezpečnosti R-Dex u pacientů léčených ve dvou českých centrech od 4/2006 do 2/2010 dvěma variantami R-Dex: rituximab 500mg/m² v den 1, 8, 15 a 22 (375mg/m² v 1. cyklu) a 4 týdny (n=25) nebo rituximab 500mg/m² v den 1 (375mg/m² v 1. cyklu) a 3 týdny (n=16). Dávka dexamethasonu byla 320mg v 1 cyklu (40mg v den 1-4 a 10-13/15-18). Vý-

sledky: R-dex byl podán 41 pacientům (19 mužů) s CLL a indikací k léčbě dle NCI-WG, medián věku 68 let (44-81). Autoimunitní hemolytická anemie či trombocytopenie byla jedinou indikací k léčbě u 7 pacientů. Stadium Rai III/IV bylo přítomno u 37/41 pacientů. Nemutované IgVH geny mělo 24 z 29 vyšetřovaných, cytogenetické aberace detekované FISH (n=33) - del 17p u 7 pacientů, del 11q u 11, del 13q u 15 a trisomie 12 u 5 pacientů. Medián předchozích terapií byl 2 (0-8), 29/41 pacientů bylo předlčeno fludarabinovým režimem. Efekt R-Dex u pacientů bez hemolýzy (n=32): celková odpověď (ORR), n=21 (62%), kompletní remise (CR), n=6 (18%), parciální remise (PR), n=15% (44%), stabilní choroba (SD), n=4 (12%) a progresse onemocnění (PD), n=5 (15%). Všichni pacienti léčení R-Dex pro autoimunitní cytopenii dosáhli CR. Toxicita stupně III/IV včetně infekcí se objevila u 13 pacientů (32%), steroidní diabetes u 6 (15%) a vedlejší účinky spojené s infuzí rituximabu u 3 pacientů (7%). V době analýzy (2/2010) byl medián doby bez progresse (PFS) 9 měsíců, medián celkového přežití (OS) nebyl dosažen. Nebyl nalezen významný rozdíl v ORR i PFS mezi 2 variantami R-Dex. Závěr: Naše data ukazují, že R-Dex je nadějnou a efektivní terapií pro pacienty s refrakterní CLL, zvláště provázené imunitní cytopenií. Infekční komplikace zůstávají závažným tématem. Dlouhodobá kontrola CLL může být očekávána pouze u menšiny pacientů. Vyšší dávka rituximabu během cyklu nevedla ke zvýšení účinnosti režimu. Podpořeno výzkumnými granty MZO 00179906 MZ ČR, MSM 0021620808 MŠMT ČR a Českou leukemickou skupinou – pro život (CELL).

1762.

TP53 Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia: Analysis of 2,435 Consecutive CLL Samples

Peková Soňa, Mazal Oldřich, Čmejla Radek, Plachý Radek, Žejšková Lenka, Karas Michal, Smolej Lukáš, Kozák Tomáš
(Chambon, a.s., Laboratoř molekulární diagnostiky, Praha; Hematologicko-onkologické oddělení FN, Plzeň; Oddělení klinické hematologie, FN, Hradec Králové; Oddělení klinické hematologie, FN Královské Vinohrady, Praha)

Background: TP53 plays pivotal role in the process of DNA repair and apoptosis. In 10-20% of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) the TP53 pathway is affected by genomic TP53 mutation, aberrant mRNA splicing or by dysfunction of cooperating protein partners. It has been reported that in CLL, chemotherapy induces evolution of TP53 mutated subclones that might lead to the progression of the disease. In our study (from January 2005 to December 2009), we have analyzed TP53 mutation status in 2,435 consecutive CLL samples, including 1,287 diagnostic samples and 1,148 samples during the follow-up. The follow-up comprised 181 CLL patients, for whom clone-specific assays to monitor minimal residual disease have been prepared. Aims: The aim of the

study was to address mutational status of TP53 gene, modes of inactivation/modulation of the TP53 gene and the possibility of clonal evolution of TP53 mutated subclones in a large cohort of 2,435 CLL patients. Methods: At the time of diagnosis, mutational status of TP53 gene was determined using direct sequencing and functional assay FASAY. Assays to monitor minimal residual disease (MRD) have been prepared based on the sequence of clonal IgVH rearrangement(s) identified at the time of diagnosis. Nine temperature-sensitive mutants TP53 and a novel splicing variant delta ex6 were molecularly cloned and characterized. Results: In 237 out of 1,287 diagnostic CLL samples we have identified TP53 variants (18.4%), including point mutations, insertions, deletions, temperature-sensitive mutations and aberrant splicing variants. Most of them have fully penetrant transactivation-defective mutant phenotype in vitro; 10 mutants display temperature-sensitive properties with mutant phenotype at permissive conditions and wild type phenotype at non-permissive conditions. In 1,148 follow-up samples analyzed for the MRD level in 181 CLL patients undergoing chemo/immunotherapy or bone marrow transplant we have never observed clonal TP53 evolution. Summary/Conclusions: TP53 mutations/variants are diverse. The majority of TP53 mutations/variants are activating, some of them have unusual characteristics (e.g. temperature sensitivity), or might represent aberrant splicing isoforms expressed at variable levels over the time. Moreover, results based on 1,148 follow-up CLL samples indicate that evolution of mutated TP53 subclones triggered by chemotherapy does not seem to play a major role in CLL progression.

1649.

Resekvenační mikročipy: nástroj pro výzkum a diagnostiku chronické lymfocytární leukémie

Lochmanová Jana, Tichý Boris, Plevová Karla, Dobeš Petr, Navrkalová Veronika, Malčíková Jitka, Ročňová Ludmila, Mráz Marek, Zelený Jaroslav, Dvořáková Barbora, Mayer Jiří, Trbušek Martin, Pospíšilová Šárka
(*Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika FN a LF MU, Brno; Interní hematologická klinika FN a LF MU, Brno*)

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je lymfoproliferativní onemocnění s vysoce variabilním klinickým průběhem. Mezi nejvýznamnější prognostické faktory patří mutační status genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (IgVH) a přítomnost chromozomálních aberací (del 13q14, del 17p13, del 11q22 a trizomie 12). Byla také popsána souvislost mezi mutacemi v tumor-supresorových genech (např. TP53, ATM) a rezistencí na léčbu a/nebo progresí choroby, v patogenezi CLL mají význam také microRNA. Cílem této práce bylo zavést rychlou a spolehlivou metodiku pro sekvenování vybraných genů, u nichž se předpokládá, že by změna jejich sekvence mohla mít negativní vliv na patogenezi CLL a/nebo terapeutickou odpověď. Byly vybrány zejména geny obsahující velký počet exonů, jejichž přímé sekvenování by bylo příliš náročné. Resekvenační mikročip (platforma Affymetrix, 50K) byl navržen pro exony a sestřihová místa exon/intron následujících genů: TP53, ATM, BCL6, RB1, CDKN2A, C-MYC, FAS, SH2D1A, SOCS1 a 110 pre-microRNA, jejichž sekvence zahrnuje přibližně 20 nukleotidů z pri-microRNA. Vybrané geny byly amplifikovány z genomové DNA metodou long-range PCR. Amplikony byly ekvimolárně smíchány; směs amplikonů fragmentována a fluorescenčně naznačena; produkty byly hybridizovány s mikročipem. Pro analýzu byli vybráni zejména vysoce rizikové CLL pacienti. Dosud byly sekvenovány vzorky od 29 CLL pacientů (14 pacientů s mutací v genu TP53; 14 pacientů s delecí ATM ve více než 90% CLL buněk; 1 pacient bez aberací) a 11 zdravých dárců. Všechny missense mutace a polymorfismy v genu TP53, které byly již dříve prokázány funkční analýzou FASAY s následným sekvenováním, byly na mikročipu zachyceny. Krátké (1-2 nt) a dlouhé delece (desítky nt) byly detekovány pouze v případě delece druhé alely v genu TP53 (I-FISH). U pacientů s delecí ATM bylo prozatím detekováno 7 mutací a 4 známé polymorfismy. V genech pro microRNA bylo detekováno 11 známých polymorfismů (4 v pri-microRNA; 6 v pre-microRNA; jedna v maturované microRNA). Z našich výsledků vyplývá, že resekvenační mikročip je vhodným nástrojem pro předběžnou mutační analýzu, zejména u genů s velkým počtem exonů. U vytipovaných oblastí je vhodné ověřit výsledky přímým sekvenováním. Ve srovnání s klasickým sekvenováním je použití resekvenačních mikročipů robustnější, levnější a časově méně náročné. Práce byla podpořena granty IGA MZČR NS10439-3/2009, NR9858-3/2009, MSMT MSM0021622430, MUNI/A/1012/2009.

kou odpověď. Byly vybrány zejména geny obsahující velký počet exonů, jejichž přímé sekvenování by bylo příliš náročné. Resekvenační mikročip (platforma Affymetrix, 50K) byl navržen pro exony a sestřihová místa exon/intron následujících genů: TP53, ATM, BCL6, RB1, CDKN2A, C-MYC, FAS, SH2D1A, SOCS1 a 110 pre-microRNA, jejichž sekvence zahrnuje přibližně 20 nukleotidů z pri-microRNA. Vybrané geny byly amplifikovány z genomové DNA metodou long-range PCR. Amplikony byly ekvimolárně smíchány; směs amplikonů fragmentována a fluorescenčně naznačena; produkty byly hybridizovány s mikročipem. Pro analýzu byli vybráni zejména vysoce rizikové CLL pacienti. Dosud byly sekvenovány vzorky od 29 CLL pacientů (14 pacientů s mutací v genu TP53; 14 pacientů s delecí ATM ve více než 90% CLL buněk; 1 pacient bez aberací) a 11 zdravých dárců. Všechny missense mutace a polymorfismy v genu TP53, které byly již dříve prokázány funkční analýzou FASAY s následným sekvenováním, byly na mikročipu zachyceny. Krátké (1-2 nt) a dlouhé delece (desítky nt) byly detekovány pouze v případě delece druhé alely v genu TP53 (I-FISH). U pacientů s delecí ATM bylo prozatím detekováno 7 mutací a 4 známé polymorfismy. V genech pro microRNA bylo detekováno 11 známých polymorfismů (4 v pri-microRNA; 6 v pre-microRNA; jedna v maturované microRNA). Z našich výsledků vyplývá, že resekvenační mikročip je vhodným nástrojem pro předběžnou mutační analýzu, zejména u genů s velkým počtem exonů. U vytipovaných oblastí je vhodné ověřit výsledky přímým sekvenováním. Ve srovnání s klasickým sekvenováním je použití resekvenačních mikročipů robustnější, levnější a časově méně náročné. Práce byla podpořena granty IGA MZČR NS10439-3/2009, NR9858-3/2009, MSMT MSM0021622430, MUNI/A/1012/2009.

1813.

Charakteristiky pacientů s B chronickou lymfatickou leukémií (B-CLL) se subgeny V1-69 a V3-21 IgVH

Urbanová Renata, Procházka Vít, Papajík Tomáš, Turcsányi Peter, Plachý Radek, Schillerová Lenka, Pikalová Zuzana, Holzerová Milena, Jarošová Marie, Zapletalová Jana, Indrák Karel
(*Hemato onkologická klinika FN, Olomouc; Ústav lékařské biofyziky LF UP, Olomouc*)

Úvod: Nemutovaný stav IgVH je nezávislý nepříznivý prognostický faktor u pacientů s B-CLL stejně jako přítomnost chromozomálních aberací, delece 17p a 11q. Současně je studován vliv subgenů IgVH na vývoj onemocnění a posuzován jejich význam jako možných prognostických faktorů. Cíl: Analyzovat soubor pacientů s B-CLL se subgeny V3-21 a V1-69 sledovaných na HOK FN Olomouc. Metody a výsledky: Mutační stav IgVH byl analyzován u 350 pacientů s B-CLL. Subgen V3-21 byl popsán u 6,2 % nemocných, z nichž 41 % mělo nemutovanou sekvenci IgVH, subgen V1-69 byl popsán u 13,5 % pacientů, z nichž 97,7 % mělo nemutovaný stav IgVH. Vysoce

rizikové aberace (11q-,17p a 6q-) byly detekovány metodou FISH u 37 % pacientů s V3-21 a u 56 % pacientů s V1-69. ZAP 70 pozitivních bylo 82 % pacientů s V3-21 a 100 % vyšetřených pacientů s V1-69. V souboru V1-69 byl popsán aberantní imunofenotyp ve 43 % pacientů a u 79% byla prokázána 100% homologie IgVH. Medián celkového přežití (OS) ve skupině u V3-21 dosáhl 108 měsíců (95% CI 54-125), u skupiny V1-69 pak 91,6 měsíců (95 % CI 78-104). Medián doby do zahájení léčby (TFS) ve skupině V3-21 byl 54 měsíců (95 %CI 29-87) ve skupině V1-69 58 měsíců (95%CI 40-76). Léčba: V souboru V3-21 bylo léčeno 86 % pacientů (18/22), celková léčená odpověď (ORR) v primoterapii byla 47 % (režim mabthera, fludarabin a cyklofosfamid R/FC byl použit u 42% léčených), u souboru V1-69 bylo léčeno 82 % pacientů (36/44), režim R/FC podán u 72% pacientů s ORR 72 %. Výsledky: V souboru V3-21 pacientů nebyl prokázán rozdíl v OS a TFS v závislosti na mutačním stavu IgVH ($p=0,8$ resp. $p=0,15$), naopak byl prokázán rozdíl v případě přítomnosti nepříznivých cytogenetických změn ($p=0,01$ resp. $p=0,05$) a prokázán rozdíl v závislosti na klinickém stádiu onemocnění Binet A/B,C ($p=0,007$ resp. $p=0,0003$). V souboru V1-69 pacientů nebyl prokázán rozdíl v OS a TFS v závislosti na přítomnosti nepříznivých cytogenetických změn ($p=0,316$ resp $p=0,086$) ani v závislosti na stádiu onemocnění Binet A/B,C ($p=0,097$ resp. $p=0,218$). Nebyl prokázán rozdíl v přežití souboru pacientů V3-21 a V1-69 ($p=0,275$). Závěr: U souboru pacientů V3-21 jsme neprokázali význam stanovení mutačního stavu IgVH na OS a TFS, naopak stanovení nepříznivých cytogenetických změn a pokročilého klinického stádia Binet B/C si prognostický význam na OS a TFS zachovává. U pacientů V1-69 ztrácí dle našich pozorování prognostický význam stanovení cytogenetických změn i stanovení klinického stádia onemocnění.

1723.

Prognostický význam stanovení proteinu ZAP-70 průtokovou cytometrií metodou střední fluorescenční intenzity (MFI) u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií.

Vroblová Vladimíra, Schmitzová Daniela, Jankovičová Karolína, Hrudková Monika, Peková Soňa, Vrbacký Filip, Kučerová Lenka, Krejsek Jan, Malý Jaroslav, Smolej Lukáš

(Ústav klinické imunologie a alergologie, LF UK a FN, Hradec Králové; II. interní klinika, Oddělení klinické hematologie, LF UK a FN, Hradec Králové; Laboratoře Chambon, a.s., Praha; Oddělení lékařské genetiky, LF UK a FN, Hradec Králové)

Úvod: Expres proteinu ZAP-70 patří mezi nejdiskutovanější prognostické faktory u chronické lymfocytární leukémie (CLL). Vliv na výsledek exprese ZAP-70 může mít řada faktorů: výběr klonu monoklonální protilátky, použití flurochromu, přímého či nepřímého značení či nastavení hranice pozitivivity. Hodnocení pomocí střední

fluorescenční intenzity (MFI) může eliminovat subjektivní chybu způsobenou při nastavování hranice pozitivivity izotypové kontroly. Dosud bylo však publikováno velmi málo zkušeností se stanovením ZAP-70 pomocí MFI. Cílem tohoto projektu proto bylo porovnání metod hodnocení ZAP-70 pomocí MFI a izotypové kontroly. Nemocní a metodiky: V letech 2005-2009 jsme stanovili expresi ZAP-70 u 138 nemocných s CLL (94 mužů a 44 žen; medián věku v době diagnózy 59 let; rozmezí 31-82 let). Expres ZAP-70 byla stanovena průtokovou cytometrií s použitím monoklonální protilátky konjugované s fykoerytrinem (PE), klon 1E7.2 (Caltag, USA). Výsledek exprese ZAP-70 byl hodnocen dvěma způsoby: Hranice pozitivivity u 1. metodiky byla stanovena dle externí izotypové kontroly. Vzorek byl považován za ZAP-70 pozitivní, pokud byla v oblasti CD19 pozitivních buněk exprese ≥ 20 % buněk. U druhé metody byl hodnocen poměr MFI ZAP-70 z oblasti T lymfocytů a CLL buněk; hranice pozitivivity byla stanovena na 3. Výsledky: Dle izotypové metody bylo ZAP-70 pozitivních 49 nemocných (36 %). Období do léčby (time to treatment, TTT) bylo kratší u ZAP-pozitivních nemocných (medián 29 vs. 44 měsíců, $p=0,06$). Také celkové přežití (overall survival, OS) bylo kratší u ZAP-pozitivních (medián 125 vs. 174 měs., $p=0,12$). Při hodnocení metodikou MFI bylo ZAP-70 pozitivních 43 pacientů (31 %). Použití MFI přineslo ve srovnání s izotypovou metodou lepší identifikaci nemocných s nepříznivým klinickým průběhem, a to jak ve smyslu významně kratšího TTT (medián 24 vs. 54 měsíců, $p=0,0003$), tak i OS (medián 97 vs 174 měs., $p=0,012$). Při kombinaci exprese ZAP-70 s expresí CD38 či mutačním stavem IgVH došlo ke zpřesnění prognostického zařazení oddělením podskupiny s nejdelším OS (ZAP-70 + CD38 negativní či ZAP-70 negativní + IgVH geny mutované, $p=0,047$ a $p=0,008$). Závěr: Naše data naznačují, že hodnocení exprese ZAP-70 u CLL metodikou MFI by mohlo lépe předpovědět klinický průběh onemocnění než hodnocení dle izotypové kontroly. Jednoznačná výhoda tohoto přístupu dále spočívá ve snížení subjektivity hodnocení. Podpořeno výzkumným záměrem MZO 00179906 Ministerstva zdravotnictví České republiky.

CML - EDUKAČNÍ SEKCE

BCR-ABL Peptide vaccines as immune target therapy for chronic myeloid leukemia

Bocchia M. (Siena-Italy)

The immunomodulatory effects of tyrosine kinase inhibitors

Porkka K. (Helsinki-Finland)

Advances in the management of newly diagnosed chronic myeloid leukemia

Olavarria E. (London, United Kingdom)

EDUKACE

1672.

SYSTÉM POSTGRADUÁLNÍHO VZDĚLÁVÁNÍ V HEMATOLOGII V EVROPĚ – PROJEKT EHA H-NET

Čermák Jaroslav, Hellström-Lindberg, Eva jménem Výboru pro vzdělávání EHA
(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Karolinska Institutet, Stockholm, Švédsko)

Jedním z projektů EHA je snaha sjednotit systém postgraduálního vzdělávání v hematologii v Evropě a vytvořit základy pro vzájemnou výměnu zkušeností a poznatků mezi lékaři v předatestační přípravě a vyučujících – mentorů v mezinárodním měřítku. Tento program nazvaný H-Net je podpořen i edukačním grantem Leonardo Evropské unie. V první části projektu bylo vytvořeno tzv. Evropské hematologické curriculum, navazující na tzv. Hematologický pasport (logbook). EHA curriculum obsahuje 5 okruhů otázek z různých oblastí klinické a laboratorní hematologie a transfuzního lékařství a je určeno již atestovaným lékařům, kteří mají vyjádřit své dovednosti a znalosti získané během předatestační přípravy hodnocením, do jaké míry jsou problém položený v dané otázce schopni samostatně řešit. Dotazník byl rozeslán všem atestujícím v rámci EU v letech 2004-2008, výsledky byly zpracovány na vzorku 6 vybraných zemích EU (včetně ČR). V oblasti týkající se chorob červené řady byla zjištěna velmi dobrá znalost u všech typů anemií, jedinou výjimkou byla překvapivě dědičná sférocytoza, kde znalosti prokázalo méně než 25% tázaných. Velmi dobré znalosti byly obecně zjištěny v hematologické onkologii, v okruhu týkajícím se transplantací prokázali poměrně dobré znalosti i hematologové z pracovišť, která sama netransplantují, určitou výjimku tvořily otázky týkající se po-transplantační péče a u všech dotazovaných kapitola týkající se zpracování štěpů. Nepříjemným zjištěním byla poměrně nízká kvalita odpovědí týkajících se hodnocení nátěrů kostní dřeně, biopsií a histologických preparátů, kde se ukazuje, že v řadě zemí toto hodnocení dělají specialisté hemato-patologové. Problémy činila i interpretace složitějších koagulačních nálezů, zejména na bázi molekulárně genetických metod a kupodivu i indikace různých antihemofilických přípravků, kde se zřejmě projevuje výrazná centralizace nemocných. Naopak, problémy nečinily otázky z transfuziologie, které se ale týkaly především indikací a způsobu podávání jednotlivých přípravků. Čeští atestanti prokázali velmi dobré znalosti v hematologické onkologii, koagulační a transfuzní problematice a poměrně dobré znalosti v transplantační hematologii, horší výsledky měli v laboratorní hematologii – morfologii a zejména průtokové cytometrii. Program bude pokračovat prospektivně ve skupině vybraných hematologů recentně zařazených do oboru, kteří by se měli zúčastnit mezinárodního stu-

dijního programu s mentory z jednotlivých evropských zemí.

1756.

Diagnostika a léčba systémové mastocytózy

Kozák Tomáš, Doubek Michal, Polívka Jindřich, Jankovská Milada, Peková Soňa
(OKH FN Královské Vinohrady, Praha; IHOK FN, Brno; Laboratoř molekulární diagnostiky, Chambon a.s., Praha)

Systémová mastocytóza (SM) je vzácné myeloproliferační klonální onemocnění samostatné linie mastocytů. Symptomatologie SM je spojena jednak s příznaky z uvolňování vasoaktivních mediátorů (histamin, VEGF, prostagalandy, atd.), jednak s projevy nádorového TNF- onemocnění s infiltrací kostní dřeně a jiných orgánů. SM může doprovázet jiné hematologické klonální onemocnění (SM-AHNMD). WHO rozlišuje dle kliniky a laboratorních projevů 4 základní typy SM: indolentní SM, SM-AHNMD (s mastocytózou spojené hematologické klonální nemastocytární onemocnění), agresivní SM (ASM) a mastocytární leukémie (MaCL). V našem souboru 30 pacientů je 11 mužů a 19 žen, věkový medián v době stanovení diagnózy byl 55,5 roku (25 – 79). Ve 4 případech šlo o agresivní formu SM, u 5 pacientů probíhalo současně jiné hematologické onemocnění (MDS, AML, 2 x NHL, ET), u 19 pacientů se jednalo o indolentní formu SM, 2 pacientů šlo o MaCL. FIP1L1/PDGFRA a mutace v c-kit byly vyšetřeny u 26 pacientů. U žádného pacienta nebyl nalezen FIP1L1/PDGFRA, mutace c-kit byla pozitivní u 12 pacientů (40%). Urticaria pigmentosa byla přítomna celkem u 9 pacientů. Anafylaktické reakce spojené s vyplavením vasoaktivních mediátorů byly projevem nemoci u 7 pacientů. Osteolytická ložiska nebo těžká osteoporóza s patol. frakturami byly přítomny u 4 pacientů. Terapie interferonem alfa byla zahájena v 1. linii u 11 pacientů, u jedné pacientky prokazatelně snížila frekvenci anafylaktických epizod a vedla k ústupu infiltrace kostní dřeně. Pacienti se SM-AHNMD byli léčeni primárně pro jiné hematologické onemocnění, tři pacienti zemřeli (relaps AML a progresse MDS a NHL). Dvě pacientky zemřely na progresi SM: MaCL a ASM. Léčba kladribinem byla indikována celkem u 4 pacientů s agresivní SM, u 3 vedla k navození PR, v jednom případě byla léčba bez odpovědi. Imatinib byl indikován u 3 pacientů, stav je zatím hodnocen jako stabilní choroba (SD). Závěr: SM je svým klinickým průběhem pestré onemocnění. Jak uvolnění vasoaktivních mediátorů, tak nádorový syndrom mohou být život ohrožující. Biologická léčba se uplatňuje u indolentních forem, u agresivních je indikována protinádorová terapie a nově také léčba inhibitory tyrozin kináz, zejména u případů bez mutace v c-kit.

1856.

Doporučení CZEMP pro diagnostiku a léčbu Ph-negativních myeloproliferativních onemocnění (MPO)

Schwarz Jiří, Penka Miroslav, Pospíšilová Dagmar, Křen L., Campr V.

(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Oddělení klinické hematologie, FN, Brno; Dětská klinika, FN, Olomouc; Ústav patologie, FN, Brno; Ústav patologické anatomie, FN Motol, Praha)

V r. 2009 byla modernizována a rozšířena doporučení CZEMP pro diagnostiku a léčbu BCR/ABL- MPO, tj. esenciální trombocytémie (ET), polycythaemia vera (PV) a primární myelofibrózy (PMF). Diagnostika ET a PMF se opírá o histopatologický (HP) nález, který však musí být bezpodmínečně v souladu s popsány klinickými a laboratorními nálezy u ET nebo různých stádií PMF. Diagnostika typické PV se opírá o průkaz mutace V617F genu JAK2 za předpokladu významného zvýšení hodnot červeného krevního obrazu. Při jeho hraničních hodnotách je nutný průkaz zvýšené celkové hmotnosti erytrocytů (RCM). U atypických případů, není-li přítomna polyglobulie (anebo zvýšená hodnota RCM), postačuje HP obraz PV dle definice WHO plus nález mutace V617F JAK2, anebo není-li přítomna mutace JAK2 V617F, stačí HP obraz PV plus průkaz polyglobulie (anebo zvýšeného RCM). Léčba ET i ostatních MPO s trombocytémií (tj. ranných stádií PMF a PV) je identická. Pacienti jsou stratifikováni podle přítomnosti trombotického rizika (předchozí trombózy, dalšího trombofilního stavu, mutace JAK2), přítomnosti symptomů onemocnění (obvykle mikrocirkulačních) a počtu trombocytů. Pouze pacienti pod 65 let bez uvedených rizik s počtem trombocytů pod 1000 G/l jsou považováni za nízkorizikové a nevyžadují cytoreduktivní léčbu. Ostatní jsou vysokoriziková a jsou indikováni k tromboredukci, ve věku nad 65 možno užít potenciálně leukemogenní hydroxyureu, u mladších volíme mezi anagrelidem a interferonem-alfa. Cílem je udržet trombocyty trvale pod 400, resp. 600 G/l u vysoko-, resp. nízkorizikových pacientů. Kys. acetylosalicylová se podává u všech pacientů s trombocyty pod 1000 G/l (při vyšších hodnotách hrozí krvácení), nemá-li kontraindikaci. Při PV přistupuje jako trombotické riziko i polycytémie samotná. Tu léčíme venepunkcemi / erythrocytaferézami, v případě nemožnosti dosáhnout cílových hodnot Hkt pod 45, resp. 42 u mužů, resp. žen, podáváme cytoreduktivní terapii hydroxyureou u pacientů nad 65 let, interferonem u mladších jedinců. Léčba pokročilých stádií PMF s cytopeniemi je symptomatická, základem je transfuzní substituce. Jedinou kurativní terapií PMF je alogenní transplantace krvetvorných buněk. Tu nesmíme indikovat příliš brzy vzhledem k jejím fatálním rizikům, ale zároveň ne příliš pozdě – nesmíme dopustit přechod do akutní leukemie, avizovaný blasty v krevním obrazu. Indikačními kritérii jsou i rychlý rozvoj hepato-/splenomegalie, přítomnost celkových symptomů onemocnění a hodnota hemoglobinu pod 100 g/l.

1657.

Splenektómia pri autoimunitnej trombocytopénii (AITP) - Áno či Nie ?Lipšic Tomáš (*HTO, Klinika laboratórnej medicíny - OÚSA, VŠZaSP, Bratislava-SK*)

AITP je ochorenie spôsobené dvomi imunitnými mechanizmami - zvýšením deštrukcie trombocytov (Tr) a poškodením ich produkcie. Patofyziológia AITP je kombináciou pôsobenia B a T-lymfocytov na celú vývojovú líniu Tr s výsledným zvýšením deštrukcie a znížením produkcie s následnou trombocytopéniou (TP). Kombinácie humorálnej a celulárnej zložky, miest ich pôsobenia a intenzity sú rôzne medzi jedincami aj v čase. Slezina je orgánom a miestom "koncentrácie" zložiek imunitného systému – T a B lymfocytov a makrofágov a miestom produkcie protilátok. Preto pri pomalejšej pasáži trombocytov jej interiérom je aj ideálnym milieum pre ich deštrukciu. Splenektómia (SE) znamená odstránenie 1/3 imunitného systému – jeho troch na TP sa podieľajúcich zložiek, ako aj najvhodnejšieho prostredia pre deštrukciu Tr. Vykonali sme 270 splenektómii u pacientov s AITP. Protokol zahŕňoval komplexnú diagnostiku - základné hematologické, hemostazeologické, imunologické, virologické, biochemické a zobrazovacie vyšetrenia a vyšetrenia trombocytokinetiky, terapiu, indikáciu a vykonanie splenektómie a dlhodobé sledovanie pacientov. Z 270 pacientov s AITP po SE sme sledovali 155p viac ako 5 (5-40) rokov. Indikáciou SE boli: potvrdená diagnóza AITP, perzistentcia trombocytopenie viac ako 6 mesiacov, hodnota Tr<30G/L, alebo TP s výraznými prejavmi hemoragickej diatézy, relatívna alebo absolútna refraktérnosť na terapiu prvej línie alebo kontraindikácie farmakoterapie a lienálna lokalizácia deštrukcie Tr. Dlhodobé sledovanie 155 pacientov po SE vykazovalo dlhodobú remisiu - kompletnú (CR) u 116p (74,8%), dobrú (GR) u 19p (12,3%), čiastočnú (PR) u 13p (8,4%), nedostatočnú (PoR) u 3p (1,9%) a žiadnu úpravu (NR) u 4p (2,6%). Veľmi uspokojivé, dlhodobé remisie (CR+GR+PR) boli u 148p (95,5%) Nezávažná morbidita po SE bola u 2,6%, mortalita žiadna, len prechodné relapsy u 11,6% pacientov. Žiadny zo 148 pacientov nevyžadoval ďalšiu terapiu, okrem dočasnej u prípadov s výraznejším relapsom. Nebola zaznamenaná zvýšená frekvencia infektov, ani OPSI. Jediným spoľahlivým indikačným a prognostickým faktorom bola detekcia lienálnej deštrukcie Tr. Tradičné ani nové liečebné postupy nenahradzujú modalitu splenektómie vo zmysle trvania a stupňa remisie, podstatne menších kontraindikácií a vedľajších nežiadúcich účinkov a v neposlednom rade aj zlepšenia kvality života.

1704.

Nové vydání nomenklatury HLA systému a jeho praktické dopadyMrázek František, Ambrůzová Zuzana, Petřek Martin (*HLA laboratoř, Ústav Imunologie, FN a LF UP, Olomouc*)

Od identifikace prvního HLA antigenu ("Mac", později HLA-A2) v roce 1958 [1] se polymorfismus HLA systém

mu rozrostl až na aktuální a kdysi těžko představitelný počet 4743 popsanych variant [2]. Již první „průkopníci HLA“ si uvědomovali nutnost zavedení univerzálního názvosloví pro označování HLA znaků, a proto v roce 1968 ustavili Nomenklaturní výbor Světové zdravotnické organizace (WHO) pro faktory HLA systému. Standardizaci nomenklatury na úrovni jednotlivých HLA laboratoří podporují akreditace evropskou i americkou imunogenetickou společností (EFI, ASHI). Již v předchozí verzi nomenklatury HLA systému z roku 2004 jsme narazili na problém rychlého nárůstu počtu nově popsanych HLA alel. Přestože byl stávající názvoslovný systém obohaten o přídatné alelické kódy, jeho kapacita se, zejména u nejpočetnějších alelických skupin (HLA-A*02, B*15), brzy vyčerpala. V reakci na tuto skutečnost výbor WHO připravil novou verzi HLA nomenklatury [3], která platí od 1. dubna 2010 společně s další verzí oficiální databáze sekvencí HLA alel (IMGT/HLA). Nová verze nomenklatury zásadně změnila princip označování HLA variant; specifické oblasti ve jménech alel nyní oddělujeme dvojtečkami, např. A*02:101. Kromě toho, že tato změna odstraňuje limity pro zařazování nových HLA alel, umožňuje nově při vydávání výsledků typizace jednoduše „pokrýt“ HLA alely, které kódují identické vazebné domény HLA molekuly (např. A*02:01P) nebo které sdílejí identickou sekvenci pro tyto domény (např. A*02:01:01G). Tyto a další změny jsou do značné míry orientovány na zjednodušení HLA výsledků pro klinické využití, zejména pro účely vyšetření příjemce a dárce krve tvorných buněk. Nová verze HLA nomenklatury vyžaduje změny nejen od pracovníků v HLA laboratořích, ale do svých postupů ji musí převzít také registry dárců krve tvorných buněk, výrobci reagentů pro vyšetření HLA systému a transplantáční centra. Odborné imunogenetické společnosti (EFI, ASHI) i velké dárcovské registry se dohodly na ročním přechodném období, kdy budou akceptovat výsledky v původním i novém formátu. Konečným datem pro přechod na nové názvosloví je 1. duben 2011. Cílem našeho sdělení je proto rozšířit povědomí o nové verzi HLA nomenklatury mezi zainteresované odborníky a usnadnit tak její zavádění do praxe. Grantová podpora: VZ MSM 6198959205. Citace: [1] Park I, Terasaki P. Hum Immunol 2000;61:185-89. [2] , 7.4.2010. [3] Marsh SG et al. Bone Marrow Transplant 2010; doi:10.1038/bmt.2010.79.

XIII. KONFERENCE ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ

1819.

WHO klasifikace lymfomů očima zdravotní laborantky
Gregůrková Jana, Juráňová Jarmila, Lapčíková Anna, Vykýdalová Alena, Stejskalová Alena, Indráková Jarmila
(*Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc*)

Přednáška se věnuje problematice lymfomů. Nabízí jejich přehledné rozdělení dle WHO klasifikace. Naše sdělení se zaměřuje na morfologické změny jednotlivých ty-

pů lymfomů a jejich podskupin, se kterými se v laboratoři můžeme nejčastěji setkat. U některých typů lymfomů uvádíme i imunofenotypizační a cytogenetická vyšetření, avšak jen v případech, kdy tato vyšetření slouží k potvrzení diagnózy. Naším cílem je seznámit odbornou veřejnost s charakteristickými morfologickými změnami u lymfomů. Tyto poznatky mohou být využity v jejich další praxi. Na závěr je prezentována zajímavá kazuistika.

1691.

Imunocytologie lymfatických uzlin

Novosadová Libuše, Starostka David, Mikula Peter, Chasáková Kateřina

(*Oddělení klinické hematologie, Nemocnice s poliklinikou, p.o., Havířov*)

Soubor: Imunocytologické vyšetření lymfatických uzlin představuje důležitý prvek v diferenciální diagnostice lymfadenopatií. Prezentujeme soubor 218 případů lymfatických uzlin vyšetřených cytologicky a v indikovaných případech i imunofenotypizačně v období let 2001-2009. Metodika: Cytologické vyšetření bylo realizováno z imprintu lymfatické uzliny po přípravě klasickým panoptickým barvením. Flow-cytometrická imunofenotypizace buněk lymfatické uzliny byla prováděna po mechanické dezintegraci do buněčné suspenze s využitím pístového dezintegrátoru. Celularita suspenze byla korigována přidáním pufru PBS. Imunofenotyp byl stanoven flow-cyometrií v režimu dvojbarevné či vícebarevné imunofluorescence po přípravných procedurách a značení panelem monoklonálních protilátek zaměřeným na lymfoproliferace. Cílem imunofenotypizace bylo zjistit přítomnost hemopoetických (lymfoidních) či non-hemopoetických (CD45-) buněk, stanovit zastoupení lymfoidních řad, monoklonalitu v B-linii a charakteristický imunofenotyp u non-hodgkinských lymfoproliferací. Imunocytologické nálezy jsme srovnávali s výsledky histologie a imunohistochemie. Problémem flow-cytometrického vyšetření může být potenciální nereprezentativnost vyšetřované populace buněk zapříčiněná způsobem dezintegrace (s destrukcí předmětných elementů), způsobem filtrace, lýzy erytrocytů a volbou analyzované populace. Výsledky: Celkový přehled zastoupení jednotlivých stavů dle konečné diagnózy: nespecifické reaktivní lymfadenitidy 58x, specifické lymfadenitidy 8x, Hodgkinův lymfom 19x, B-NHL 49x, T-NHL a ALCL 8x, extramedulární plazmocytom 1x, extramedulární hemopoéza 1x, metastázy karcinomu 53x, nediagnostický vzorek 21x. Diagnostická konkordance flow-cytrie a histologie u NHL přesahovala 80%. Závěr: Imunocytologická analýza lymfatických uzlin je rychlá a senzitivní vyšetřovací metoda, která je v mnoha případech diagnostická, a to zejm. u postižení uzlin NHL, kdy je diagnóza často včetně subtypu lymfomu známa v den vyšetření. To ovlivňuje směřování dalšího diagnostického postupu a umožňuje rychlou volbu léčebné strategie u pacientů v závažném stavu.

Vyšetření mozkomíšního moku v hematologické laboratoři

Pánková L., Zilvarová E., Kopecká I., Fátorová I.
(Hradec Králové)

Abstrakt nedodán.

1686.

Raritní záchyt mastocelulární leukemie

Hončíková Michaela, Šubrtová Hana, Mociková Heidi,
Mikulenkova Dana, Vydra Jan, Kozák Tomáš
(Oddělení klinické hematologie, FN Královské Vinohrady,
Praha; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

79letá pacientka s anamnézou chronického kardiálního selhání a chronické bronchitidy byla hospitalizována pro febrilní stav s pravostrannou pneumonií, bolestmi břicha a artralgiemi. V krevním obraze (KO) zjištěna leukocytoza ($15 \times 10^9/l$) a trombocytopenie ($80 \times 10^9/l$) bez přítomnosti anémie. V diferenciálním rozpočtu KO nalezeno 20 % atypických buněk, dále přítomno 71% neutrofilních leukocytů, 7% lymfocytů, 0% eosinofilních a 0% bazofilních leukocytů, 1% plasmatických buněk. Z cytochemických metod zjištěna pozitivita toluidinové modři a PAS. V kostní dřeni přítomno 59% atypických buněk. Nález průtokové cytometrie byl necharakteristický s pozitivitou znaků CD117, CD33, CD71, CD43. Histologie a cytogenetika kostní dřene nebyla provedena. Molekulární vyšetření JAK2, c-kit a FIP1L1/PDGFRa byly negativní. Na základě vyhodnocení KO a kostní dřene a výše uvedených metod by nález uzavřen jako mastocelulární leukemie. Vzhledem k celkovému těžkému stavu další vyšetření nebyly provedeny, léčba leukemie nebyla zahájena a pacientka zemřela po sedmi dnech hospitalizace.

1804.

Transplantace krvetvorných kmenových buněk

Raida Luděk (Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc)

Léčba různých onemocnění (nejen hematoonkologických) transplantací krvetvorných kmenových buněk (SCT) se vyvíjí již více než padesát let. Za tu dobu se stala standardním léčebným přístupem umožňujícím stabilizovat nebo vyléčit řadu chorob s původně infaustní prognózou. Základní dělení rozlišuje autologní (krvetvorné kmenové buňky jsou pacientovy, byly odebrány a vitálně zamrazeny před transplantací) a alogenní (transplantované krvetvorné kmenové buňky pocházejí od jiného jedince, ať již příbuzného či nepříbuzného) SCT. Zdrojem buněk může být v obou případech buď přímo kostní dřeň (primární zdroj), nebo periferní krev (sekundární zdroj), do které jsou kmenové buňky vyplaveny ve větším množství po předchozí stimulaci a mobilizaci. Autologní i alogenní SCT mají své specifické hematologické i nehematologické indikace, které jsou ovlivněny základními principy a fyziologií těchto dvou léčebných přístupů. Různé

typy transplantací se rovněž liší rozdílným rizikem relapsu základního onemocnění, potransplantačních komplikací, morbiditou a mortalitou.

PODPŮRNÁ PÉČE

Problematika syndromu multiorgánového selhání u hematoonkologických pacientů - patogenese, možnosti terapie, prognosa

Kolář Michal (Praha)

Syndrom multiorgánového selhání (Multi Organ Failure – MOF) je uniformním vyústěním působení procesů, které může iniciovat široké spektrum nox.

Těmito procesy, které samostatně, ale spíše v komplexu, MOF způsobí, jsou: buněčná hypoxie, rozvrat vnitřního prostředí a metabolismu, ale hlavně dysregulovaná systémová zánětlivá reakce (Systemic Inflammation Reaction Syndrom – SIRS).

Patogenese těchto procesů je u hematoonkologických pacientů modifikována především absolutním či funkčním deficitem neutrofilů – hlavních výkonných buněk a lymfocytů – hlavních „regulačních“ buněk v SIRS.

V systému tak zůstávají aktivní především endotelie a makrofágy. Aktivace může vést rychle k těmto deregulačním fenoménům:

1. neřízené činnosti výkonných mechanismů v tkáních (O_2 radikály, enzymy makrofágů) a
2. změnám v průsvitu a aktivitě kapilár.

Důsledkem může být:

- destrukce buněčných populací orgánů (příčina: viz 1.)
- septický šok a rozvoj diseminované intravaskulární koagulace (příčina: viz 2.).

Při trvání v čase jsou tyto jevy příčinou buněčné hypoxie, rozvratu metabolismu, vnitřního prostředí i „sebe navzájem.“ Nejlepší terapií je profylaxe nejčastějších příčin SIRS: infekce a náhlého rozpadu masy buněk.

Klíčem k úspěchu při probíhající SIRS je včasná intervence směřující k zástavě základních procesů – zamezení buněčné hypoxie, stabilizace vnitřního prostředí, metabolických procesů a odstranění příčiny SIRS (infekce, buněčného rozpadu, alergické reakce, imunopatologického procesu...).

U rozvíjejícího MOF je prognostickým ukazatelem hlavně počet postižených orgánů (při více než 4 je přežití málo pravděpodobné) a trvání leukopenie (déle než 14 dní při kritickém stavu je téměř jisté signum mali ominis).

U netransplantovaných je sumárně přežití cca 20-30%, u pacientů po allotransplantaci je přežití solitérem, úmrtnost je cca 95%.

Oportunní infekce CNS sdružené s AIDS.

Machala Ladislav (Praha)

Nejčastějšími oportunními infekcemi CNS, které jsou sdružené s pozdními stádii HIV infekce, jsou mozková to-

xoplasmosa, kryptokoková meningitida a progresivní multifokální leukoencefalopatie.

Mozková toxoplasmosa a kryptokoková meningitida se objevují při hodnotách CD4+ T lymfocytů pod 100/ÚL a při včasné diagnóze a řádné terapii je jejich prognosa většinou příznivá.

Progresivní multifokální leukoencefalopatie je spojena s výrazně hlubším imunodeficitem při počtech CD4+ T lymfocytů pod 50/ÚL, léčebné možnosti jsou dosud neuspokojivé a onemocnění má proto pravidelně fatální průběh.

Základem předcházení rozvoje oportunních infekcí CNS při HIV infekci je včasné zahájení antiretrovirové terapie, které zajistí dostatečně vysoký počet CD4+ t lymfocytů. V případě selhání antiretrovirové terapie lze spolehlivě zajistit prevenci mozkové toxoplasmosy primární chemoprophylaxí. U kryptokokové meningitidy je profylaktické podávání antimykotik omezeno na sekundární režim po prodělaném onemocnění a u progresivní multifokální leukoencefalopatie dosud není žádná specifická profylaktická léčba k dispozici.

1825.

Molecular detection of pathogens in hematooncological and critically ill patients: an update on available methodologies

Peková Soňa, Čmejla Radek, Mazal Oldřich, Haugvicová Renata, Zazula Roman, Šťastný Petr, Vydra Jan, Žejšková Lenka, Plachý Radek, Kozák Tomáš, Průcha Miroslav (*Chambon a.s., Laboratoř molekulární diagnostiky, Praha; Anesteziologicko-resuscitační klinika, 1. LF UK, Fakultní Thomayerova Nemocnice, Praha; Oddělení klinické hematologie, FN Královské Vinohrady, Praha; Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie, Nemocnice Na Homolce, Praha*)

Background: Infectious complications in patients with hematological malignancies represent a serious clinical issue. In these severely compromised individuals, rapid and broad-range identification of pathogens in diverse biological materials is of immense clinical importance, directly affecting the patient's outcome. Aims: The goal of the work was to further improve present laboratory techniques for rapid, quantitative and full-range identification of pathogens in all types of biological material isolated from patients. Methods: Between September 2007 and March 2010 we have investigated 3, 478 biological samples including peripheral blood, BAL, cerebrospinal fluid, sputum, aspirates from joints and cavities, drainage fluids, abscesses, tissue biopsies, urine, and stool from hematooncological patients and patients from intensive care units, using pathogen-specific probes and Real-Time PCR technology coupled with direct sequencing. During this period of time we have created a database of sequences of pathogens relevant to our racial and geographical region. Results: Using bioinformatics and computer-based tools for molecular biology we have designed and developed quantitative multiplex Real-Time PCR assays

for rapid detection of pathogens identified in our cohort of patients, at present covering close to one hundred causative agents, including bacteria, fungi, RNA and DNA viruses, and selected parasites. Table 1 shows the detection spectrum of our molecular assays available at present. Conclusion: Molecular detection of pathogens represents a useful tool to accelerate and refine the diagnostics of infections. This approach allows for rapid and broad-range detection of pathogens from a very limited amount of sampled material. Broad-range quantitative Real-Time PCR diminishes the need for the ultimate identification of causative agents by sequencing, which leads to substantial shortening of the time from the point of sampling to the point of available results to a few hours. At present, due to the broad detection spectrum of the pathogen-specific multiplex Real-Time PCR techniques, in the absolute majority of cases, direct sequencing serves merely as a confirmatory technique. We believe that molecular detection of pathogens opens new perspectives to the supportive care of hematooncological and critically ill patients and proves to be valuable help in the clinical decision making.

1760.

Diagnostika invazívnej pľúcnej aspergilózy pomocou detekcie galaktomananu z tekutiny získanej bronchoalveolárnou lavážou u hematooncologických pacientov

Tošková Martina, Ráčil Zdeněk, Kocmanová Iva, Lengerová Martina, Rolencová Monika, Mayer Jiří (*Interní hematooncologická klinika, FN a LF MU, Brno; Oddělení klinické mikrobiologie, FN, Brno; Centrum molekulární biologie a genové terapie IHOK, FN, Brno*)

Úvod: Invazívna pľúcna aspergilóza je závažná infekčná komplikácia hematooncologických pacientov a jej skorá diagnostika môže zlepšiť ich prežívanie. Metódy: Retrospektívna analýza detekcie galaktomananu (*Platelia Aspergillus*, Bio-Rad, Francúzsko) z tekutiny získanej z bronchoalveolárnej laváže (BAL) v období 7/2003 až 10/2009. Výsledky: V sledovanom období bolo bronchoalveolárnou lavážou vyšetrených 295 pacientov (pac.) s hematologickou malignitou. Všetkým pac. bol zároveň vyšetrený sérový galaktomanan. Invazívna pľúcna aspergilóza (definovaná podľa EORTC/MSG 2008 kritérií) sa rozvinula u 12,8% (38/295) pac., z toho bolo 7 pac. s istou invazívnou pľúcnou aspergilózou (IPA) a 31 pac. s pravdepodobnou IPA. Pac. s možnou IPA (70) a pacienti s falošnou pozitívitou sérového galaktomananu (12) boli z analýzy vylúčení. Pac. bez evidencie IPA boli použité ako negatívna kontrola (175). Do analýzy bolo zavzatých 213 vzoriek od 198 pac. Priemer indexu pozitivity (IP) galaktomananu (GM) z BAL u pac. s istou a pravdepodobnou IPA bol 2,03, medián 1,18 (rozmedzie 0,07 – 9,01), u negatívnej kontroly priemer 0,19, medián 0,14 (rozmedzie 0,01 – 1,78). Pac. s istou IPA mali priemerný IP GM z BAL 3,48, medián 3,48 (rozmedzie 0,12 – 9,01), pac. s pravdepodob-

nou IPA medián 0,93, priemer 1,70 (rozmedzie 0,07 – 8,58). V analýze podskupín pac. s istou a pravdepodobnou IPA bol priemerný IP GM z BAL vyšší u neutropenických pac. ako u pac. bez neutropenie (2,15 vs. 1,69). 60,5% (23/38) pac. malo pozitívny sérový GM (cutoff $2x > 0,5$ IP) v rozmedzí +/- 7 dní od dátumu BAL. 68,4% (26/38) pac. dostávalo antimykotiká s účinnosťou na invazívnu aspergilózu (ako profylaxiu alebo empirickú terapiu) pred BAL s mediánom 2 dni (rozmedzie 1 – 25 dní). Senzitivita vyšetrenia GM z lavážnej tekutiny u našej skupiny pacientov pri cutoff IP GM $\geq 0,5$ je 66%, špecificita 95%, pozitívna prediktívna hodnota 76%, negatívna prediktívna hodnota 92%. Pri cutoff IP GM $\geq 1,0$ je senzitivita 50%, špecificita 98%, pozitívna prediktívna hodnota 83%, negatívna prediktívna hodnota 90%. Záver: Naša analýza ukázala obmedzenú senzitivitu a vysokú špecificitu vyšetrenia galaktomananu z lavážnej tekutiny. Nízka senzitivita môže byť spôsobená vysokým percentom pacientov so zavedenou antimykotickou terapiou v dobe BAL a preto je potrebné BAL spraviť čo najskôr pred zahájením antimykotickej terapie. Práca bola podporená grantmi Ministerstva zdravotníctva Českej republiky č. NS 10442-3/2009 a NS 10441-3/2009.

LABORATORNÍ HEMATOLOGIE

1739.

Využití SNP microarrays při detekci nebalancovaných chromosomových aberací u pacientů s MDS a AML
Bystřická Dagmar, Dostálová Merkerová Michaela, Zemanová Zuzana, Krejčík Zdeněk, Belíčková Monika, Březinová Jana, Michalová Kyra
(Centrum nádorové cytogenetiky, ÚKBLD, VFN a I LF UK, Praha; Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha)

Celogenomová analýza metódou Single Nucleotide Polymorphism (SNP) microarray nabízí moderní přístup k identifikaci nebalancovaných chromosomových změn. Metóda není závislá na dostupnosti dělících se buněk a je informativní, i pokud nelze provést konvenční cytogenetickou analýzu. Díky vysoké citlivosti umožňuje detekci kryptických variant v počtu kopií DNA sekvencí (CNV) a úseků s tzv. uniparentální disomií (UPD). UPD vznikají v důsledku ztráty materiálu jednoho a duplikací druhého homologního chromosomu, což vede ke ztrátě heterozygosity (LOH) bez změny v počtu kopií DNA. V důsledku toho může dojít k inaktivaci tumor-supresorových genů. Získané UPD byly detekovány u hematologických malignit včetně MDS a AML, kde byly prokázány u cca 20% případů. V pilotní studii jsme pomocí microarray HumanCytoSNP-12 BeadChips (Illumina; rozlišení 6,2kb, detekce 300K SNP) vyšetřili 24 pacientů s MDS a AML při diagnóze: RA (2x), RCMD (9x), RAEB-I (3x), RAEB-II (5x), AML (2x), MDS/MPD (3x). 15 pacientů mělo na základě cytogenetické analýzy normální a 9 pacientů komplexní karyotyp. Jako kontroly jsme použili vzorky dvou zdravých dárců. Analýza CNV byla prove-

dena softwarem KaryoStudio (Illumina). U 2/15 pacientů s normálním karyotypem jsme odhalili úseky s UPD (upd17q, upd20p). U dalších dvou nemocných jsme detekovali CNV. U pacientky se subtypem RAEB-2 byla odhalena kryptická delecce v oblasti p13.1 až p13.2, kde je lokalizován tumor supresorový gen ETV6. U nemocné s MDS RA jsme identifikovali kryptickou delecí 5q32 až 5q33, při které zůstala zachována oblast 5q31. Analýzy komplexních karyotypů u pacientů s MDS potvrdily rozsáhlé chromosomové aberace zahrnující ve všech případech delecí 5q a další kryptické nebalancované změny. U tří pacientů byla prokázána přítomnost upd17, ve dvou případech současně s upd11. U dalších tří nemocných byla detekována del(17)(p), u jednoho mikrodelecce v oblasti 17p13.1 (gen TP53). Pouze u dvou pacientů nebyla oblast 17p nijak změněna. Celkem bylo odhaleno 6 UPD na chromosomech 11 (2x), 17 (3x) a 8 (1x), 54 delecí a 29 amplifikací. V námi popsáných aberovaných oblastech byly identifikovány známé geny, jejichž deregulace může mít významný podíl na patogenezi onemocnění. SNP microarray díky vysoké citlivosti a možnosti detekovat UPD významně doplňuje ostatní molekulárně cytogenetické analýzy. MZO VFN2005, VZ ÚHK00023736 a LC535.

1736.

Hierarchical clustering of flow cytometry data – defeating multidimensionality

Fišer Karel, Sieger Tomáš, Mejstříková Ester, Schumich Angela, Wood Brent, Irving Julie, Dworzak Michael Norbert, Vormoor Josef

(Department of Paediatric Haematology and Oncology Charles University, 2nd School of Medicine, Prague-CZ; Faculty of Electrical Engineering, Department of Cybernetics, Czech Technical University, Prague-CZ; Children's Cancer Research Institute and St. Anna Children's Hospital, Vienna-Austria; Department of Laboratory Medicine, Seattle, Washington-USA; Northern Institute for Cancer Research, Newcastle University, Newcastle-UK)

Flow cytometry is a valuable tool in research, diagnostics and in minimal residual disease (MRD) monitoring of hematologic malignancies. However, its gradual advancement towards ever increasing numbers of fluorescent parameters, leads to information rich datasets, which are challenging to analyze. Thus, we have developed a novel method to analyze complex flow cytometry data, based on Hierarchical Clustering Analysis (HCA) but with a new underlying algorithm, employing Mahalanobis distance measure. We have validated the method by comparison to standard gating approaches as performed independently by expert cytometrists. Using this method we have detected Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) blast populations in diagnostic and follow up datasets (n=85) from four centers. The correlation between HCA and standard gating approach was highly comparable to inter laboratory comparisons in the I-BFM LMD ring tri-

al. To further improve performance in low MRD level follow up samples and to automate MRD detection we combined HCA with Support Vector Machine (SVM) learning. SVM correlated better with gating than HCA in samples with low MRD levels. HCA in combination with SVM proved to be strong analytical tool for flow cytometry with potential for automatic MRD detection. This work was supported by IGA NS/10473-3 and P301/10/1877 grants.

1790.

Technical aspects and guidelines for application of EuroFlow protocols: towards 8-color flow cytometry in the diagnosis and classification of hematopoietic malignancies

Kalina Tomáš, Mejstříková Ester, Flores-Montero Juan, Lécresse Quentin, Cullen Mathew, Lhermitte Ludovic, Sedek Lukasz, Mendonça Andreia, Böttcher Sebastian, van der Velden Vincent, Hrušák Ondřej, Orfao Alberto, van Dongen Jacques

(Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2.LF a FN Motol, Praha; Department of Medicine, Cancer Research Centre and Cytometry Service, University of Salamanca, Salamanca-Spain; St. James University Hospital Leeds-UK; Department of Hematology, Hôpital Necker, Paris-France; Dept. of Pediatric Hem. and Oncology, Medical University of Silesia, Zabrze-Poland; Department of Hematology, Instituto Portugues de Oncologia, Lisbon-Portugal; 2nd Department of Medicine, University Klinik Schleswig-Holstein, Kiel-Germany; Department of Immunology, Erasmus MC, Rotterdam-Netherlands)

EuroFlow collaborative project designed approaches for fast and sensitive diagnostics of hematopoietic malignancies using 8-color flow cytometry. We have extensively tested approaches for instrument settings, compensation, choice of fluorochromes and staining protocols. We have developed new analysis software "Infinicyt" for advanced se-

mi-automated analysis of 8-color flow cytometry data. When a test cohort of 30 healthy donors' peripheral blood was measured using the common EuroFlow protocol in 8 participating laboratories, we could demonstrate the coefficients of variation of each parameter to be lower than 50%. Furthermore, we could merge the data files into one file that is amenable to analysis in the Infinicyt software where all expected cell types cluster to the same position (Figure 1). Merged analysis of 60 ALL cases will be presented to demonstrate the power of enhanced software analysis for fast and accurate diagnostics. In conclusion, we show that 8-color flow cytometry coupled with novel software solutions are extremely potent tools for diagnosis and classification of hematopoietic malignancies. On behalf of the EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708) www.euroflow.org Legend to figure: Novel Infinicyt "APS view" presenting 8-parameter cells' phenotype in a single dot plot. "A"-Monocytes, "B"-B-cells in red, "C"-NK-cells, "D"-CD4-T cells, "E"- double negative T cells, "F"-CD8-T cells

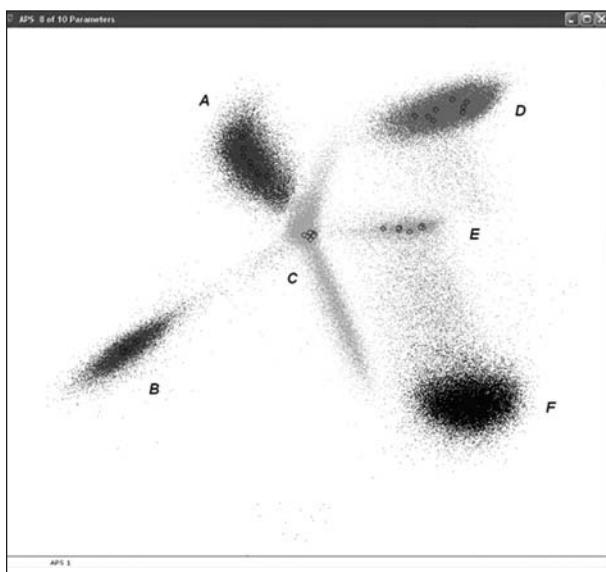
1773.

Detekce mutací v BCR-ABL genu pomocí High Resolution Melting (HRM) analýzy závisí na nukleotidové sekvenci templátu, umístění mutace, typu nukleotidové záměny a použité PCR směsi včetně DNA interkalačního barviva

Nádvořníková Sylvie, Polívková Václava, Shaik Gouse M., Dráber Peter, Moravcová Jana, Machová Poláková Kateřina

(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Oddělení přenosu signálu, Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha)

Mutace v oblasti ABL kinázy genu BCR-ABL jsou jedním z důležitých mechanismů rezistence na léčbu tyrosin kinázovými inhibitory u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML). Různé metody s různou citlivostí jsou používány k detekci BCR-ABL mutací. Mezi jinými i HRM analýza, která umožňuje zachytit nukleotidovou záměnu, inserci/deleci nebo jiné neznámé mutace na základě změn v disociačním chování analyzované dsDNA. Dříve publikovanou HRM analýzu (Poláková KM et al., 2008, Leuk Res 32, 1236-1243) rozdělující ABL kinázovou doménu pomocí čtyř párů primerů do čtyř ampliconů (HRM1-HRM4) jsme validovali pro rutinní screeningový test detekce mutací v ABL kinázové doméně. Šestnáct různých mutací vždy v minimálně 4 různých procentuelních zastoupeních bylo analyzováno pomocí HRM. Získané výsledky byly shodné s výsledky získanými přímou sekvenací pro 9/16 mutací. U 3/16 mutací nebyly jako pozitivní detekovány vzorky obsahující mutaci ve 100% zastoupení. Tento problém jsme vyřešili přidáním exogenní DNA divokého typu do vzorku po proběhnutí PCR a opakovanou HRM analýzou jsme mutace již spolehlivě detekovali. Jako pozitivní nebyly detekovány 4/16 mutací bez ohledu na jejich procentuelní zastoupení ve vzorku. Jako další krok jsme testovali 6 DNA barviv (SYBR Green, SYTO-9, SYTO-13, EvaGreen,



LCGreen, ResoLight) a 4 různé PCR směsi lišící se obsahem solí (24 kombinací celkem) s ohledem na citlivost a spolehlivost detekce mutací. Pro tento test byly pomocí HRM analýzy hodnoceny vzorky obsahující mutaci E255K ve 100%, 50%, 15%, 5% a 0%. Analýza vzorků obsahujících 5% mutovaného templátu ukázala, že různá DNA barviva se významně liší ve schopnosti detekovat mutaci. HRM s použitím LCGreen, SYTO-9 a SYTO-13 ve všech PCR směsích signifikantně detekovaly 5% mutovaného templátu v porovnání se vzorky bez mutace ($P < 0,05$ nebo $P < 0,01$). Při použití SYBR Green nebyl spolehlivě zjištěn mutovaný templát v 5% zastoupení v žádné z testovaných směsí, zatímco jiné barvy se lišily ve schopnosti detekovat 5% mutovaného templátu v závislosti na PCR směsi. Vzorky obsahující 15%, 50% a 100% mutovaného templátu byly detekovány jako pozitivní pomocí všech 24 kombinací PCR směsí a DNA barviv. Získané výsledky ukazují, že sekvence testovaného templátu, typ mutace, složení PCR směsi, stejně jako použité DNA interkalační barvivo významně ovlivňují úspěšnost HRM analýzy; a pro spolehlivou detekci mutací je potřeba brát v úvahu všechny tyto parametry. Podpořeno MZOUHKT2005, KAN200520701.

1679.

PCR detekce zygomycet u hematoonkologických nemocných

Hrnčířová Kristýna, Lengerová Martina, Kocmanová Iva, Ráčil Zdeněk, Volfová Pavlína, Paloušová Dita, Tošková Martina, Winterová Jana, Weinbergerová Barbora, Mayer Jiří (*Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematoonkologická klinika LF MU a FN, Brno; Oddělení klinické mikrobiologie, FN, Brno; Interní hematoonkologická klinika LF MU a FN, Brno*)

Úvod: Invazivní zygomykózy jsou závažnou komplikací u hematoonkologických nemocných. Základem pro úspěšnou léčbu je časná diagnostika a časné zahájení vhodné antimykotické léčby. Přestože je již několik let věnována velká pozornost rozvoji molekulárně biologických diagnostických metod, stále není k dispozici žádný standardizovaný postup. Metody: DNA z čerstvých tkání a z houbových kultur byla izolována pomocí ZR Fungal/Bacterial DNA Kit (Zymo Research, USA). DNA z tkání v parafinových bločcích (FFPE) byla izolována pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Německo). Zygomycetová DNA byla detekována pomocí semi-nested real-time PCR s interkalačním barvivem EvaGreen cílené do úseku 18S ribozomální DNA s použitím primerů převzatých z literatury. Konkrétní druh zygomycety byl následně určen pomocí High Resolution Melt (HRM) analýzy na přístroji Rotorgene 6000 (Corbett Research) srovnáním křivek tání vzorku a pozitivních kontrol (DNA izolovaná z kultur *Rhizopus microsporus*, *R. oryzae*, *Mucor racemosus*, *Rhizomucor pusillus* a *Absidia corymbifera*). Pozitivní výsledky byly potvrzeny real-time PCR s primery a TaqMan MGB sondou specifickou pro daný druh.

Výsledky: Prezentovaná metoda využívající HRM analýzy umožňuje detekci širokého spektra zygomycet v klinických vzorcích v jedné reakci. Detekuje klinicky významné rody *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Rhizomucor* spp. a *Absidia* spp. Touto metodou bylo testováno 7 vzorků tkáně (6 čerstvých a 1 FFPE) hematoonkologických pacientů s histologicky nebo mikrobiologicky prokázanou zygomykózou. Všechny tyto vzorky byly pozitivní a ve všech případech bylo možné přímo identifikovat druh zygomycety (*R. microsporus* (n=4), *A. corymbifera* (n=2) a *R. pusillus/miehei* (n=1)). Výsledky byly potvrzeny specifickými real-time PCR pro dané druhy. Dále bylo testováno 5 vzorků tkáně (3 čerstvé a 2 FFPE) pacientů bez příznaků a průkazu zygomycetové infekce s negativním výsledkem ve všech případech. Závěr: Prezentovaná metoda využívající HRM analýzu představuje jednoduchý, rychlý a finančně nenákladný způsob detekce zygomycet v klinických vzorcích. Je velmi vhodná pro identifikaci kultur i screening klinických vzorků v rutinní diagnostické praxi. Následné použití specifických real-time PCR pro jednotlivé druhy zygomycet umožňuje potvrzení výsledků a kvantifikaci fungální nálože ve vzorku. Tato práce byla podpořena granty Ministerstva zdravotnictví České republiky č. NS10442-3/2009 a NS10441-3/2009 a Masarykovy Univerzity č. MUNI/A/1012/2009.

1618.

Karyometry, RNA and DNA image densitometry of lymphocytes in patients suffering from B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)

Smetana Karel, Jirásková I., Karban J., Trněný M. (*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Charles University, 1st Medical Faculty General Hospital, Prague*)

Since quantitative information on the nucleolar and cytoplasmic RNA concentration in differentiating and maturing blood cells is very limited, the present study was undertaken to provide additional data on that topic in differentiating cells of the erythroid lineage in situ. The satisfactory number of erythroblasts in bone marrow of patients suffering from the chronic phase of chronic myeloid leukaemia without a large increase in the granulocytic to erythroid ratio facilitated computer assisted image RNA density measurements in both nucleoli and cytoplasm at the single cell level. As expected, the measurements indicated a significant decrease of the nucleolar and cytoplasmic RNA concentration only in advanced stages of erythroblast differentiation. The resulting ratio of the nucleolar to cytoplasmic RNA concentration was very stable and did not change during differentiation, being similar in the early and advanced stages of erythroblastic development. Thus the marked similarity of the nucleolar to cytoplasmic RNA concentration indicated a "symmetric decrease" of the RNA concentration during the erythroblastic differentiation. Such phenomenon might be related not only to the nucleolar RNA transcription but also to its transport and cytoplasmic consumption. Howe-

ver, no such symmetry of the nucleolar and cytoplasmic RNA decreasing concentration in differentiating cells has been reported and apparent on the basis of quantitative computer assisted image densitometry at the single cell level. Other approaches for the study of differentiating human erythroblasts in bone marrow biopsies would be very difficult or impossible. In addition, the marked decrease in the nucleolar diameter in differentiating erythroblasts and the stability of the nucleolar RNA concentration suggest that the amount of RNA in the nucleolus of differentiating erythroblasts is closely associated with nucleolar size rather than with its concentration within the nucleolar body.

XIII. KONFERENCE ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ

1815.

Monitorování hladiny BCR/ABL transkriptů u pacientů s CML pomocí kvantitativní real-time RT-PCR

Kadlecová Jana, Divoká Martina, Rožmanová Šárka, Kalandrová Eliška, Koláčková Monika, Novosadová Alena, Jarošová Marie, Indráková Jarmila
(Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc)

Kauzální příčinou vzniku chronické myeloidní leukémie (CML) je přítomnost nově vzniklého fúzního genu BCR/ABL, který je výsledkem reciproké translokace t(9;22)(q34;q11). Fúzní gen BCR/ABL slouží jako marker pro potvrzení klinické diagnózy CML, pro sledování úspěšnosti léčby a monitorování minimální reziduální nemoci. Nejcitlivější metodou detekce BCR/ABL transkriptů je kvalitativní analýza metodou reverzně transkriptázové polymerázové řetězové reakce (RT-PCR). Tato metoda umožňuje selektivní in vitro amplifikaci přesně definovaného úseku nukleotidových sekvencí a tím dovolu- je přesně určit jejich přítomnost nebo nepřítomnost, to vše na úrovni 1 leukemické buňky mezi 105 – 106 zdravými buňkami. Pro CML pacienty léčené inhibitory tyrozino- vých kináz je důležité sledovat nejen samotnou přítom- nost, ale také množství (hladinu) BCR/ABL transkriptů. K tomu slouží standardizovaná metoda kvantitativní RT- PCR (Q-RT-PCR) s použitím fluorescenčně značených sond. Jedná se o rychlou PCR v reálném čase (real-time), kdy detekce produktů PCR probíhá již během vlastní re- akce. Provádí se ve speciálních termocyklerech vybave- ných optikou pro detekci fluorescenčního signálu. Výsled- ná hladina BCR/ABL transkriptů je vztažena k expresi kontrolního genu ABL a tím poskytuje standardizované výsledky. Nárůst a vysoká hladina transkriptu BCR/ABL signalizují špatnou odpověď na léčbu a špatnou prognó- zu, naproti tomu pokles či vymizení transkriptů BCR/ABL dobrou odpověď na léčbu a dobrou prognózu. Cílem našeho sdělení je seznámit s principem metody real-time RT-PCR a jejím využitím při monitorování BCR/ABL transkriptů u nemocných s CML. Podpořeno granty IGA MZ NS 9949-3 a MSM 6198959205.

1648.

Zbytkové leukocyty v transfuzních přípravcích

Šubrtová Hana, Salačová Petra, Hončíková Michaela, Špaček Martin, Kozák Tomáš (OKH FNKV, Praha)

Úvod: průtoková cytometrie dnes urychlí provoz a hod- nocení zbytkových bílých krvinek v de leukotizovaných transfuzních přípravcích. Princip: Souprava BD Leuco- count obsahuje propidium jodid (PI), což je barva nuk- leových kyselin barvící při použití RNáz pouze buněčnou DNA. Leukocyty jsou tedy označeny, destičky a erytro- cyty jako bezjaderné objekty se nebarví. Zkumavky BD Trucount obsahují kuličky jako vnitřní referenci sloužící k absolutnímu výpočtu zbytkových leukocytů. Vzorky se spojují s lyofilizovanou peletou kuliček před značením. Po značení jsou vzorky měřeny na průtokovém cytomet- ru. Absolutní počet je určen jednoduchým výpočtem: po- čet naměřených buněk se vydělí počtem naměřených flu- orescenčních kuliček a výsledek se násobí počtem kuli- ček v peletce. Nastavení přístroje provádí aplikační spe- cialista. Vzorky se dají zpracovat i do 48 hodin po leu- koredukci. Kontrola kvality se provádí pomocí kontrol- ních kitů pro destičky a pro erytrocyty. Výhodou je vel- mi rychlé a jednoduché zpracování vzorků transfuzních přípravků, testy jsou reprodukovatelné, IVD a splňují kri- téria pro správnou laboratorní praxi. Nevýhodou se mů- že jevit vyšší cena

Možnosti stanovení správného počtu trombocytů - kazuistika problematického pacienta

Pavlíková Z., Hrnčířová K., Malá M., Bolfová M., Pecka M., Malý J. (Hradec Králové)

Abstrakt nedodán

1726.

Aktuální diagnostika von Willebrandovy nemoci

Úlehllová Jana, Kačalová Petra, Chalupníková Petra, Je- žáková Jarmila, Sečkařová Martina, Sýkorová Miroslava, Slavík Luděk (HOK FN, Olomouc)

Diagnostika von Willebrandovy nemoci (vWD), prav- děpodobně nejčastější vrozené krvácivé poruchy, vyžaduje mnoho speciálních laboratorních vyšetření. VWF je glykop- rotein syntetizovaný pouze v megakaryocytech a endoteli- álních buňkách, přítomen je v α -granulích destiček, plazmě a subendotelu. Biosyntéza vWF zahrnuje množství kroků jako je dimerizace, polymerizace, glykosylace a štěpení pro- polypeptidu. Dříve používaná diagnostika vWD se opírala o méně specifické testy jako je krvácivost a aktivovaný par- ciální tromboplastinový test. V dnešní době patří mezi zá- kladní testy diagnostiky vWD vyšetření vW antigenu a ak- tivní a musí být vyšetřeno u všech pacientů, kteří mají po- zitivní osobní nebo rodinnou anamnézu krvácivých příhod, pokud chceme dosáhnout správné diagnózy. Klinický vý- znam vyšetření: • Jestliže pozorujeme velmi nízké nebo do-

konce nedetekovatelné hladiny VWF:Ag, můžeme očekávat, že se jedná o typ 3 vWD. V případě lehce snížených nebo normálních hladin vWF aktivity a F VIII, musí být provedeno porovnání s hladinou vWF:Ag. V případě, že jsou všechny tři hodnoty v normálním rozmezí, můžeme vyloučit von Willebrandovu chorobu a hemofilii A. • Pokud je alespoň jeden parametr abnormálně snížen, je nezbytné provést kalkulaci poměru vWF aktivity / vWF antigenu. • V případě, že je poměr blízký hodnotě 0,7 můžeme uzavřít diagnózu jako von Willebrandova choroba typu 1. • Jestliže poměr vWF aktivity / vWF antigenu pod 0,7 můžeme diagnostikovat typ 2A, 2B a 2M. Další laboratorní parametry jako je RIPA (ristocetinem indukovaná agregace trombocytů), analýza multimerů a vazebná analýza, jsou nezbytné v případě k rozlišení jednotlivých subtypů. Existují také stavy při kterých se výrazně zvyšuje hladina vWF: akutní závažná onemocnění, procesy způsobující poškození endoteliální části cévní stěny aj. Prezentace bude dále doplněna zajímavými kauzistikami.

1725.

D-Dimery - stanovení a klinické využití k diagnostice trombózy

Slavík Luděk, Úlehlová Jana, Ježáková Jarmila, Sýkorová Miroslava, Chalupníková Petra, Sečkařová Martina, Kačalová Petra (HOK FN, Olomouc)

Vyšetření D-dimeru si v posledním desetiletí vydobyla významnou pozici v algoritmu diagnostiky hluboké žilní trombózy a plicní embolie. Přes více než 30 let, kdy je toto vyšetření dostupné, prodělalo vyšetření D-dimeru řadu změn, jak v technologii vyšetření, tak i ve stanovení cut-off a interpretaci výsledků. V poslední době je patrná snaha o standardizaci vyšetření a vyjadřování výsledků, kde část výrobců udává údaje vyjádřené jako mg/ml ve fibrinogen ekvivalentních jednotkách (FEU) a část pouze jako mg/ml. První komerční metodiky vyšetření D-dimeru z 90. let minulého století ve formě ELISA stanovení disponovaly dostatečnou citlivostí, ale jednou zásadní nevýhodou, což byla časová náročnost. Z tohoto důvodu byla tato vyšetření nahrazena kvalitativními latex aglutinačními testy první generace, které byly proveditelné ve velmi krátkém čase. Nicméně byly pouze kvalitativní a hodnocení bylo subjektivní. Z toho vyplývala velmi nízká reprodukovatelnost vyšetření. Druhá generace latex aglutinačních testů byla už kvantitativní a aplikovatelná na řadě koagulačních automatů. Vykazovala pouze lehce nižší citlivost oproti ELISA metodikám, které se tou dobou posunuly k fast ELISA metodám s časovou dostupností 30 min. Tyto testy při cut-off D-dimeru 500 ng/ml dokázaly vyloučit trombotickou příhodu s 95 % pravděpodobností. Třetí generace latex aglutinačních testů vyšetření D-Dimeru, na bázi kombinace dvou monoklonálních protilátek, poskytla posun cut-off na 240 ng/ml s 98 % pravděpodobností vyloučení trombotické příhody. V poslední době jsou snahy některých výrobců prosadit cut-off 135 ng/ml s 99 % pravděpodobností vyloučení trombotické příhody, zde je však nutné mít na zřeteli vysoký počet falešně pozi-

tivních vzorků z řady jiných příčin než jsou akutní trombotické komplikace. Využití stanovení D-dimeru se etablovalo zejména na poli vyloučení hluboké žilní trombózy a plicní embolie. Použití pro potvrzení trombotické příhody je zatíženo vysokou nespecificitou vyšetření. Rozšíření kvantitativního stanovení D-dimeru také umožnilo sledování rekurence trombotických komplikací při léčbě, kde je nutné dodržet pravidelné monitorování D-dimeru v průběhu léčby, což je patrné z několika kazuistik.

LYMFOMY I

1656.

Určování rozsahu onemocnění u non – Hodgkinových lymfomů s extralymfatickým šířením – doporučení Kooperativní lymfomové skupiny

Sýkorová Alice, Belada David, Smolej Lukáš, Pytlík Robert, Benešová Kateřina, Vášová Ingrid, Papajík Tomáš, Šálek David, Procházka Vít, Trněný Marek, Matuška Milan, Brejcha Martin, Kubáčková Kateřina, Kabíčková Edita, Mociková Heidi, Campr Vít

(II. interní klinika, oddělení klinické hematologie FN a LF UK Hradec Králové; I. interní klinika VFN Praha; Interní hematoonkologická klinika, FN Brno; Hematoonkologická klinika, FN Olomouc; Ústav klinické hematologie, FN Ostrava; Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín; Radioterapeuticko - onkologické oddělení, FN Motol, Praha; Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol Praha; Oddělení klinické hematologie, FN Královské Vinohrady Praha; Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol Praha)

Východiska: Rozsah nemoci non – Hodgkinových lymfomů (NHL) se obvykle stanovuje podle rozšířené Ann Arbor klasifikace. Tato klasifikace byla původně vytvořena pro Hodgkinův lymfom (HL), který postihuje převážně lymfatické uzliny. U HL se neobjevuje tak časté šíření do extralymfatických orgánů a tkání a primární vznik v extralymfatické tkáni je vzácný. NHL jsou ovšem mnohem častěji spojeny s extralymfatickým šířením a asi 1/3 případů se řadí mezi primárně extranodální lymfomy. Proto je použití rozšířené Ann Arbor klasifikace v těchto případech u NHL omezené. V rámci zpracování dat registru NHL Kooperativní lymfomové skupiny (KLS) bylo zjištěno, že určení rozsahu postižení u NHL není v České republice jednotné v těch případech, kdy se jedná o diseminaci onemocnění do extranodálního orgánu nebo tkáně. Cíl: Na konci roku 2009 byl vypracován návrh určení klinického stadia u NHL se zvláštním zřetelem k postižení extralymfatických orgánů/tkání pro potřeby lymfomového registru KLS. Tento návrh byl připomínkován členy výboru KLS a přijat na zasedání výboru v Brně v lednu roku 2010. Výsledky: Na zasedání výboru KLS v lednu 2010 byla přijata dohoda týkající se určení klinického stadia NHL s nodálním i extranodálním šířením. Pro účely určení klinického stadia a tomu odpovídající léčebné intenzity byly extralymfatické orgány roz-

Stadium	„Velké“ extranodální orgány (dle Ann Arbor klasifikace)	„Malé“ extranodální orgány (dle klasifikace pro primární extranodální lymfomy podle Musshoffa)
IE	Lokalizované postižení 1 extralymfatického orgánu	Jakékoliv (lokalizované, diseminované, difúzní) postižení 1 extralymfatického orgánu
IIIe	Lokalizované postižení 1 extralymfatického orgánu s postižením uzlin (LU) na stejné straně bránice	Jakékoliv postižení 1 extralymfatického orgánu a postižení LU na stejné straně bránice
IIIe	Lokalizované postižení 1 extralymfatického orgánu s postižením LU na obou stranách bránice	Jakékoliv postižení 1 extralymfatického orgánu a postižení LU na obou stranách bránice
IV	Diseminované či difúzní postižení extralymfatického orgánu s nebo bez postižení LU Jakékoliv postižení > 1 extralymfatického orgánu s nebo bez postižení LU	Jakékoliv postižení > 1 extralymfatického orgánu s nebo bez postižení LU

děleny na „velké“ orgány – játra, plíce, kosti, mezotel (pleura, peritoneum, perikard) a měkké tkáně. Všechny ostatní orgány byly definovány jako „malé“. Závěr: U postižení lymfatických orgánů je k určení rozsahu nemoci NHL vhodná rozšířená Ann Arbor klasifikace. Pro extralymfatické šíření nemoci či u primárně extranodálních lymfomů je vhodné tuto klasifikaci lépe přizpůsobit praktickým potřebám. Validita vypracované klasifikace bude hodnocena v prospektivních i retrospektivních studiích KLS.

1665.

Udržovací léčba rituximabem u lymfomů - možnosti v roce 2010.

Belada David

(II.interní klinika FN a LF UK, Hradec Králové)

I přes pokroky v léčbě pacientů s ne Hodgkinovými lymfomy velká část pacientů relabuje. Cytostatika i INF alfa jsou v rámci udržovací terapie provázeny výraznou toxicitou. Velmi dobrá efektivita, minimální toxicita a dlouhý biologický poločas monoklonální protilátky anti CD20 – rituximabu - z něj činí ideální molekulu pro udržovací léčbu. V roce 2010 je jeho standardní indikací podávání u nemocných s relapsem FL, kde bylo indukční terapií dosaženo minimálně parciální remise (PR) – zde je podáván 1x po 3 měsících po dobu 2 let. Úplnou novinkou jsou výsledky mezinárodní randomizované studie PRIMA v 1.linii FL. Nemocní po podání imunochemoterapie (R-COP nebo R-CHOP nebo R-FCM – výběr dle rozhodnutí centra), u kterých bylo dosaženo minimálně PR, byli randomizováni mezi observaci a udržovací léčbu rituximabem 1x po 2 měsících po dobu 2 let nebo. Při mediánu sledování 25 měsíců bylo prokázáno statisticky významné prodloužení doby do progresu u nemocných, kteří byli léčeni udržovací léčbou rituximabem ($p < 0.0001$). Udržovací léčba rituximabem v 1.linii se tak stává v současné době standardní terapií. U ostatních lymfomů se jeví nadějně udržovací léčba rituximabem u lymfomů z plášťové zóny, výsledky zatím ale nejsou zcela jednoznačné. U difúzního B-velkobuněčného lymfomu jsou výsledky udržovací léčby nejednoznačné. Probíhají randomizované studie - v rámci 1.linie probíhá studie NHL-13, ve které jsou nemocní po terapii R-CHOP randomizováni mezi udržovací léčbu rituximabem (1x po

2 měsících po 2 roky) a observaci. U pacientů s relapsem difúzního B-velkobuněčného lymfomu probíhá studie CORAL, kde jsou mladší nemocní do 60 let randomizováni mezi záchrannou léčbu R-ICE a R-DHAP a poté po autologní transplantaci, následně s 2. randomizací mezi udržovací léčbu rituximabem (1x po 2 měsících po 2 roky) a observaci. Celkově lze shrnout, že udržovací léčba rituximabem je standardní léčebnou možností u nemocných s FL v první linii i v relapsu, navíc je i „cost-efektivní“. Léčba se z hlediska toxicity jeví jako velmi dobře tolerovaná, bez závažnějších nežádoucích účinků. Přesto je v tomto konceptu stále několik otázníků, a to dlouhodobá bezpečnost podávání, optimální schéma aplikace či způsoby léčby při relapsu lymfomu při udržovací léčbě. Udržovací léčba rituximabem představuje velkou naději do budoucna a dá se předpokládat její rozšíření i na další typy lymfoproliferativních nemocí. Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR: NR/9453-3 a výzkumným záměrem MZO 00179906.

1713.

Nehodgkinské lymfomy gastrointestinálního traktu u dětí a dospívajících, klinicko-patologická analýza a výsledky léčby protokoly německé pracovní skupiny NHL-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster)

Kabíčková Edita, Sumerauer David, Votrubová Jana, Bělohávek Otakar, Mejstříková Ester, Gajdoš Petr, Kynčl Martin, Kodet Roman, Starý Jan

(Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2.LF a FN Motol, Praha; PET Centrum Nemocnice Na Homolce, Praha; Klinika dětské hematologie a onkologie, FN Motol, Praha; Klinika zobrazovacích metod UK 2.LF a FN Motol, Praha; Ústav patologie a molekulární medicíny 2.LF UK a FN Motol, Praha)

Úvod: Nehodgkinské lymfomy (NHL) jsou nejrychleji rostoucí zhoubné nádory v dětském věku, v době stanovení diagnózy je častá lymfogenní i hematogenní diseminace. Přibližně třetina pacientů má primárně postiženou oblast břicha, většina abdominálních NHL je B typu. Cíle: Analýza klinicko – patologických dat, zhodnocení léčebné odpovědi a přežití pacientů s NHL gastrointestinálního traktu. Pacienti a metody: V období 1993-2009 jsme na Klinice dětské hematologie a onkologie léčili celkem 224 dětí s NHL, 58 (26 %) s postižením GIT. Nejčastějším histologickým typem byl Burkittův lymfom (72 % pacientů). Ve skupině bylo 48 chlapců a 10 dívek s mediánem věku v době diagnózy 10 let (2-18). Primární GIT lymfom mělo 25 dětí (43 %), diseminované onemocnění s postižením GIT mělo 33 dětí, nejčastěji byla infiltrovaná ileocekální oblast (77 %). Onemocnění stadia II (St.Judeův Staging) mělo 11 pacientů, stadium III 45 pacientů, stadium IV dva pacienti. Podle rozsahu onemocnění a hladiny LDH zahrnoval léčebný plán 2 nebo 4 cykly chemoterapie pro pacienty nižšího stupně rizika (skupina R1, R2; 15 dětí). Pacienti s onemocněním vysokého stupně rizika (skupina R3, R4; 43 dětí) absolvovali 5-6 cyklů intenzivnější chemoterapie. Výsledky: Indukční chemoterapií dosáhlo kompletní remise 53 paci-



entů (90 %), u 5 dětí s iniciálně refrakterním NHL nádor na intenzivní léčbě progredoval, všechny zemřely na rychlou progresi lymfomu (medián 5 měsíců od stanovení diagnózy). Na závažné infekční komplikace zemřelo 6 dětí (10%). Po ukončené léčbě relabovali 2 pacienti, (5 a 11 let po léčbě), oba dosáhli záchrannou léčbou 2. remise, jeden z nich zemřel 7 let po léčbě relapsu na pneumokokovou sepsi. S mediánem sledování 10 let (0,7-17) žije bez známek onemocnění 45 pacientů (OS 79 %). U žádného pacienta nevznikl sekundární ani pozdní projevy závažného orgánového postižení. Závěr: Postižení GIT jsme diagnostikovali u 1/4 dětí s NHL, nejčastějším typem byl Burkittův lymfom. V době stanovení diagnózy měla polovina dětí infiltrované také nitrohruďní orgány. Vysoká proliferativní frakce lymfomových buněk vysvětluje mimořádnou citlivost nádoru k chemoterapii, intenzivními BFM protokoly lze vyléčit více než 75% pacientů. Intenzivní chemoterapie je provázána závažnými infekčními komplikacemi (i při adekvátní podpůrné léčbě). Nepříznivou prognózu mají děti s iniciálně refrakterním onemocněním. Podpořeno granty IGA MZ ČR NS/9997-4, NS/10480-3 a výzkumnými záměry MZ0FNM2005.

1788.

Redukce toxicity primární léčby pokročilého Hodgkinova lymfomu. GHSG, studie HD15

Marková Jana, Král Zdeněk, Móciková Heidi, Šmardová Lenka, Žikavská Lubica, Klásková Kateřina, Skopalová Magdalena, Bolčák Karel, Dědečková Kateřina, Čoupková Irena, Vernerová Zdeňka, Kamarádová Kateřina, Campr Vít, Kozák Tomáš

(Oddělení klinické hematologie FN Královské Vinohrady, Praha; II. interní hematologická klinika FN Brno, Bohunice, Brno; PET centrum, Nemocnice Na Homolce, Praha; Masarykův onkologický ústav, Brno; Ústav radiční onkologie FN Na Bulovce, Praha; Ústav patologie FN Královské Vinohrady, Praha; Ústav patologie, FN Motol, Praha; Oddělení klinické hematologie, FN Královské Vinohrady, Praha)

Úvod: cílem studie HD15 German Hodgkin Study Group (2003–04/2008) bylo zjistit, zda lze snížit intenzitu

dávky chemoterapie a omezit radioterapii u pokročilých stádií Hodgkinova lymfomu a zároveň zachovat výborné výsledky studie HD9. Se standardním ramenem (A) 8x BEACOPP eskal byla srovnávána dvě experimentální ramena: (B) 6x BEACOPP eskal a (C) 8x BEACOPP14. Radioterapie (RT) jen v případech PET pozitivní parciální remise (rezid tu ≥ 2.5 cm). Pacienti a metody. Do studie HD15 bylo zařazeno z FN Královské Vinohrady Praha a FN Brno 186 pacientů (pts). 54% mužů, medián věku 30 let (r 18 – 59). Stádium IIB s RF 22%, stádium III 37% a stádium IV 41% pts. IPS 0-2 mělo 60% pts, IPS 3–7 40%. Histologie: NS 77% , MC 20%, LPHD 2% a ostatní 1% pts. Poměr pts v ramenech studie: A, B, C: 39%, 33% a 28%. Medián sledování žijících pts k 31.3.2010 60 měsíců (r24-87). Výsledky: Kompletní remise po skončené léčbě dosáhlo 175 (94 %) pts. Tři zemřeli na akutní toxicitu léčby, 8 pts progredovalo. U 159 pts byl PET po terapii negativní, ale v dalším průběhu relabovalo 8 pts, negativní prediktivní hodnota PET (NPV) po ukončené terapii je 95%. Vysoká NPV se s přibývajících pozdními relapsy (většinou u pts bez RT!!!) lehce snižuje. PET po skončené chemoterapii byl pozitivní u 24 pts (8 z nich progredovalo). Pozitivní prediktivní hodnota (PPV) PET je 33%. RT byla provedena jen u 30 pts (16%). AML/MDS se vyskytla u 2 pts (jeden žije po aloSCT, druhá pt zemřela). Celkem zemřelo 8 pts (4.3%). Příčiny: akutní toxicita léčby u 3 pts, progres HL u čtyř pts, sekundární malignita AML/MDS 5 let po terapii 1x. Pětileté celkové přežití (OS) je 95,7 % (95% CI, 81-85). Očekávané události (progrese, relaps, úmrtí) se vyskytly u 20 (10,7%) pts. 5-letý FFTF je 89,3% (95% CI, 76–82). Závěr: Celkové výsledky našeho souboru ve srovnání s multicentrickou studií HD15 jsou velmi dobré. Významné je především nízké procento úmrtí na akutní toxicitu léčby. Nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi jednotlivými rameny studie (A,B,C) v hodnotách 5-letého FFTF a Hodgkin specifického FFTF. Tento závěr podporuje původní hypotézu studie, že je možné snížit intenzitu léčby, aniž by došlo k ovlivnění výsledků léčby (předpoklad: méně intenzivně léčení pacienti budou mít méně pozdních následků). Konečné hodnocení multicentrické studie HD15 GHSG je plánováno na rok 2013. Podpořeno grantem IGA MZ ČR, NR 8033–6/2004

1615.

Pozitivní PET před autologní transplantací periferních kmenových buněk je spojen se zlou prognózou u pacientů s relabovaným Hodgkinovým lymfomem

Móciková Heidi, Pytlík Robert, Marková Jana, Steinerová Kateřina, Král Zdeněk, Belada David, Trnková Marie, Trněný Marek, Koza Vladimír, Mayer Jiří, Žák Pavel, Kozák Tomáš (Oddělení klinické hematologie FN Královské Vinohrady, Praha; 1. Interní klinika a 1.LF UK VFN Praha; Oddělení hematologie, FN, Plzeň; Interní hematologická klinika LF MU a FN, Brno; Klinika hematologie, FN, Hradec Králové; Národní registr kmenových buněk ČR – datacentrum, Praha)

Úvod. Autologní transplantace periferních kmenových buněk (ASCT) je standardní léčbou u pacientů s relapsem Hodgkinova lymfomu (HL), ale vede k vyléčení pouze u poloviny z nich. Je známých několik rizikových faktorů, které zvyšují riziko relapsu po ASCT. Cíl studie. Tato retrospektivní studie hodnotila sekundární klinické rizikové skóre v relapsu, prognostický význam pozitronové emisní tomografie (PET) a dosažení kompletní remise (KR) hodnocené pomocí CT po záchranné chemoterapii před ASCT u 76 pacientů s relabujícím/refraktérním HL. Metody. Přežití bez relapsu nebo progresu (PFS) a celkové přežití (OS) bylo hodnoceno pomocí Kaplan-Meierovy metody. Rozdíly v přežití mezi podskupinami byly vyhodnoceny pomocí log-rank testu. Výsledky. Medián sledování pacientů po ASCT byl 23 měsíců. Celkově 11 (55%) z 20 PET pozitivních pacientů a 14 (25%) z 56 PET negativních pacientů zrelabovalo po ASCT. 2-letý PFS u PET negativních vs PET pozitivních pacientů byl $72.7 \pm 6.3\%$ respektive $36.1 \pm 11.6\%$, ($P=0.01$). 2-letý OS u PET negativních vs PET pozitivních pacientů byl $90.3 \pm 4.1\%$ respektive $61.4 \pm 11.6\%$, ($P=0.009$). V univariacních analýzách, sekundární klinické rizikové skóre v době relapsu HL, primárně refraktérní nemoc nebo dosažení KR podle CT scan nebylo statisticky signifikantně spojeno s PFS a OS. V multivariacní analýze byl PET statisticky signifikantní pro PFS pouze v kombinaci s ostatními faktory (klinickým rizikovým skóre a dosažením KR dle CT) ($P=0.017$). Multivariacní analýza ani jednoho z těchto faktorů nebyl statisticky signifikantní pro OS ($P=0.08$). Závěr. Pozitivní PET před ASCT určuje vysoce rizikovou podskupinu pacientů s horším PFS a OS oproti PET negativním pacientům. Tato vysoce riziková podskupina pacientů může mít prospěch z další léčby po ASCT.

MDS

1671.

Evropský registr nemocných s myelodysplastickým syndromem

Čermák Jaroslav jménem Pracovní skupiny pro MDS European LeukemiaNet

(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Evropský registr pro nemocné s MDS vznikl počátkem roku 2009 v rámci projektu European LeukemiaNet. V první fázi bylo k účasti v projektu vybráno 11 zemí z různých evropských regionů a byli sledováni nově diagnostikovaní nemocní s nízkým a středním-1 rizikem podle IPSS. Po náborech prvních 400 nemocných byla provedena první metaanalýza údajů v registru. Cílem studie bylo kromě získání demografických údajů zmapovat i klinické nálezy, celkový stav nemocných, typ léčby včetně podávání transfuzí a stav zásob železa, délku přežití a incidence progresu k pokročilým stádiím MDS. Ve skupině analyzovaných nemocných převažovali muži (63%), medián věku byl 74 let (rozmezí 18-95 let), 94% nemocných

bylo bílé rasy. Nejčastější diagnózou byla dle WHO klasifikace (2001) RCMD (28,5%), dále RARS (21,0%), RA (20,2%), RAEB-1 (13%), 5q- syndrom (6,8%), RCMD-RS (6,5% a MDS-U (4,0%). Predominance výskytu u mužů byla u RA (70,4%), u žen byla u 5q- syndromu (77,8%), 86,5% nemocných mělo ve dřeni < 5% blastů, 77,3% nemocných mělo příznivý karyotyp dle IPSS, 55,8% nemocných mělo 1 cytopenii, 18,5% mělo cytopenii ve 2 řadách, dělení podle IPSS bylo následující: 0- 50,0%, 0,5 - 28,2%, 1- 14,8%, neklasifikováno - 7%. Hodnota skóre dle Karnofského se u většiny nemocných pohybovala mezi 80-100%, hodnocení denní aktivity pomocí EQ 5D skóre bylo v průměru 70 ze 100 možných bodů. Z komorbidit byly nejčastější kardiovaskulární choroby (28%), dále diabetes mellitus (16%) a onemocnění dýchacích cest (13%), nejčastěji užívanou skupinou léků byla antihypertenziva (37%). Medián skóre komorbidit dle Sorora činil 2,4. Pouze 37% nemocných dostávalo v této fázi choroby nějakou léčbu, většina z nich (31%) byla léčena rHu-EPO, transfuze erytrocytů dostávalo 27% nemocných. Průměrná hodnota feritinu v séru činila 289 $\mu\text{g/l}$, chelační léčbu dostávala pouze 3% nemocných (vzhledem ke krátké době sledování - v průměru 175 dní), hodnota feritinu v séru byla u této skupiny v době zahájení léčby 1638 $\mu\text{g/l}$. Během doby sledování nemocných došlo k progresi do pokročilého MDS u 3,3% nemocných a zemřelo 16 nemocných (4%), z toho 9 na jiné příčiny než MDS. Během prvního roku bylo do registru zařazeno více než 600 nemocných, z toho 59 z České republiky, za což patří díky všem participujícím centrům a koordinátorce studie pro ČR Ivaně Karlachové a vedoucí studijní sestře Janě Ryšavé.

1754.

Transkripční faktory EKLF a Fli1 u 5q minus syndromu. Srovnání s nálezem u MDS o nízkém riziku s normálním 5. chromozomem.

Neuwirtová Radana, Fuchs Oto, Jonášová Anna, Čermák Jaroslav, Šišková Magda, Vondráková Jana, Hochová Iana, Libiger Jiří, Nováková Ludmila, Kadlčková Eva, Kostečka Arnošt, Holická Monika, Provazníková Dana, Michalová Kyra, Březinová Jana

(1. interní klinika VFN, Praha; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Hematologicko-onkologická klinika FN, Olomouc; OKH FN Motol, Praha; OKH Masarykova nemocnice, Ústí n.L.; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; HTO Baťova nemocnice, Zlín; Centrum nádorové cytogenetiky VFN, Praha)

Úvod V průběhu hemopoézy má krátce společnou kmenovou buňku destičková a erytroidní řada (MEP). O diferenciaci MEP do destičkové řady rozhoduje kromě jiných faktorů transkripční faktor Fli1 (Friend leukemia integration 1), do erytroidní řady EKLF (Erythroid Krüppel-Like Factor). Mezi nimi existuje zkřížený antagonismus. Typickým znakem 5q minus syndromu (5q-sy) je makrocytární anemie a zvýšený počet destiček. Položili jsme si

otázku, zda by změny obou zmíněných faktorů mohly vysvětlit příznaky 5q-sy. Výsledky u 5q-sy jsme srovnali s nálezy pacientů s MDS low risk s normálním 5. chromozomem (norm.5q). Metoda a materiál Hladiny Fli1 a EKLf mRNA byly vyšetřeny v krvi u 28 nemocných, ve dřeni u 17 nemocných s 5q-sy. U nemocných s norm.5q byly vyšetřeny vzorky krve u 23 a dřene u 16 nemocných. Hodnoty byly srovnány se zdravými kontrolami (krev-16 a dřeň-8). Expresce genů Fli1 a EKLf byla stanovena v mononukleárech periferní krve a kostní dřene izolovaných na gradientu Ficoll-Paque. Expresce obou faktorů byla změřena pomocí kvantitativní RT-PCR v reálném čase. Vzorky byly vyšetřeny duplicitně. Jako srovnávací gen byla použita expresce genu pro glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázu. Výsledky Expresce Fli1 mRNA byla u 28 pacientů s 5q-sy zvýšena v krvi ve srovnání s kontrolami ($p=0.0003$). U 23 MDS s norm.5q jsme našli rovněž zvýšení Fli1 ($p=0.04$). Ve dřeni Fli1 u 5q-sy bylo zvýšeno ($p=0.05$), zatímco u MDS s norm.5q nebyl proti kontrolám rozdíl ($p=0.97$). EKLf u 5q-sy v krvi je na rozdíl od Fli1 výrazně sníženo proti kontrole ($p=0.006$), zatímco u MDS s norm. 5q je naopak hladina EKLf oproti kontrole mírně zvýšena ($p=0.04$). U 5q-sy je EKLf ve dřeni dle očekávání zřetelně sníženo ($p=0.0008$). Ve dřeni u MDS s norm. 5q je EKLf podobně jako v krvi mírně zvýšeno ($p=0.006$). Závěr Naše výsledky měření genové exprese mRNA faktorů Fli1 a EKLf jsou v souladu s očekávanými nálezy u 5q-sy: zvýšení Fli1 odpovídá trombocytémii u 5q-sy a snížení exprese EKLf by měla odpovídat anemii u těchto pacientů. U nemocných s MDS s norm.5q přes heterogenitu nemocných se ukázalo mírné zvýšení Fli1 i EKLf v krvi provázené zvýšením EKLf i ve dřeni. U MDS s norm.5q se nabízí účelové vysvětlení tohoto nálezu v podobě snahy organismu kompenzovat cytopenii zvýšením obou faktorů, podobně jako je tomu u zvýšení erythropoetinu a trombopoetinu. u většiny MDS nemocných.

1662.

Bodové mutace N-RAS genu u pacientů s myelodysplastickým syndromem jako nepříznivý prognostický faktor onemocnění

Štemberková Radka, Laššuthová Petra, Čechová Hana, Staňková Martina, Hrabáková Pavla, Jenčík Ján, Čermák Jaroslav, Žižková Hana

(Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha)

ÚVOD: N-ras gen kóduje malé proteiny s GTPázovou aktivitou, které jsou součástí buněčné signalizace. Bodové mutace vedoucí ke změně konformace proteinů mohou způsobit jejich trvalou aktivaci. Předpokládá se, že tyto aktivující mutační změny N-ras genu hrají důležitou roli v rozvoji celé řady nádorů, včetně hematologických malignit. **CÍL:** Bodové mutace N-ras genu byly studovány u pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS) a de novo akutní myeloidní leukémií (AML) s cílem objasnit jejich význam v diagnóze a prognóze onemocnění. **METODIKA:**

DNA izolovaná z periferní krve (PK) nebo kostní dřene (KD) 107 pacientů s MDS (17xRA/RARS, 34xRCMD, 4x5q-, 23xRAEB1/2, 19xAML, 10xMDS/MPS; dle WHO klasifikace) a 73 pacientů s de novo AML (5xM0, 14xM1, 21xM2, 6xM3, 21xM4, 5xM5, 1xM6; dle FAB klasifikace) na přítomnost bodových mutací ve 12. a 13. kodonu N-ras genu metodami polymerázové řetězové reakce a přímého sekvenování v obou směrech. **VÝSLEDKY:** Mutace N-ras genu byly přítomny u 8% (9/107) MDS pacientů a u 18% (13/73) pacientů s de novo AML. V MDS skupině byla většina mutací nalezena v kodonu 12 (7 z 9 mutací), dva pacienti měli mutace v obou kodonech. V porovnání s časnými formami MDS, byly mutace častěji detekovány u pacientů s pokročilými formami MDS (8 z 9, $P=0.012$). Nejčastěji byly mutace detekovány u pacientů s AML (AML vs. MDS: $P=0.02$). V AML skupině byly mutace ve 12. a 13. kodonu nalezeny přibližně ve stejném poměru (7/13 a 6/13). Nejčastěji byly mutace detekovány u pacientů s AML M2 subtypem (6/13, $P=0.018$). Námi nalezené mutace N-ras genu vedou k záměně aminokyselin. Nejobvykleji pozorovanou substitucí byla tranzice GGT na GAT ve 12. kodonu. U MDS pacientů byla detekována vyšší mutační variabilita než u AML pacientů. MDS pacienti s N-ras mutací přežívali signifikantně kratší dobu (medián 9 měsíců) v porovnání s pacienty bez mutace (medián 59 měsíců, $P=0.001$). Přežití pacientů s AML s mutací a bez mutace se nelišilo (medián 16 měsíců, $P=0.82$). Přítomnost mutací N-ras genu nesouvisela s počtem blastů v PK/KD pacientů s MDS či AML. **ZÁVĚR:** Zjistili jsme, že přítomnost mutací N-ras genu u MDS pacientů je jednoznačně spojena s kratší dobou celkového přežití. Zjistili jsme nárůst výskytu mutací směrem k pokročilým formám MDS. Naše nálezy naznačují význam a použitelnost mutací N-ras genu jako pomocného prognostického faktoru při stanovení individuálního rizika MDS pacientů. Podpořeno grantem MZČR 00012736 Email: radka.stemberkova@uhkt.cz

1670.

Incidence a léčba stavů s přetížním železem – studie Paillette 2

Čermák Jaroslav a Česká skupina pro Myelodysplastický syndrom (MDS)

(Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha)

Koncem roku 2009 a počátkem roku 2010 proběhla studie PAILETTE 2, jejím účelem bylo po více než roce opět zmapovat incidenci a léčbu stavů s přetížním železem a porovnat současné výsledky s nálezy ze studie PAILETTE 1. Studie se zúčastnilo 68 lékařů ze všech regionů České republiky a bylo hodnoceno 372 nemocných. Oproti minulé studii se zvýšil počet nemocných, u nichž byl znám počet podaných transfuzí v minulosti (75,5% nemocných) a hladina feritinu v séru (90,6% nemocných). Medián věku nemocných byl 73,0 let, u 59,4% nemocných byla stanovena dg. MDS, u 40,6% šlo o jiné onemocnění (vrozené a získané poruchy červené krevní řady, myeloproliferace, hereditární hemochromatóza). Prů-

měrný počet podaných transfuzí se v obou studiích nelišil (50,6 TU v.s. 51,8 TU), průměrná hodnota feritinu v séru byla 1566,5 µg/l (1845,3 µg/l ve studii PAILETTE 1), hodnota feritinu v séru u chelatovaných nemocných před zahájením léčby činila 2257,5 µg/l. Více než 20 TU erytrocytů obdrželo 80,1% nemocných, chelatační léčba byla zahájena u 40,6% nemocných (oproti 27,9% ve studii PAILETTE 1), medián délky chelatační léčby byl 373,0 dne. Při srovnání počtu léčených nemocných s počty nemocných s různou iniciální hodnotou feritinu bylo zjištěno, že vesměs všichni nemocní s hodnotou feritinu > 1500 µg/l (39,4%) obdrželi chelatační léčbu. U 58,0% nemocných došlo po léčbě k poklesu hodnot feritinu v séru (46,5% ve studii PAILETTE 1), průměrný pokles hodnoty feritinu v séru činil 284,8 µg/l (ve studii PAILETTE 1 se po léčbě hodnota feritinu dokonce zvýšila o 70,3 µg/l). Pokud jde o použité chelatační přípravky, došlo k významnému posunu ve prospěch deferasiroxu (53,6% v.s. 43,4%) oproti deferipronu (Ferriprox, Apotex) (33,1% v.s. 58,4%), snížil se počet nemocných léčených deferioxaminem. Chelatační léčba byla ukončena či přerušena jen u 9,3%. Studie PAILETTE 2 ukázala významný kvantitativní i kvalitativní posun v chelatační léčbě oproti studii PAILETTE 1, výrazně se rozšířil počet chelatovaných nemocných zejména ve skupině s iniciálními hodnotami feritinu > 1500 µg/l, prodloužila se délka chelatační léčby a bylo dosaženo negativní bilance železa u téměř 60% nemocných a došlo i k významnému poklesu hodnot feritinu v séru. Změnilo se i spektrum používaných chelatačních přípravků ve prospěch deferasiroxu.

1781.

První zkušenosti České MDS skupiny s terpií 5-Azacitidinem (5-AZA) u nemocných s Myelodysplastickým syndromem s vyšším rizikem (IPSS střední II a vysoké riziko) a AML.

Jonášová Anna, Nováková Ludmila, Bělohlávková Petra, Vondráková Jana, Červínek Libor, Čermák Jaroslav (1. interní klinika VFN, Praha; UHKT, Praha; FN, Hradec Králové; FN, Olomouc; FN, Brno)

Úvod. Terapie vyšších rizikových skupin MDS je stále problematická. Jedinou kausální terapií je allogenní transplantace, ta však s ohledem na průměrný věk nemocných s MDS je dostupná malému % nemocných. Moderní léčba je hlavně orientována na prodloužení přežívání, doby do transformace do AL a zlepšení kvality života. Tyto cíle splňuje epigenetická terapie zvláště pak inhibitory metyltransferázy. Naše práce je věnována zkušenostem České MDS skupiny s 5-Azacitidinem (5-AZA) u nemocných z vyšších rizikových skupin MDS (IPSS střední II a vysoké riziko) a AML. Pacienti a výsledky. Od října 2008 do února 2010 bylo léčeno 29 nemocných (19 M, 10 F). Medián věku byl 65,7 let (50-83 let), medián doby od stanovení diagnózy do zahájení terapie byl 2,2 měsíců (0-76). Dle WHO klasifikace bylo léčeno 12 RAEB

II, 1 RAEB - 1, 1 CMML1, 1 CMML 2, 6 AML <30% MB, 4 AML >30% MB, 2 MDS/MPS. U 2 pts šlo o sekundární MDS. 13 bylo předléčených, z toho 8 relapsů a 5 refrakterních chorob (4 po BMT, 9 po předchozí chemoterapii). Z terapeutického hlediska problematických bylo 15 pts. Cytogenetika byla k dispozici u 24 pts, 6 mělo prognosticky příznivé, 9 intermed. a 9 špatné nálezy. Medián délky sledování byl 4 měsíce (rozsah 1-18), medián podaných cyklů 3 (rozsah 1-13). Medián dávky Vidazy 71,5mg/kg/den (50-75mg). Použité režimy: 7 denní u 18, ostatní u 11 pts. Redukce dávky byla u 8 pts. Z nežádoucích účinků převažovala hematologická toxicita (neutropenie a trombocytopenie) Gr3/4 u 14 pts, nehematologická toxicita (reakce v místě vpichu a GIT toxicita) byla většinou Gr 1/2. Hospitalizace pro komplikace cytopenie byly nutné u 7 pts. 1 nemocný zemřel na infekční komplikace. Odpovědi. Hodnotitelných bylo 24 pts, 2 dosáhly CR, 2 CRi, 3 PR, 1 HI, 4 SD a 12 bylo PD. Celkem tedy odpovědělo 50% pts (včetně SD) s velmi dobrou odpovědí u 30% (bez SD). Analýza vlivu na celkové přežívání zatím z důvodu krátkého sledování je obtížná. Závěr. Hlavním benefitem Vidazy je prodloužení doby přežívání a transformace do AML to zatím u našeho souboru je obtížně hodnotitelné. Naše výsledky dosažení odpovědi dobře korelují s daty publikovaných studií (AZA 001, CALGB 9221). Nutné je brát v úvahu, že náš soubor byl na rozdíl od standardních studií vysoce rizikový (předléčení, relabování, refrakterní nemocní a zařazení nemocných s AML nad 30% MB). I přes to jsou výsledky i zatím malého souboru nemocných uspokojivé. V definitivní presentaci budou analyzována další nová data za posledních 5 měsíců.

1821.

Alogenní transplantace krvetvorných buněk u pacientů s myelodysplastickým syndromem a sekundární akutní myeloidní leukémií – retrospektivní analýza.

Vondráková Jana, Bělohlávková Petra, Zapletalová Jana, Raida Luděk, Žák Pavel, Jebavý Ladislav, Voglová Jaroslava, Zavřelová Alžběta, Skoumalová Ivana, Jarošová Marie, Faber Edgar, Malý Jaroslav, Indrák Karel (HOK FN a LF Univerzity Palackého, Olomouc; Oddělení klinické hematologie II. interní klinika, FN a LF Univerzity Karlovy, Hradec Králové; Ústav lékařské biofyziky, LF Univerzity Palackého, Olomouc)

Úvod: Myelodysplastický syndrom (MDS) představuje prognosticky heterogenní skupinu chorob s potenciálně různým rizikem přechodu v akutní leukémii (AL). Jednou z léčebných možností tohoto syndromu je alogenní transplantace krvetvorných buněk (aloTKD), která se v současné době díky moderním přípravným režimům stává dostupnější. Nicméně řada otázek stále zůstává nevyjasněných. Cílem retrospektivní analýzy bylo proto zhodnocení provedených aloTKD ve dvou transplantačních centrech se zaměřením na celkový přínos aloTKD pro

MDS nemocné, zhodnocení jejich prognostických parametrů i vlastního průběhu aloTKD a OS. Soubor nemocných: Celkem se jednalo o 30 nemocných, muži a ženy v poměru 1:1, transplantovaní v letech 1997 – 2010 ve věku 23 – 63 let (medián 56). Dle klasifikace WHO 2001 se iniciálně jednalo o 2x 5q- sy (7%), 2x RARS (7%), 9x RCMD (30%), 6x RAEB I (20%), 11x RAEB II (36%). Dle IPSS byla prognóza hodnocena jako 2x (6%) nízké, střední int-1 11x (37%) a int-2 11x (37%), dále 6x (20%) vysoké riziko přechodu v AL. Ve 13ti případech (43%) byla provedena aloTKD až ve fázi AL, většinou po předchozí indukční, resp. i konsolidační chemoterapii. 6 (20%) nemocných podstoupilo aloTKD při progresi v pokročilejší stádium MDS a 11 (37%) se stacionární chorobou. Myeloablativní přípravný režim absolvovalo 11 nemocných (37%) a režim s redukovanou intenzitou 19 (63%). 14x byla provedena transplantace příbuzenská, 16x nepřibuzenská, z toho 1x byla použita kostní dřev, v ostatních případech periferní kmenové buňky. Výsledky: Medián sledování od dg. MDS byl 33 měsíců, od aloTKD 15 měsíců. Transplantace byla provedena v mediánu 11 měsíců od dg. MDS. V celém souboru zemřelo 11 nemocných – příčinou byla 4x progresse choroby, 4x infekční komplikace, 3x GVHD a současná infekce. Jednalo se o iniciálně nejvíce rizikové MDS, 8 (27%) transformovalo v AL, dle IPSS bylo iniciálně 4x (13%) vysoké riziko, 7x (23%) střední (int-2 a int-2). Medián od diagnózy byl 12 a od TKD 3 měsíce. Ostatní nemocní dosáhli dlouhodobé remise choroby, u méně rizikových MDS byla odstraněna transfúzní dependence a výrazně zlepšena kvalita života. V současnosti žije 19 nemocných (63%) s mediánem sledováním 49 měsíců od dg. MDS a 27 měsíců od aloTKD. Závěr: Ukazuje se, že MDS či sekundární AL lze s využitím aloTKD příznivě kurativně ovlivnit. Zvažování této léčebné možnosti by se proto mělo stát rutinní součástí diagnosticko-prognostického algoritmu u MDS nemocných.

3rd SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY

1850.

Mitocans are efficient against cancer stem-like cells
Neuzil Jiri (*Molecular Therapy Group, Institute of Biotechnology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic, and Apoptosis Research Group, School of Medical Science, Griffith University, Southport, Qld, Australia*)

Neoplastic disease is the number one killer in industrialized countries, with high level of remission post-therapy. It is becoming obvious that recurrence of the pathology is due to a small sub-set of tumour cells with stem-like properties. These cancer stem-like cells (CSCs) have self-maintenance features, low cell cycle activity, and the propensity to resist established radio- and chemotherapy. Post therapy, they may differentiate into fast-proliferating cancer cells to give rise to second-like tumours

with much worse prognosis. We have identified a novel class of anti-cancer agents that act via mitochondrial destabilization, termed mitocans, epitomized by cancer cell-selective vitamin E analogues. These agents act by targeting the mitochondrial complex II, which results in generation of reactive oxygen species (ROS). Recently, we have modified these agents by addition of the triphenylphosphonium group that targets them directly to mitochondria. These compounds, represented by mitochondrially targeted vitamin E succinate (MitoVES), are much more efficient in killing cancer cells than their non-targeted, parental counterparts, while maintaining the cancer cell selectivity. We have recently found that MitoVES, unlike the untargeted vitamin E succinate, very efficiently killed CSCs represented by a mammosphere model, derived from the MCF7 breast cancer cell line. Our data indicate that MitoVES acts by acting on complex II, which results in highly elevated levels of ROS. Since our gene chip analysis indicates that the mammosphere cells with high level of stemness (as identified using gene chip cluster analysis) are more dependent on oxidative phosphorylation, it may be that mitochondrially targeted compounds have a higher propensity to kill these highly recalcitrant cells. We propose that agents like MitoVES may efficiently kill CSCs, whereby contributing to minimalising tumour recurrence.

1625.

Centrosomal decisions on self-renewal in mouse embryonic stem cells

Koledova Zuzana, Raskova Kafkova Leona, Krämer Alwin, Divoky Vladimir
(*Department of Biology, Faculty of Medicine, Palacky University, Olomouc; Clinical Cooperation Unit for Molecular Hematology/Oncology, German Cancer Research Center (DKFZ) and Department of Internal Medicine V, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 581, 69120 Heidelberg, Germany*)

Mouse embryonic stem cells (mESCs) are pluripotent, self-renewing cells derived from early embryos. mESCs have a unique cell cycle structure with a very short G1 phase that lacks functional restriction point and G1 checkpoint. We investigated the causes of these phenomena and we revealed that they all stem from a high and DNA-damage refractory CDK2 activity. As we recently reported, we found out that G1 checkpoint pathways, which abrogate CDK2 activity after DNA damage in somatic cells, are not functional in mESCs due to centrosomal sequestration of Chk1/Chk2 proteins and, importantly, localization of a large proportion of CDK2 molecules to centrosomes. Although alternative G1 checkpoint pathways, including p53-p21 and GSK-3β-CDC25A pathways, were activated in mESCs after DNA damage, they did not impinge on CDK2 activity, suggesting that centrosomal localization shelters CDK2 from checkpoint mechanisms. Furthermore, our studies furnished evidence on CDK2 activity in un-

derpinning rapid G1 phase progression during unperturbed mESC cycles, driving escape from G1 phase in the conditions of DNA damage, as well as maintenance of self-renewal: Downregulation of CDK2 activity slowed down G1 phase progression in mESCs and, importantly, induced somatic cell-like cell cycle, differentiation-associated changes in mESC morphology and expression of differentiation markers. From our observations, we conclude that centrosomal CDK2 might have a crucial function in maintenance of self-renewal in mESC in the conditions of DNA damage and that centrosomes might play an important, mediatory role in the cell fate game in mESCs, providing an interface for crucial cell cycle and cell fate decisions to take place. This work was supported by grants NR/9508 (Ministry of Health), MSM 6198959205 and 2B06077 (Ministry of Education, Youth and Sport), by funds of the Deutsche Krebshilfe (108560) and Deutsche Jose Carreras Leukämie Stiftung (DJCLS R 06/04), and in part by Palacky University grant LF 2010 013.

1848.

Activation of G1/S checkpoint is induced by UV-C irradiation of human embryonic stem cells

Bárta Tomáš, Vinarský Vladimír, Holubcová Zuzana, Doležalová Dáša, Verner Jan, Pospíšilová Šárka, Dvořák Petr, Hampl Aleš

(Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic; Department of Molecular Embryology, Institute of Experimental Medicine, v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic; Center of Molecular Biology and Gene Therapy, Department of Internal Medicine–Hematology, University Hospital Brno, Czech Republic)

Embryonic stem cells progress very rapidly through the cell cycle, allowing limited time for cell cycle regulatory circuits that typically function in somatic cells. Mechanisms that inhibit cell cycle progression upon DNA damage are of particular importance, as their malfunction may contribute to the genetic instability observed in human embryonic stem cells (hESCs). In this study, we exposed undifferentiated hESCs to DNA-damaging UVC light and examined their progression through the G1/S transition. We show that hESCs irradiated in G1 phase undergo cell cycle arrest before DNA synthesis and exhibit decreased cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) activity. We also show that the phosphatase Cdc25A, which directly activates CDK2, is downregulated in irradiated hESCs through the action of the checkpoint kinases Chk1 and/or Chk2. Importantly, the classical effector of the p53-mediated pathway, protein p21, is not a regulator of G1/S progression in hESCs. Taken together, our data demonstrate that cultured undifferentiated hESCs are capable of preventing entry into S phase by activating the G1/S checkpoint upon damage to their genetic complement. Funding: This work was supported by the grants MSM0021622430, AV0Z50390512, AV0Z50390703,

1M0538, LSHG-CT-2006-018739, IGA MZ CR NR9-293-3/2007, MUNI/E/0118/2009

1758.

ISWI chromatin remodeling ATPase Smarca5 (Snf2h) is required for hematopoietic development in mouse

Kokavec Juraj, Kapalova Martina, Curik Nikola, Savvulidi Filipp, Necas Emanuel, Majumdar Romit, Skoultchi Arthur I., Stopka Tomas

(Pathological Physiology and Center of Experimental Hematology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague; Cell Biology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York, NY; Pathological Physiology and Center of Experimental Hematology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and First Medical Department – Hematology, General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic)

Chromatin remodeling plays an important role during normal and malignant hematopoietic cell differentiation. Chromatin remodeling associated Imitation Switch (ISWI) class of ATPase Smarca5 is one of candidate genes involved in maintaining chromatin fluidity that is probably necessary for almost any transaction during hematopoietic gene regulation. Indeed Smarca5 is abundantly expressed in mammalian hematopoietic compartment. In addition, Smarca5 levels are significantly increased in human acute myelogenous leukemia blasts. Our previous studies indicate that the effect of Smarca5 on chromatin is dose dependent with significant impact on distribution of histone marks associated with euchromatin (H3K9Ac and H3K79Me2) and on heterochromatin size. To study role of Smarca5 in hematopoiesis we successfully created a conditional allele (cKO) of Smarca5 in mouse by introducing loxP sites around exon 5. cKO deletion mediated by Cre-recombinase as compared to previously published classical KO (Stopka 2003) is a null allele. Deletion of Smarca5 in any hematopoietic lineage studied (by Cre-mediated deletion in hematopoietic progenitors, B and T cells, granulocytes/monocytes and red cell precursors) resulted in depletion of the studied lineage indicating that Smarca5 is indeed required in these cells. However, the nature of these changes is currently unknown, and profound examination of chromatin structural changes is ongoing and will be also presented on the meeting.

1755.

Acute leukemia caused by low PU.1 level is accompanied by lymphoid defect and its aggressiveness is augmented by loss of p53

Basová Petra, Vargová Karin, Savvulidi Filipp, Necas Emanuel, Stopka Tomas

(Pathological Physiology and Center of Experimental Hematology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague; Pathological Physiology and Center of Experimental Hematology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague; First Medical Department – Hematology, General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic)

PU.1 (Sfpi1) is an extensively studied hematopoietic-specific Ets family transcription factor that plays an essential role in the development of both myeloid and lymphoid lineages. Decreased expression up to 20% by using hypomorph allele of PU.1 in mouse results in a differentiation block and development of acute myeloid leukemia (AML) (Rosenbauer 2004). Since PU.1 expression is also downregulated in chronic lymphoid leukemia (CLL) (our unpublished observation) and p53 mutations are in CLL associated with aggressive behaviour (Gaidano 1991, Dohner 1995) we decided to use the PU.1 knockdown mice carrying the genetic defect upstream a regulatory element of PU.1 (Rosenbauer 2004) and p53 knockout mice produced by deletion of exon 6 resulting in a null allele (Jacks, T., 1994). By using these models we are addressing these two points: 1) to describe effects of PU.1 knockdown on lymphoid development with a focus on searching for possible development of murine CLL, 2) since p53 gene is mutated in approximately 10-15% of myeloid and lymphoid leukemias at diagnosis (Slingerland 1991, Sugimoto 1992) we decided to search whether p53 can enhance tumorigenicity in mice developing either AML or potentially also CLL while concurrently carrying p53 knockout allele. Results: 1) PU.1 knockdown mice with loss of p53 do not develop CLL, instead these mice are markedly deficient (>40 fold) in B-lymphoid cells (N=10). 2) p53 mutations accelerate development of AML in PU.1 knockdown mice (appearing at 2.5 months instead of 5 months of age) (N=20). In conclusion, PU.1 knockdown mice at the level of 20% develop AML with profound lymphoid defect and loss of p53 accelerates development to AML and do not lead to CLL. We think that maybe even lower level of PU.1 in mouse may predispose for potential development of CLL, this approach is being currently addressed.

LYMFOMY II

1797.

Lymfoplazmocytární lymfom a Waldenströмова makroglobulinémie: diagnostická kritéria, klinické nálezy a léčebné možnosti

Papajík Tomáš, Procházka Vít, Indrák Karel

(Hemato-onkologická klinika, FNOL a LF UP, Olomouc)

Lymfoplazmocytární lymfom (LPL) je charakterizován jako zhoubné lymfoproliferativní onemocnění vycházející z malých B-lymfocytů, plazmacytoidních lymfocytů a plazmatických buněk, které ve většině případů infiltrují kostní dřeň (KD), méně často lymfatické uzliny a slezinu. Onemocnění je velmi často spojeno s výskytem paraproteinu IgM v krvi nemocných, i když jeho přítomnost není pro diagnózu LPL nezbytná. Waldenströмова makroglobulinémie (WM) je nalézána u většiny nemocných s LPL a je definována jako LPL s postižením KD a přítomností monoklonálního IgM proteinu v krvi v jakékoliv koncentraci. Buňky LPL na svém povrchu většinu společných znaků B-lymfocytů, jejich fenotyp však není jednoznačně charakteristický. U 50% LPL nacházíme t(9;14), u 50% WM se vyskytuje dalece 6q21. Klinické projevy onemocnění vyplývají z infiltrace kostní dřene patologickými lymfocyty a z výskytu IgM v krvi nemocných. Hyperviskózní syndrom najdeme u 20% pacientů s WM. LPL/WM není v současné době vyléčitelné onemocnění konvenční protinádorovou terapií. V poslední době se však podařilo zlepšit přežití nemocných díky zavedení rituximabu do léčebných schémat, stejně jako použitím purinových analog, bortezomibu či thalidomidu. Řada nových léků prochází navíc poslední fází klinických zkoušek nebo jsou uvolňována pro použití v léčebné praxi (everolimus, bendamustin) jak pro nově diagnostikované, tak pro relabující pacienty. Vysocedávkováná a transplantační léčba by měly být vyhrazeny pro prognosticky nepříznivé mladší nemocné, kde lze předpokládat příznivý poměr rizika výkonu a jeho efektivity. Specifický je také přístup k nemocným s projevy hyperviskozy (indikace plazmaferézy), které mohou být u některých nemocných zhoršeny iniciálním podáním rituximabu (vzestup IgM indukovaný anti-CD20 protilátkou). Podpořeno VZ MŠMT 619 895 9205 a 619 895 922

1700.

Double-hit lymfómy – nová skupina vysoko agresivních B-NHL

Balhárek Tomáš, Barthová Martina, Szépe Peter, Marciněk Juraj, Plank Lukáš

(Ústav patologické anatomie a Konzultačné centrum bioprotektivej diagnostiky ochorení krvotvorby JLF UK a MFN, Martin, SR)

WHO klasifikácia nádorov hemopoetického a lymfoidného tkaniva z roku 2008 zaviedla novú kategóriu neklasifikovateľných B-lymfómov s črtami intermediárnymi med-

zi difúznym veľkobunkovým B-lymfómom (DLBCL) a Burkittovým lymfómom (BL) pre lymfómy tzv. „sedej zóny“ medzi uvedenými entitami. V momente vzniku bolo zrejme, že pôjde o heterogénnu skupinu agresívnych a vysoko agresívnych B-NHL. Tieto lymfómy vzhľadom k morfológickým, fenotypovým a/alebo genetickým odlišnostiam nespĺňajú striktné kritériá BL, ale súčasne pre niektoré „burkittoidné“ črty ich nemožno zaradiť ani do kategórie DLBCL. Unikátnou a relatívne jasne determinovanou podskupinou DLBCL/BL intermediárnych B-lymfómov sú tzv. „double-hit“ resp. „dual-hit“ (DH) lymfómy. Tieto sú definované kombináciou prestavby BCL2 (18q21) alebo BCL6 (3q27) alebo teoreticky aj CCND1 (11q13) s obligatórnou prestavbou MYC (8q24). Raritné prípady s konkomitantnou MYC, BCL2 a BCL6 prestavbou sa označujú ako „triple-hit“ lymfómy. Uvedené abnormality sú súčasťou komplexných zmien karyotypu, ktoré sa nevyskytujú pri BL. DH-lymfómy tvoria cca 10% lymfómov morfológicky klasifikovaných ako BL (nezriedka diagnostikovaných ako tzv. atypické BL) a takmer 40% agresívnych blastických B-NHL s prestavbou MYC vrátane už zrušenej podskupiny „Burkitt-like“ DLBCL. MYC gén býva v prestavbe s génmi pre ťažké (IGH) alebo ľahké reťazce imunoglobulínov (IGL), pomerne časté sú aj prestavby MYC s non-IG partnerom, preto je nevyhnutné vyšetřovať stav MYC lokusu s použitím zlomových FISH sond. Morfológicky sú DH-lymfómy tvorené stredne veľkými centroblastmi s určitým jadrovým pleomorfizmom a možnou prímiesou veľkých blastov, črtami kohezívneho rastu, vysokou proliferačnou aktivitou a častým obrazom tzv. „hviezdneho neba“. Najčastejšie BCL2/MYC DH-lymfómy zvyčajne vykazujú GC-fenotyp (CD10+, bcl-6+) s abnormálnou silnou expresiou bcl-2. BCL6/MYC DH-lymfómy môžu mať GC aj non-GC fenotyp. Incidencia DH-lymfómov narastá s vekom (najčastejšie sú vo veku okolo 60 rokov), u detí sa nevyskytujú. Klinicky ide o vysoko agresívne B-lymfómy s extrémne zlou prognózou (prežívanie <1rok) a to aj napriek intenzívnej liečbe s použitím BL protokolov. DH-lymfómy sú diagnostikované vo vysokom klinickom štádiu alebo ak boli diagnostikované skôr, zvyčajne „neočakávane“ rýchlo progredujú. Problémom pre klinické štúdie je ich zriedkavosť a fakt, že časť z nich uniká diagnostike ako BL alebo veľmi agresívne prebiehajúce DLBCL. Podporené Grantom Ligy proti rakovine, o.z.

1807.

Prínos s porovnaním hodnot SUV (standardized uptake value) u pacientů s různými histologickými podtypy lymfomů při vstupním 18F-FDG PET/CT vyšetření.

Šedová Zuzana, Buriánková Eva, Mysliveček Miroslav, Procházka Vít, Koranda Pavel, Kučerová Ladislava, Floridr Patrik, Jarkovský Jiří, Indrák Karel, Papajík Tomáš
(Hemato-onkologická klinika FNOL a LF UP, Olomouc; Klinika nukleární medicíny FNOL a LF UP, Olomouc; Ústav patologie FNOL a LF UP, Olomouc; Institut biostatistiky a analýz, Masarykova Univerzita, Brno)

Integrovaná PET/CT metóda dokáže presne zobrazit štruktúru, veľkosť a lokalizáciu lymfomovej tkáňe akumulujúcej 18F-FDG. Jednotlivé histologické podtypy non-hodgkinských lymfomů (NHL) môžu mať díky odlišné biologické podstatě a metabolickým procesům různou intenzitu akumulace 18F-FDG, přičemž ta může být také odlišná u jednotlivých nemocných se stejným podtypem lymfomu. Cílem naší práce bylo zhodnocení přínosu stanovení SUV u pacientů s neléčeným NHL v rámci iniciačního 18F-FDG PET/CT vyšetřeni a dále stanovení vzájemné korelace mezi jednotlivými histologickými podtypy NHL, proliferační aktivitou jejich buněk a hladinou laktát-dehydrogenázy v séru (LDH). Celkem bylo od ledna 2007 do srpna 2009 zhodnoceno 149 vstupních 18F-FDG PET/CT vyšetřeni. U každého bylo vypočítáno SUV z patologické leze větší jak 2 cm, která měla nejvyšší hodnotu SUV v těle nemocného (SUVmax). Pro statistickou analýzu byly hodnoceny následující podtypy lymfomů: Difúzní veľkobuněčný B-lymfom (DLBCL), folikulární lymfom (FL), lymfom z buněk plášťové zóny (MZL), lymfom z buněk marginální zóny (MZL), periferní T-lymfom (PTCL), lymfom z malých lymfocytů (SLL) a sloučená skupina T-lymfoblastický lymfom (TLBL) s anaplastickým lymfomem (ALCL). Geometrický průměr hodnot SUVmax byl v celém souboru nemocných 10,2 (95% CI; 9.1 - 11.5;), nejvyšší průměry a mediány hodnot SUVmax dosahovali nemocní s DLBCL, FL, a PTCL, nejnižší pak s MCL, MZL a SLL/CLL. Statisticky významný rozdíl hodnot SUVmax ($p < 0.001$) byl nalezen především mezi nemocnými s DLBCL ve srovnání s pacienty s MCL, MZL a SLL. Překryv hodnot SUVmax mezi DLBCL, FL a PTCL byl velmi výrazný. Podobný překryv hodnot SUVmax < 10 byl zaznamenán mezi DLBCL a ostatními NHL. Statisticky nebyla prokázána korelace hodnot LDH a SUVmax, zatímco hodnoty proliferačního indexu nádorových buněk Ki67 s hodnotami SUVmax korelovaly dobře ($r = 0.409$; $p < 0.001$). U nemocných s Ki67 ≤ 60 byl geometrický průměr SUVmax 8,8, u pacientů s Ki67 > 60 byl geometrický průměr SUVmax 14,3 ($p < 0.001$). Výsledky naší studie potvrzují, že stanovení SUVmax při iniciačním vyšetřeni u NHL nepředstavuje ve většině případů přínos pro zpřesnění diagnostiky nemocných. Korelace hodnot SUVmax s hodnotami Ki67 naznačuje, že by SUVmax mohlo mít u určitých typů NHL prognostický význam. Podpořeno grantem IGA MZ ČR č. NR/9502-3

1783.

Časná FDG-PET a její význam pro prognózu a volbu léčebné strategie u mladších pacientů s DLBCL vyššího rizika (aaIPI 2-3)

Šálek David, Vášová Ingrid, Pytlík Robert, Janíková Andrea, Michalka Jozef, Šmardová Lenka, Král Zdeněk, Mayer Jiří

(Interní hematoonkologická klinika, FN, Brno a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno; 1. interní klinika VFN, Praha)

Záměr: Zhodnocení významu časně FDG-PET pro prognózu mladších pacientů s difúzním velkobuněčným B-lymfomem (DLBCL) a vyšším rizikem (aaIPI 2-3) **Úvod:** Intenzivní indukční režimy užívané u mladších rizikových pacientů s DLBCL přinášejí nevyhnutelně i vyšší počet komplikací v důsledku toxicity léčby. Otázkou je, zda všichni tito pacienti potřebují takto agresivní léčbu po celou dobu indukce, obzvláště v případě dosažení časně kompletní remise dle PET. Negativita časně FDG-PET u DLBCL po 2-3 cyklech chemoterapie je dle některých prací považována za pozitivní prognostický znak (Haioun et al, Blood 2005). **Metody:** Léčbu přizpůsobenou výsledku interim PET mělo celkem 25 pacientů s DLBCL (z toho 5x typ mediastinální) s vyšším středním a vysokým rizikem dle IPIaa, diagnostikovaných na IHOK FN Brno v letech 2005-2009, a nezařazených do studie KLS R-MEB. Intenzivní indukce spočívala ve 2-3 cyklech R-megaCHOP, ve 12/25 případech předcházela prefáze (nejčastěji R-CHOP). Poté byla provedena FDG-PET. V případě dosažení časně PET negativity jsme snížili intenzitu chemoterapie na standardní režim R-CHOP 21 a léčba byla dokončena do celkových 6-8 cyklů. V případě PET+ léčba pokračovala salvage platinovým režimem + HD BEAM a ASCT. **Výsledky:** 4 pacienti měli časnou PET pozitivní, 1 léčbu zatím nedokončil, 2 byli primárně transplantováni i přes negativní PET. Přežívání (OS a PFS) bylo hodnoceno u zbylých 18 pacientů s negativní interim PET a následnou redukcí intenzity léčby. Medián věku v celém souboru byl 55 let (30-61), převažovaly ženy

(17:8). Špatný performance status (ECOG 2-4) byl vstupně u 13 pacientů, B-symptomy u 23/25, klinické stádium IV u 23/25. 12 pacientů mělo aaIPI 3, 13 aaIPI 2. Po indukční léčbě 21/25 nemocných (84%) dosáhlo CR, 1 PR, 2 progredovali při léčbě a 1 nebyl zatím hodnocen. S mediánem sledování 17 měsíců činí odhadované 2-leté celkové přežití u PET- pacientů 77% (3/18 zemřeli), 2-leté přežití bez progresu 59% (7x relaps). **Závěr:** Redukce intenzity indukční léčby na základě negativity časně FDG-PET přinesla v našem souboru poměrně nízké 2-leté PFS (59%). Srovnání se skupinou transplantovaných nemocných ze studie KLS R-MEB (2-leté PFS 84%, p=0,063) naznačuje, že zachování intenzity indukční terapie může mít význam pro zlepšení prognózy mladších high-risk pacientů s DLBCL. Naše závěry jsou však limitovány menším počtem pacientů i kratší dobou sledování, a budou muset být potvrzeny randomizovanou studií (aktuálně otevíraná studie KLS RIMCEB).

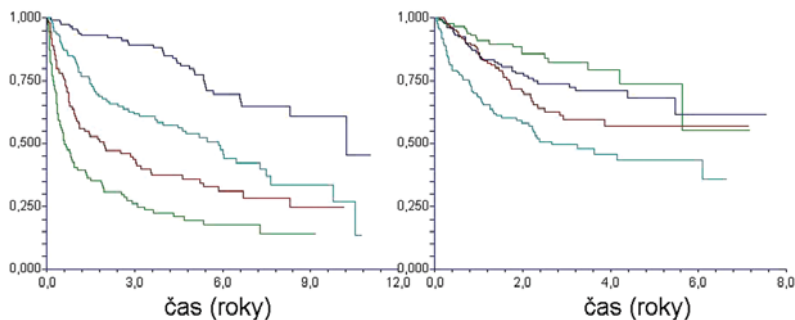
1689.

Klinický obraz a léčba starších nemocných s difúzním velkobuněčným B-lymfomem: analýza dat 1425 pacientů Českého lymfomového projektu (CLP)

Procházka Vít, Trněný Marek, Pytlík Robert, Vášová Ingrid, Šálek David, Belada David, Sýkorová Alice, Papajík Tomáš, Jankovská Milada, Kozák Tomáš, Kubáčková Kateřina, Petrová Markéta, Campr Vít, Boudová Ludmila, Matuška Milan, Trnková Marie, Kooperativní lymfomová skupina *(Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; 1. interní klinika, VFN, Praha; Interní hemato-onkologická klinika, FN, Brno; Hematologická klinika, FN, Hradec Králové, Oddělení klinické hematologie, FNKV, Praha; Radioterapeuticko-onkologické oddělení, FN Motol, Praha; Ústav patologie a molekulární medicíny, FN Motol, Praha; Ústav patologie, FN, Plzeň; Ústav klinické hematologie FNO, Ostrava)*

Difúzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL) představuje nejčastější subtyp ne Hodgkinova lymfomu v České repub-

Vliv rituximabu na OS



3-leté OS dle IPI bez rituximabu: (L) 89 % (LI) 62 % (IH) 42 % (H) 26 %
 3-leté OS dle IPI s rituximabem: (L) 82 % (LI) 72 % (IH) 60 % (H) 48 %

lice. Medián věku nemocných při diagnóze je 63 let. Cíl: Analyzovat prognostické faktory, léčebné modalities a výsledky léčby v neselektované populaci starších nemocných s DLBCL. Soubor: Hodnotili jsme data 1425 nemocných starších 59 let bez známek postižení CNS u nichž byla diagnóza uzavřena před 31.12.2008. Medián věku při diagnóze dosáhl 70 let (60-94); zastoupení stadií dle Ann Arbor: I (21,4 %), II (26,5 %), III (16,7 %), IV (35,4 %). Extranodální postižení bylo přítomno u 66,3 % nemocných. Zastoupení IPI a věkově uzpůsobeného IPI (aaIPI) skóre: nízké (L) 23/22 %, nízké střední (LI) 26/30 %, střední-vysoké (IH) 25/27 %, vysoké (H) 26/21 %. Léčba první linie byla zahájena u 86,7 % nemocných, nejčastěji antracyklinovým režimem (CHOP, 78 %) s mediánem počtu dávek 6. Intenzivní chemoterapie byla aplikována u 2,3 % pacientů. Rituximab byl součástí léčby u 58 % nemocných (medián počtu dávek 6), radioterapie u 25 % nemocných. Léčebná odpověď byla zhodnocena u 1076 (87,1 %) léčených pacientů. PET scan byl použit ve 139 případech. Výsledky: Kompletní remise (CR) byla dosažena u 66,3 %, nepotvrzená CR u 9,9 %, parciální remise ve 12,5 % a stabilní choroba u 2,5 % nemocných, 8,8 % nemocných na terapii progredovalo. PET- CR byla dosažena ve 114 (82 %) případech. Během sledování (medián 2,7 roku), žije v 1. remisi 574 nemocných (40,3 %), u 313 (22 %) došlo k relapsu/progresi lymfomu a 517 (36,3 %) pacientů zemřelo. Procento celkového přežití (OS) ve 3 letech dosáhlo 59,6 % (95% CI 0,57-0,63); procento nemocných bez události (EFS) ve 3 letech dosáhlo 50 % (95% CI 0,47-0,53). Rituximab zlepšil 3-leté OS (55 % v 65 %, $p < 0,0001$) i 3-leté EFS (44 % v 59 %, $p < 0,0001$). Zlepšení OS bylo patrné ve všech skupinách vyjma nízké rizikových pacientů. Dosažení PET negativní remise predikovalo delší OS i EFS ($p = 0,001$, $p = 0,0005$). Multivariační analýza identifikovala nedosažení CR, věk ≥ 70 let, PS ≥ 2 (ECOG), LDH $> N$ a aplikaci rituximabu jako nezávislé prediktory OS. Nedosažení CR, věk ≥ 70 let, IH/H aaIPI skóre, LDH $> N$ a aplikace rituximabu nezávisle předpovídaly EFS. Závěr: Současné léčebné modalities vedou k dlouhodobé remisi u 2/3 starších pacientů s DLBCL. Přežití vysoce rizikových nemocných je však stále neuspokojivé. Rituximab významně snižuje riziko progresu i úmrtí, zvláště u IH/H-IPI. PET negativita je předpokladem pro dlouhodobou remisi. MSM 0021620808; IGA NR/9502-3.

1664.

Klinický význam kvantitativního stanovení t(14;18) u folikulárního lymfomu

Janíková Andrea, Dvořáková Dana

(Interní hematologická klinika FN, Brno; Centrum molekulární biologie a genové terapie FN, Brno)

Úvod: Folikulární lymfom (FL) se vyznačuje individuálně variabilním průběhem a prognózou. Morfologické i klinické indexy mají pouze limitovaný význam. T(14;18) je vysoce asociována s FL a polymerázová řetězová reakce (PCR) umožňuje její detekci. Vztah t(14;18) k folikulárnímu lymfomu je dosud předmětem

diskuzí. Cíl: Zjistit, zda existuje vztah mezi množstvím t(14;18)+ buněk detekovaných v krvi nebo kostní dřeni a průběhem FL. Metody: 202 pacientů s FL léčených od 03/2001 až 01/2010 na IHOK FN Brno bylo testováno na t(14;18). Testovány byly vzorky krve a kostní dřene před léčbou, v jejím průběhu a po léčbě. Vzorky byly testovány nested PCR (pro MBR a mcr oblasti) a v případě MBR+ byla provedena kvantifikace real time PCR (RQ PCR). Naprostá většina pacientů měla stadium III nebo IV a byla léčena systémovou terapií (rituximab + chemoterapie). Výsledky: V době stanovení diagnózy/relapsu (151/51) byla t(14;18) identifikována u 113/202 (66%) pacientů, pouze 95/202 (47%) bylo MBR+. Dlouhodobě bylo sledováno 75 MBR+ pacientů (medián 37; 7-102 měsíců). Po léčbě dosáhlo 55/75 pacientů klinické i molekulární remise (PCR-) v krvi a kostní dřeni, tito pacienti vykazovali méně relapsů (24% vs 55%), delší dobu do progresu (medián 21 vs 12 měsíců; $p = 0,012$) a méně úmrtí na progresi lymfomu (5% vs 40%). PCR- vs PCR+ pacienti po léčbě se však také vyznačovali významně nižší kvantitou t(14;18) před zahájením léčby v krvi (medián 709 (0-650616) vs 6870 (114-1200000) kopií/10 na 6 CE) i v kostní dřeni (medián 2276 (1-451066) vs 81414 (58-1050000) kopií) ($p = 0,009$ a $p = 0,005$). Význam „molekulární nálože“ v krvi i kostní dřeni před léčbou jsme potvrdili srovnáním pacientů s dobrou vs nepříznivou prognózou (EFS ≥ 36 vs ≤ 12 měsíců). Pacienti s dobrou prognózou ($n = 20$) měli oproti nemocným se špatnou prognózou ($n = 16$) významně nižší vstupní počty kopií t(14;18) v krvi a kostní dřeni ($p = 0,002$; $p = 0,009$). Mezi srovnávanými skupinami nebyly rozdíly v demografických parametrech, délce sledování, zastoupení gradů, podílu relabovaných pacientů nebo FLIPI. Závěry: Kvantita t(14;18) buněk v krvi nebo kostní dřeni představuje nezávislý prognostický faktor u FL. Tento „molekulární staging“ může identifikovat pacienty s nepříznivým vývojem choroby již v době stanovení diagnózy nebo relapsu.

AKUTNÍ LEUKEMIE I.

1840.

Přechodná leukoencefalopatie u dvou dětí s akutní lymfoblastickou leukémií

Mihál Vladimír, Pospíšilová Dagmar, Novák Zbyněk, Neklanová Marta, Houda Jiří, Čecháková Eva, Michálková Kamila

(Dětská klinika LF UP a FN, Olomouc; Radiologická klinika LF UP a FN, Olomouc)

Leukoencefalopatie (LE) je dobře popsáným nežádoucím účinkem některých cytostatik, zejména metotrexátu, pokud je aplikován v kombinaci s intratekálním podáním a radioterapií CNS. Symptomatická LE nebývá pozorována často (pouze u 1% pacientů) a je doprovázena variabilním neurologickým nálezem (křeče, hemiparézy, afázie a někdy i ataxie a přechodné poruchy vidění) často s náhle vzniklou poruchou chování, příznaky zmatenos-

ti, emoční labilitou, strachem, nevyprovokovaným pláčem, bolestí hlavy, nevolnosti a desorientace. Ani u jednoho našeho pacienta se leukoencefalopatie nevyskytla do 2-9 dnů po aplikaci MTX. U patnáctileté dívky s c-ALL se encefalopatie projevila za 11 dní po intratekální aplikaci MTX a u dvanáctiletého chlapce s AHL až 6 týdnů po nitrožilním podání HD MTX (5g/m²) a při léčbě s dexametasonem, doxorubicinem a dalšími cytostatiky dle protokolu ALL BFM Interim 2000. U obou pacientů bylo vstupní MRI vyšetření mozku s normálním nálezem. Autoři referují klinické a radiologické nálezy poměrně vzácně přechodné leukoencefalopatie.

1835.

Zhodnotenie molekulárnej heterogenity u akútnej myeloidnej leukémie s normálnym karyotypom so zameraním na prognostický význam mutačného statusu NPM1, FLT3-ITD a DNA polymorfizmu rs16754 (A/G) v géne WT1. Skúsenosti jedného centra.
Katrincská Beáta, Sotkowski Tomáš, Divoká Martina, Sičová Kateřina, Holzerová Milena, Hubáček Jaromír, Mužík Jan, Dušek Ladislav, Indrák Karel, Jarošová Marie
(*Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc; Institut biostatistiky a analýz MU, Brno*)

Na základe novej WHO klasifikácie definujú NPM1 mutované akútne myeloidné leukémie (AML) dočasnú entitu. V tejto skupine AML nález FLT3-ITD nielen zhoršuje inak priaznivú prognózu určenú mutovaným NPM1, ale bez ohľadu na mutačný status NPM1, prognostický význam FLT3-ITD by mal byť závislý na pomernom zastúpení FLT3-ITD/wild-type alel. Prognózu AML, osobitne AML s normálnym karyotypom (NK), navyše ovplyvňujú popri NPM1 a FLT3, najčastejšie mutovaným a prognosticky najvýznamnejším génom, i ďalšie génové zmeny. Z nich sledujeme v dobe diagnózy u AML, spolu s mutáciami NPM1, FLT3-ITD, FLT3-D835, MLL-PTD a expresii BAALC i mutácie v géne WT1 (exóny 7 a 9), vrátane výskytu jednonukleotidového polymorfizmu (SNP) rs16754 (A/G) v tomto géne. Kým nález WT1 mutácií by mohol byť spojený s nepriaznivou prognózou v rámci AML s NK, detekcia apoň jednej minoritnej alely v danom SNP génu WT1 by mohla naopak určiť pacientov s priaznivejšou prognózou. V našom príspevku sa zameriame na súbor 73 kuratívne liečených pacientov s de novo AML s NK diagnostikovaných na HOK FNOL v rokoch 1997-2009 s dostupným genetickým materiálom z doby diagnózy. V ňom zhodnotíme dopad heterogenity FLT3-ITD v skupine NPM1 mutovaných AML a výskyt a význam WT1 mutácií a SNP rs16754 v kontexte ďalších molekulárnych markerov. V súbore 73 pacientov je 38 žien a 35 mužov; priemerný vek pri diagnóze 55 rokov (rozsah 22 až 72), medián doby sledovania 62 týždňov (2 až 608). Zistili sme nasledovnú distribúciu génových zmien: mutNPM1 55% (40/73), FLT3-ITD 37% (27/73), FLT3-D835 19% (13/70), MLL-PTD 1% (1/71), vysoká expresia BAALC 31% (18/59) s nálezom aspoň jednej molekulárnej zmeny u 86%

(61/71) pacientov s kompletnými dátami o všetkých markeroch. Frekvencia WT1 rs16754 SNP genotypov je nasledovná: 3% (2/73) GG, 29% (21/73) GA, 68% (50/73) AA. V našom príspevku komentujeme génové zmeny v kontexte ďalších laboratórnych nálezov a liečebných výsledkov, vrátane alogénnej transplantácie krvotvorných buniek (26/73), ktorá predstavuje v prípade dostupného HLA identického darcu zlatý štandard liečby pre AML s nepriaznivou prognózou. Predovšetkým u AML s NK je však zrejme, že pri voľbe liečebného postupu by sa malo zvažovať i molekulárne pozadie ochorenia, najmä v skupine NPM1 mutovaných AML. Sledovanie prognosticky významných molekulárnych markerov je v prípade AML s NK esenciálna, nakoľko prognóza ochorenia dosahuje medzi týmito pacientami značnú variabilitu. Grantová podpora: MSM 6198959205 a IGA MZ ČR NR/9481-3

1818.

Výsledky léčby sekundárných AML v 5 centrech intenzivní hematologické péče v ČR v letech 1999 až 2009. Data registru ALERT ČR.

Indrák Karel, Voglová Jaroslava, Koza Vladimír, Maaloufová Jacqueline, Kozák Tomáš, Mužík Jan, Jarošová Marie, Sotkowski Tomáš, Michalová Kyra, Žák Pavel, Steinerová Kateřina, Vydra Jan, Sičová Kateřina, Dušek Ladislav
(*Hemato-onkologická klinika LF UP, Olomouc; II. Interní klinika LF UK, Hradec Králové; Hemato-onkologické oddělení FN, Plzeň; ÚHK, Praha; Oddělení klinické hematologie FN Královské Vinohrady, Praha; Institut Biostatistiky a analýz MU, Brno*)

Mezi sekundární AML zde řadíme AML vzniklé na podkladě předchozího myelodysplastického syndromu (MDS) a AML vznikající jako pozdní komplikace cytotoxické nebo radiační léčby. V analyzovaném souboru 1516 nemocných s AML z 5 center ČR představovaly tyto sekundární AML 22% (N=328). Medián věku sekundárních AML byl o 6 let vyšší (62 roků) než medián věku u de-novo AML. Cytogeneticky byla u 3,4% nemocných z celé sestavy potvrzena dg. promyelocytární leukemie (PML), jen 2% nemocných mělo podle cytogenetiky dobrou prognózu, 39% mělo střední prognózu, 24% špatnou prognózu a u 32% nemocných nebylo cytogenetické vyšetření provedeno. Kurativní léčba byla indikována u 176 (54%) nemocných. Kompletní remise však byla dosažena jen u 49% a z nich 60% brzy relabovalo. 21 (28%) ze 74 nemocných podstoupilo v rámci konsolidace alogenní transplantaci krvetvorných buněk. Tito nemocní měli medián celkového přežití (OS) 19,2 (interval 11-28) měsíců a ve srovnání s nemocnými léčenými jen chemoterapií s mediánem 13 měsíců (interval 6-19 měsíců) prokazovali tendenci k delšímu celkovému přežití. Rozdíly však nebyly statisticky významné – zřejmě vlivem chyby malých čísel. Medián OS všech kurativně léčených nemocných se sekundární AML byl jen 8,2 měsíce (7-11). I u nemocných se sekundární AML byl prokázán signifikantní prognostický význam cytogenetiky. Dé-

le než nemocní se střední nebo špatnou cytogenetickou prognózou přežívali nemocní se sekundární PML a nemocní s dobrou cytogenetickou prognózou s mediánem 28 měsíců (interval 12-44 měsíců). Prognosticky významně významný byl i věk v době diagnózy. Kurativně léčení nemocní <60 let měli medián OS 9 měsíců (6-12) a kurativně léčení nemocní ≥60 let měli medián OS 6,6 měsíců (4-9). Dosazené výsledky potvrzují prognostický význam klasifikace AML s rozdělením na de novo a sekundární AML i skutečnost, že u nemocných se sekundární AML, snad s výjimkou APL, zatím nemáme dostatečně efektivní léčbu a měli bychom se proto snažit nemocné, které jsme schopni kurativně léčit, zařadit do klinických studií. Práce byla zpracována s grantovou podporou IGA MZ ČR NR/9481-3.

1817.

Výsledky léčby a vybrané prognostické faktory u de-novo AML v 5 centrech intenzivní hematologické péče v ČR v letech 1999 až 2009. Data registru ALERT ČR.

Indrák Karel, Voglová Jaroslava, Koza Vladimír, Maaloufová Jacqueline, Kozák Tomáš, Mužík Jan, Jarošová Marie, Sztokowski Tomáš, Michalová Kyra, Žák Pavel, Steinerová Kateřina, Vydra Jan, Sičová Kateřina, Dušek Ladislav (*Hemato-onkologická klinika LF UP, Olomouc; II. Interní klinika LF UK, Hradec Králové; Hemato-onkologické oddělení FN, Plzeň; ÚHKT, Praha; Oddělení klinické hematologie FN Královské Vinohrady, Praha; Institut Biostatistiky a analýz MU, Brno*)

Analyzovaný soubor tvoří 1188 nemocných s de-novo AML s mediánem věku 58 let (19-92), poměr mužů a žen i jejich věkové zastoupení byly vyrovnané. V době hodnocení souboru žilo 36% nemocných. Nemocní byli pro analýzu vlivu věku rozděleni do 3 skupin: ≤45 let; 46-59 a ≥60 let. Z celkového hodnocení indukční a konsolidační léčby jsme vyloučili nemocné s APL. V nejmladší věkové skupině žilo v době analýzy 54% nemocných (Me 43 měs.), ve střední věkové skupině 43% (Me 38 měs.) a v nejstarší věkové skupině 23% (Me 12,6 měs.). V nejmladší věkové skupině byl vysoký podíl nemocných s akutní promyelocytární leukémií (APL) - 18%, ve střední skupině činil 11% a v nejstarší skupině jen 4%. Podobná byla i distribuce nemocných s dobrou cytogenetickou prognózou bez APL s nejčastějším zastoupením v nejmladší skupině - 14%. Zastoupení nemocných se špatnou cytogenetickou prognózou bylo ve všech třech věkových skupinách překvapivě srovnatelné 13-15%. Indukční léčba byla podána 97% nemocných ve věku do 60 let, ale jen 53% nemocných ≥60 let. KR dosáhlo 88% nemocných z nejmladší věkové skupiny, 74% ve střední a 58% v nejstarší věkové skupině. Konsolidační léčba byla podána 95% nemocných v KR v mladších věkových skupinách a 88% nemocných v KR ≥60 let. ASCT podstoupilo 54% (299) z celé sestavy 554 nemocných, kteří dosta-

li konsolidační léčbu. V nejmladší věkové skupině s nepříznivou cytogenetikou podstoupilo ASCT v rámci konsolidace 68% nemocných, v prostřední věkové skupině 37% a jen 17% nemocných podstoupilo ASCT v prognosticky nepříznivé nejstarší věkové skupině. Autologně bylo transplantováno 41 nemocných. Alogenně bylo transplantováno 258 nemocných, 73% v 1. KR, 14% nemocných ve druhé a další KR. 23% příbuzenských resp. 18% nepříbuzenských transplantací bylo provedeno mimo remisi choroby. Věk byl nejvýznamnějším prognostickým faktorem pro OS i PFS AML. Me OS resp. PFS v nejmladší věkové skupině byl 26 resp. 15 měs.; ve střední věkové skupině 15 resp. 12 měs. a ve skupině ≥60 let 10 resp. 8 měs. 10 let přežívá 85% nemocných s APL ve věku do 60 let. Nemocní s dobrou prognózou mimo APL v nejmladší a střední věkové skupině po 10 letech dosud nedosáhli Me přežití. V nejstarší skupině je Me přežití 22 měs. Ve skupině se střední cytogenetickou prognózou byl Me OS v jednotlivých věkových skupinách 31; 16 resp. 13 měs. a u nemocných se špatnou prognózou 14; 9 a 5 měs. Práce byla zpracována s grantovou podporou IGA MZ ČR NR/9481-3.

1792.

HOX génová expresia odlišuje pacientov s ALL na základe fenotypu, genotypu a prognózy

Starková Júlia, Zamostná Blanka, Mejstříková Ester, Drabkin Harry, Trka Jan (*CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie, 2.Lékařská fakulta, Karlova univerzita, Praha; Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita, Praze; Medical University of South Carolina, Dept. of Hmatology/Oncology, Charleston, USA*)

Homeodoménové (HOX) gény hrají důležitou úlohu v normálnej hematopoéze a tiež v procese leukemogenezy. Presný vzťah medzi expresiou HOX génov a účinkom počas transformačného zvratu nie je jasný. My sme preto detekovali expresný vzorec HOX génov v normálnych lymfoidných bunkách a porovnali ho s bunkami detských pacientov s akútnou lymfoblastickou leukémiou (ALL). Pomocou kvantitatívnej PCR v reálnom čase sme vyšetrili HOXA, HOXB a CDX1/2 gény u 61 patientských diagnostických vzoriek a FAC-sortovaných subpopulácií normálnych lymfoidných progenitorov. Zistili sme, že určité HOX gény (HOXA7-10, A13, B2-4) boli exprimované u pacientov a pritom v normálnej kostnej dreni boli detekované len vo veľmi skorých vývojových štádiách, a naviac HOXA6 a CDX2 neboli detekované v žiadnej subpopulácii B-vývojovej rady. Expresia HOX génov sa líšila u skupín pacientov definovaných na základe odlišného imunofenotypu a genotypu. Signifikantne odlišné boli gény: HOXA3, A4, A7, B3 a B4. T-ALL a MLL/AF4 pozitívni pacienti mali vysokú expresiu HOXA/B génov oproti pacientom BCP-ALL bez fúzných génov a BCR/ABL pozitívnych pacientov, ktorých hladina HOX génov bola ve-

řmi nížka.. Dalším zaujímavým zistením boli HOX gény, ktoré boli špecificky exprimované u určitých geneticky charakterizovaných podskupín pacientov: HOXA7 gén downregulovaný u hyperdiploidných pacientov, HOXB7 gén downregulovaný u TEL/AML1 pacientov a nízka expresia CDX2 u BCR/ABL pozitívnych pacientov. V súvislosti s prognózou existujú práce, ktoré asociujú zlú prognózu u AML pacientov s vysokou expresiou HOX génov. Paradoxne, z našich výsledkov vyplýva, že u detských ALL pacientov je zlá prognóza spojená s nízkou expresiou HOXA skupiny génov. Ďalej sme tiež ukázali, že u MLL/AF4 pozitívnych pacientov hladina HOXA génov koreluje s vekom pri diagnóze. Je evidentné, že tento jav koreluje s metyláciou promótorovej oblasti HOXA génov. Z našich výsledkov vyplýva, že deregulácia HOX génov u ALL pacientov nesúvisí s diferenciálnym štádiom, v ktorom sa leukemická bunka zastavila. HOXA expresia koreluje s prognózou a genotypická podskupina sa viaže so špecifickými HOX génmi. Podporené grantom GAČR 301/58, MSM0021620813, GACR 301/08/P532

3rd SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY

1846.

Oncogene and tumor suppressor gene network in myeloproliferative neoplasms

Kralovics Robert

(Center for Molecular Medicine, Austrian Academy of Sciences, Wien, Austria)

Transformation to acute leukemia is a major complication of myeloproliferative neoplasms (MPNs), however the genetic changes leading to transformation remain largely unknown. We investigated 380 patients with high-resolution SNP microarrays for chromosomal aberrations in chronic as well as leukemic phase of MPN. In addition to the previously described lesions, we identified numerous recurrent defects. We did not observe significant differences in the frequency of chromosomal aberrations between JAK2-V617F positive and negative patients or among the 3 classical MPN entities (PV, ET, PMF). However, there was a significant difference between patients in chronic phase and leukemic phase. Five chromosomal loci showed significant association with post-MPN leukemia. Among these leukemia-associated defects, deletions of both arms of chromosome 7 were the most frequent. We mapped the 7p common deleted region to the IKZF1 gene, which encodes the transcription factor Ikaros. Patients with IKZF1 loss exhibited complex karyotypes, and del7p was a late event in the genetic evolution of the MPN clone. IKZF1 deletions were seen in both undifferentiated and differentiated myeloid cell types, indicating that IKZF1 loss does not cause a differentiation arrest but rather renders progenitors susceptible to transformation, most likely through chromosomal in-

stability. Induced Ikzf1 haploinsufficiency in primary murine progenitors resulted in increased cytokine-dependent growth, suggesting that reduced expression of IKZF1 is sufficient to perturb growth regulation. Thus, IKZF1 loss is an important step in the leukemic transformation of a subpopulation of MPN patients.

1841.

Cooperation of DNA damage response pathways and inflammatory signaling pathways regulates the transition from proliferation to senescence in MLL-ENL-mediated cellular transformation

Takacova Sylvia, Piterkova Lucie, Dolezel Petr, Luzna Pavla, Bartek Jiri, Divoky Vladimir

(Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic; Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic; Department of Cell Cycle and Cancer, Institute of Cancer Biology, Danish Cancer Society, Copenhagen, Denmark)

Mixed Lineage Leukemia (MLL) - rearranged leukemia defines a unique subtype of human acute leukemias according to its gene expression pattern, genetic basis, phenotype and poor prognosis. Understanding the mechanism of cellular transformation by MLL oncogenes may shed light on the nature and complexity of the disease and may suggest new therapeutic strategies. We studied the early phase of MLL-ENL-initiated leukemia using a switchable MLL-ENL-ERT^m mouse model that developed myeloproliferation both in the bone marrow and spleen with different hematopoietic characteristics. We identified the activation of the DNA damage response (DDR) pathway in aberrantly proliferating differentiated myeloid bone marrow and spleen cells. The threshold of DDR gradually increased and negatively correlated with proliferation over time in the bone marrow leading to induction of senescence. In contrast, DDR was not maintained throughout disease progression in the spleen causing a slow-down, but allowing continuous proliferation advantage. We profiled the gene expression across disease states in both tissues to identify the transcription program that underlies the transition from proliferation to senescence. Based on an in vivo correlation study between DDR levels, proliferation rates, tissue- and state-specific gene expression patterns, we identified a distinct subset of inflammatory genes that were unique in the transition phase in the bone marrow, but were not differentially expressed in the spleen suggesting that these genes/pathways might cooperate with DDR to counteract the MLL-ENL-driven proliferation program. We also propose here a hierarchical model of the DDR/inflammation regulatory relationship in the context of an MLL-ENL-leukemia model. Supported by grants MSM6198959205 and NPV2B06077, from the Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic

1782.

The mechanism underlying biological effect of valproic acid in targeted therapy of AML1/ETO-positive cells

Zápotocký Michal, Starková Júlia

(CLIP, Department of Paediatric Haematology and Oncology, Charles University, 2nd Medical School, Prague, Czech Republic)

In t(8;21) acute myeloid leukaemia (AML), the leukaemogenesis is supposed to be promoted by the interference with expression of AML1 target genes. Repressor complex associated with AML1/ETO fusion protein recruits class I histone deacetylases (HDAC). Valproic acid (VPA) was found to have an extensive effect on AML blasts, via inhibition of class I HDAC. We aimed to characterise the differentiation effect of VPA on AML1/ETO-positive leukaemic cells and to determine the expression pattern of AML1 target genes. We treated Kasumi-1 (M2 AML1/ETO-positive), Kasumi-6 (M2 AML1/ETO-negative) and MV4-11 (MLL/AF4-positive) cells with VPA and 12-O-tetra-decanoylphorbol-13-acetate (TPA). Two AML1/ETO-positive and two negative patients' bone marrow diagnostic samples were treated *ex vivo* with VPA and TPA to confirm *in vitro* findings. VPA induced apoptosis in AML1/ETO-positive and MLL/AF4-positive cells in dose dependent manner. However, immunophenotype changes confirming the differentiation process preceding apoptosis (decreased CD33/34/117 and increased CD11a/11b expression) were observed solely in AML1/ETO-positive cell line. As the AML1/ETO-positive differentiated cells exhibited positivity of AnnexinV we had to evaluate the exact sequence of differentiation and apoptosis. Interestingly, after blocking the apoptosis with caspase inhibitor ZVAD the differentiation was still detected in the same extent. Conversely, no immunophenotype changes were detected in either of control cells. TPA was used to overcome the incapability of cells to differentiate, it induced monocytic differentiation in both AML1/ETO-positive and negative cells. As quantified by qRT-PCR, VPA treatment increased expression of PU.1, IGFBP7, BPI and C/EBPA genes in AML1/ETO-positive cells. No significant changes were detected in AML1/ETO-negative cells. Specific effect was confirmed in patients' bone marrow samples *ex vivo*. All samples exhibited changes of immunophenotype after TPA treatment while VPA treatment induced similar changes only in AML1/ETO-positive samples. Taken together, we provide a conclusive evidence of differentiation specific for AML1/ETO-positive cells accompanied with the increase of the repressed genes expression. Our findings of differentiation immediately followed by apoptosis bring the new insight into the biological effect of VPA. Our data suggest that AML1/ETO-positive AML patients might specifically benefit of the HDAC inhibitors treatment. Supported by Zentiva.

1763.

Search for genes affected by DNA hypomethylation treatment in AML patients

Hájková Hana, Petrboková Radka, Nováková Ludmila, Schwarz Jiří, Čermák Jaroslav, Haškovec Cedrik
(Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague)

Decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) is cytidine nucleoside analog that has already been used clinically for treatment of elderly or for standard chemotherapy non-responsive patients with acute myeloid leukemia (AML). Decitabine acts through its incorporation into DNA that causes depletion of DNA methyltransferases and subsequent DNA hypomethylation. Changes in DNA methylation pattern are known to be involved in pathogenesis of AML patients. We searched for genes influenced by DNA hypomethylation exposure by treating ML-2 cell line (derived from AML M4 patient) for 3 days with 1 μ M decitabine. Effect of the treatment was measured by gene expression profiling with Human Signal Transduction Pathway Finder PCR arrays. Gene expression changes of 5 chosen genes were validated by TaqMan gene expression assays. Bisulfite sequencing was performed to analyze changes of DNA methylation status. After hypomethylation treatment of ML2 cell line, 15 genes were significantly upregulated by twofold or greater when compared to the untreated controls. Comparison of gene expression patterns in the treated versus control cells revealed cohorts of upregulated genes that play role in differentiation (EGR1, CEBPB, BMP2), activation of immune system (CCL2, CCL20, IL8, IL4R, ICAM1), apoptosis (BAX, IL1A, LTA, GADD45A) and cell cycle regulation (CDKN1A, CDKN2B). The EGR1 (early growth response 1) gene was of particular interest, because it has been described as a potential tumour suppressor gene in hematological malignancies. We verified changes in EGR1 expression by TaqMan RQ-RT PCR also in AML patients at diagnosis. A substantial proportion of AML patients had decreased level of EGR1 expression compared to healthy donors. To clarify the correlation between EGR1 expression and methylation, bisulfite sequencing was performed. Despite of high density of CpG dinucleotides in 5' upstream regulatory region of EGR1 gene, no correlation between changes in EGR1 expression and aberrant DNA methylation was observed. This study confirmed that mechanism behind the antitumour effects of hypomethylation treatment is more complex and does include more than reactivation of epigenetically silenced genes. Recently, we have focused on the role of potential miRNA regulation of EGR1 gene. Additionally, further methylation studies are ongoing on other upregulated genes after decitabine exposure. Supported by NS10632-3/2009 and OC10042.

1735.

5-Azacidine and Valproic acid modify chromatin structure near key hematopoietic genes in myelodysplastic syndrome (MDS)

Stopka Tomáš, Burda Pavel, Vargová Karina, Čuřík Nikola, Jonášová Anna, Šišková Magda, Trněný Marek
(*Pathological Physiology and Center of Experimental Hematology, First Faculty of Medicine, Center of Experimental Hematology, Charles University, Prague; First Medical Department – Hematology, General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic*)

The myelodysplastic syndrome (MDS) represents a heterogeneous disorder characterized by ineffective hematopoiesis and evolution to acute myelogenous leukemia that is strikingly refractory to current therapeutic approaches. Novel epigenetic drugs including DNA-methyltransferase inhibitor 5-Azacidine (5-AZA) and histone deacetylase inhibitor Valproic acid (VPA) are currently considered to improve clinical response in patients with high-risk forms of MDS. MDS is characterized by abnormal differentiation and blocked maturation responsive to 5-AZA and VPA, therefore we are herein proposing, that genes encoding hematopoietic transcription factors such as PU.1, GATA-1, C/EBP α or C/EBP β are candidate target genes of the epigenetic therapy. Expression of these genes is dysregulated in MDS (Huh 2007, Maratheftis 2007). We herein present our pilot study to determine effects of 5-AZA or VPA treatment on chromatin structure of MDS blasts derived from peripheral blood of a single patient diagnosed with MDS RAEBII in transformation to acute leukemia. This patient displays significant clinical response (a decrease of blasts and reciprocal increase of Hemoglobin levels) to 5-AZA. Our initial data found that in vitro 5-AZA or VPA treatment induces significant changes in chromatin structure upstream of PU.1 gene in favor of opened chromatin structure. The analysis of other transcription factor genes is in progress and will be presented in the meeting. The evaluation of chromatin structure in patients with MDS may add to better understanding of effectiveness of epigenetic therapy in MDS.

1730.

Antibody array revealing new prognostic and drug-response pathways in childhood leukemia

Kanderová Veronika, Kalina Tomáš, Stuchlý Jan, Černá Daniela, Fišer Karel, Hrušák Ondřej, Slåstad Heidi, Wu Weiwei, De Souza Goulart Luiz Fernando, de la Rosa Carrillo Daniel, Holm Anders, Lund-Johansen Fridtjof
(*Charles University, 2nd Medical Faculty, CLIP - Cytometry, Prague, Czech Republic; Rikshospitalet Medical Center and the University of Oslo, Norway*)

This study takes a novel approach to detect changes in cellular proteins that associate with therapeutic outcome of

acute childhood leukemia. Large-scale analysis of cellular proteins can potentially bring more relevant information than expression profiling of transcriptome. Proteins from the cell membrane, cytoplasm and nucleus are labelled with biotin and subjected to size exclusion chromatography. As many as 72 fractions are analyzed with bead suspension arrays that contain 1700 antibodies to cellular proteins. The particles are measured by six-color flow cytometry, and the data cumulated to provide complex antibody reactivity patterns. The results provide information about protein levels, subcellular localization and protein-protein interactions [1]. To test the performance of the array, we investigate well-defined leukemia cell lines and primary samples and we divide the whole proteoms to the membrane and the cytoplasmic fractions. We proved the principle that the antibody array gives dose dependent and reproducible results and that a good sensitivity and specificity is achieved. Monitoring a large scale protein profile opens new possibilities for dissection of drug response pathways and leukemia cell biology. References: [1] Wu et al., Mol Cell Proteomics, 2008. Supported by Norway Grants and EEA Grants #A/CZ0046/2/0008, Czech Republic grants #NS/10473-3 and #VZ MSMT 0021620813.

TRANSFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ

1748.

Vliv preanalytické fáze na vyšetření pH u trombocytárních koncentrátů

Řehořová Lenka

(*Transfuzní oddělení Krajská nemocnice, Liberec, a.s.*)

VLIV PREANALYTICKÉ FÁZE NA VYŠETŘENÍ PH U TROMBOCYTÁRNÍCH KONCENTRÁTŮ Řehořová L. Transfuzní oddělení, Krajská nemocnice Liberec, a.s. Úvod: pH na konci skladování je jedním z markerů zachování funkce krevní destičky v trombocytárním koncentrátu (TK). Vyhláška 143/2008 C. Cílem studie Sb. O lidské o krvi stanoví rozmezí pH 6,4 – 7,4 při 22 bylo definovat kritická místa vyšetření pH vzhledem k opakovaně nevyhovujícím výsledkům pH (zvýšení nad 7,4). Metoda: Trombocyty směsné deleukotizované v náhradním roztoku Composol byly připraveny ze 4 buffy coatů. pH bylo měřeno u 15 transfuzních dávek (TD) na začátku a na konci expirace (den 0 a 5) dvěma metodami: C a b) na pH metru při pokojové a) na acidobazickém analyzátoru při 22 C. Měření pH probíhalo na Oddělení klinické biochemie. Kteplotě 24 vyšetření pH byly použity vzorky TK odebrané do transfer vaků, objem vzorku na začátku expirace byl 15 ml, na konci expirace 20 a 50 ml. Příprava vzorku k laboratornímu stanovení pH byla provedena a) přesátím injekční stříkačkou a b) přelitím TK do sekundární zkumavky OKB. Pro statistické hodnocení jsme použili statistické nástroje programu Excel ze souboru Microsoft Office. Statistická významnost byla posouzena na hladině $p < 0,05$. Výsledky a diskuse: Mezi metodami měření a) a b) nebyl zjištěn statisticky vy-

znamný rozdíl ($p=0,16$). Na začátku skladování TK bylo pH vyšší než 7,4 u 3 TD, na konci uchovávání tuto mez překročil jeden přípravek (metoda měření a) i b)). Ke snížení pod 6,4 nedošlo ani u jedné TD. Pokles pH na začátku a konci expirace byl srovnatelný u obou metod měření ($p=0,27$). Vyloučili jsme vliv metody měření na zvýšení pH. Mezi metodami a) a b) při přípravě vzorku k analýze jsme neprokázali statisticky významný rozdíl ($p=0,38$), nicméně zvýšení pH o 0,1 – 0,2 způsobené přítomností vzduchu (metoda přípravy a)) je pro horní limit pH v TK významné. Na výsledné pH měl vliv objem alikvotního vzorku uchovávaného pro měření pH na konci skladování, zjistili jsme statisticky významný rozdíl mezi pH měřeným ze vzorku o objemu 20 a 50 ml ($p=0,001$). Závěr: Definovali jsme kritická místa stanovení pH v trombocytárních koncentrátech. Neprokázali jsme rozdíl mezi dvěma různými metodami měření. Jako klíčové hodnotíme provedení preanalytické fáze: přípravu vzorku (minimální objem alikvoty pro měření pH na konci expirace TK 50 ml), zpracování (šetrné přelití TK) a transport vzorku k analýze (plná zkumavka bez promíchání se vzduchem).

1741.

Beta-thalasemie jako příčina mikrocytózy u dárců krve - kasuistika

Zemanová Markéta, Sulovská Ivana
(*Transfúzní oddělení FN, Olomouc*)

Úvod: výskyt β -thalasemie ve střední Evropě je relativně vzácný, přesto bývá nejčastější příčinou vrozené mikrocytózy. Onemocnění je způsobeno mutací β -globinového genu, která vede ke snížení produkce nebo k úplné ztrátě β -globinového řetězce. V našich podmínkách jde většinou o heterozygoty, tj. pouze nosiče β -thalasemické alely. Takoví jedinci bývají klinicky asymptomatictí, s mírnou anémií, ale s výraznou mikrocytózou, hypochromázií a často i nápadnou erytrocytózou. Léčba není ve většině případů nutná. Popis případu: Na transfúzním oddělení FN Olomouc jsme v roce 2009 zjistili nápadnou mikrocytózou, erytrocytózou a lehké snížení hemoglobinu u dvou nových dárců krve (Hb 127, resp. 130 g/l, Ery 6.45, resp. 5.93 x10¹²/l, MCV Ery 63.9, resp. 70.2 fl). Jednalo se o bratry, oba byli zcela asymptomatictí a v minulosti opakovaně darovali krev na jiném transfúzním oddělení, přičemž jednomu z nich byla pro mikrocytózu doporučena feroterapie. Při dalším vyšetření na ambulanci Hematoonkologické kliniky byly v nátěrech periferní krve nalezeny terčovité erytrocyty, poikilocyty, ovalocyty, basofilní tečkování erytrocytů. U obou bratrů byl vyloučen deficit železa a následně sekvenční analýzou PCR detekována heterozygotní mutace IVS-II-1 (G-A) vedoucí k β -thalasemii minor. Závěr: I přes relativně vzácný výskyt thalasemie je třeba na ni vždy pomýšlet v diferenciální diagnostice mikrocytárních anémií, resp. při nápadné mikrocytóze, která může být často jedinou známkou onemocnění. Při hodnocení způsobilosti dárce krve k odběru je tedy vhodné posuzovat hodnoty krevního obrazu

vždy komplexně. Průkaz nosičství β -thalasemie u našich dvou dárců vedl k trvalému vyloučení z dárcovství krve.

1811.

Prevalence HLA protilátek u polytransfundovaných hematologických pacientů

Bolcková Hana Tereza, Matějková Eva, Žučková Marie, Šimáčková Jitka (*UHKT, Praha*)

Transfúze krevních přípravků jsou nedílnou součástí léčby hematologických pacientů. Jedním z vedlejších účinků transfuzí je možná imunizace příjemce antigeny krevních buněk dárce, což může komplikovat další transfúzní terapii takto imunizovaných pacientů. Cílem této studie bylo zjistit prevalenci HLA protilátek u polytransfundovaných hematologických pacientů. Pro detekci HLA protilátek byl použit lymfocytotoxický test (LCT-NIH) a ELISA kity: QuikScreen [GTI] pro detekci HLA protilátek I. třídy (IgG a IgM) a B-Screen [GTI] pro detekci HLA protilátek II. třídy (IgG). U 84 hematologických polytransfundovaných pacientů jsme provedli screening HLA protilátek I. a II. třídy. Tito pacienti dostali od 7 do 354 transfuzí s mediánem 83. Prevalence HLA protilátek u těchto pacientů byla 15,5% (13/84). 3 pacienti byli pozitivní pouze v LCT testu, 6 bylo pozitivních v LCT i v ELISA testech, 4 pacienti byli pozitivní pouze v ELISA testech. Z 10ti ELISA pozitivních pacientů u 2 byly detekovány IgM protilátky HLA I. třídy, u 4 byly detekovány IgM a IgG protilátky HLA I. třídy, v 1 případě byly detekovány IgG protilátky HLA I. třídy, ve 3 vzorcích byly spolu s protilátkami HLA I. třídy (IgG+IgM) detekovány také protilátky HLA II. třídy (IgG). Prevalence HLA protilátek v námi vyšetřované skupině polytransfundovaných hematologických pacientů byla 15,5%. Pro sledování HLA imunizace těchto pacientů je optimální kombinace obou metod - LCT i ELISA testů. Detekce (resp. identifikace) HLA protilátek u polytransfundovaných pacientů je významnou součástí prevence event. terapie potransfúzních reakcí, zejména refrakternosti na podání trombokoncentrátů. Tato práce vznikla za podpory grantu CEZ 237360001 UHKT

1651.

Hemovigilance

Wasserburgerová Renata, Urbánková Marie, Švubová R, Buriánová D, Charalambidu Jedličková A, Knápková P, Dobešová E, Prejdová Z, Minářová L, Krajsová Ivana, Hnilicová R, Píknová D, Repovský Štefan, Šlězár Jiří, Chmelenská D, Lasota Zenon, Krátká M.

(*Transfúzní služba a.s., Šumperk; Šumperská nemocnice a.s.; Středomoravská nemocniční a.s. HTO Nemocnice, Přerov; Středomoravská nemocniční a.s. HTO Nemocnice, Prostějov; TO NsP, Nový Jičín*)

Transfúzní služba a.s. Šumperk zavádí systém hemovigilance s cílem sjednotit postupy ve všech zdravotnických

zařízeních holdingu AGEL tak, aby se zvýšila kvalita a bezpečnost hemoterapie. Kvalitu a bezpečnost transfúzních přípravků zajišťuje směrnice 2002/98/EC, která je legislativní normou pro státy Evropské unie. Transfúzní služba a.s. Šumperk vyrábí a zpracovává odběry plné krve a krevních složek z odběrových míst v Šumperku, Bruntále, Novém Jičíně, Přerově a Prostějově. Vyrobené transfúzní přípravky pak prostřednictvím konsignačních skladů dodává svým odběratelům, kterými jsou zejména zdravotnická zařízení holdingu AGEL. Požadované údaje pro statistické zpracování byly z jednotlivých odběrových středisek a konsignačních skladů získány formou dotazníku. Hlavními sledovanými parametry jsou: 1. Nejčastější klinické příčiny dočasného a trvalého vyřazení, komplikace při odběrech. 2. Nejčastější příčiny dočasného vyřazení dárců z důvodu odchylek v krevním obraze. 3. Patologické laboratorní nálezy - imunohematologie, záchyt pozitivních protilátek u dárců krve v roce 2009. 4. Patologické laboratorní nálezy - virologie, záchyt infekcí dárců krve v roce 2009. 5. Nežádoucí události související s přípravou a výdejem transfúzních přípravků na krevní bance. 6. Nežádoucí události související s podáváním transfúzních přípravků. 7. Potransfúzní reakce u pacientů. 8. Neaplikované transfúzní přípravky, reklamace, vratky. 9. Příčiny likvidace transfúzních přípravků ve výrobě. V ČR není systém hemovigilance jednotně koordinovaný, proto je naší snahou a prioritou sjednotit postupy ve všech zdravotnických zařízeních holdingu AGEL a stát se tak nezbytnou součástí a rovnocenným partnerem na mezinárodní úrovni v rámci European Hemovigilance Network.

MNOHOČETNÝ MYELOM I.

1787.

RMG – Registr monoklonálních gamapatií

Maisnar Vladimír, Klimeš Daniel, Pelcová Jana, Hájek Roman (*II. interní klinika - oddělení klinické hematologie, FN a LF UK, Hradec Králové; Institut biostatistiky a analýz, MU, Brno; Interní hemato-onkologická klinika, LF MU a FN Bohunice, Brno*)

Registr monoklonálních gamapatií je v současnosti jedním z hlavních projektů České myelomové skupiny. Důvodem pro jeho vytvoření byla snaha o zahájení prospektivního sběru dat nemocných s monoklonálními gamapatiemi z regionu střední a východní Evropy s cílem sledování jejich incidence, využívání a efektu jednotlivých léčebných modalit včetně výskytu nežádoucích příhod a toxicity. Jde o ambiciózní projekt i ve světovém měřítku, který by měl do budoucna vést k dalšímu zlepšení péče o nemocné. Systém je vytvořen na principu sběru minimálního počtu parametrů. V případě potřeby je však možné počet parametrů rozšířit, což je dnes využíváno zejména při sběru dat týkajících se sledování účinnosti tzv. „nových léků“ mnohočetného myelomu. Sdělení podává informaci o aktuálním stavu registru v roce 2010, tj. po 3 letech jeho existence. Ak-

tuální stav databáze a počty nemocných zadaných jednotlivými spolupracujícími centry jsou dostupné na webových stránkách CMG – České myelomové skupiny (www.myeloma.cz). Cílem, který jsme si při spuštění registru společně dali, bylo dosažení celkového počtu nemocných 2010 v roce 2010. Tento cíl se nám již splnit podařilo! Počty evidovaných nemocných v obou základních skupinách, tj. MGUS a MM, překročily hranici 1000. Nejdéle sledovanými nemocnými v základních skupinách je žena s MM sledovaná již 18 let a muž sledovaný pro MGUS již více než 35 let. V minulém roce byl registr dále rozšířen o část věnovanou diagnostice a léčbě nemocných s Morbus Waldenström. RMG – tedy Registr Monoklonálních Gamapatií je vybudován na dvou základních principech: (1) každé centrum má trvale on-line k dispozici pouze svá data a současně i základní automatické analýzy včetně odpovídajících grafických zobrazení právě pro svoje centrum; (2) pro společné analýzy jsou slučována data pouze těch center, která vyjádřila souhlas se sdílením dat pro daný projekt. Pouze zástupci těchto center jsou následně spoluautory výstupu z provedené analýzy. Systém umožňuje kvalitní centrální management a správu dat jednotlivých center, přičemž jsou samozřejmě respektována jejich práva jako výhradních vlastníků klinických dat. Přestože se jedná o projekt i ve světě poměrně ojedinělý, největším registrem s několika tisíci nemocných s MGUS dnes disponuje Mayo klinika v Rochesteru, lze konstatovat, že RMG po 3 letech své existence začíná pomalu naplňovat naděje do něho vkládané a nezbyvá než věřit, že nám do budoucna pomůže při dalším zlepšování péče o naše nemocné.

1777.

Monoklonální gamapatie nejasného významu:

Možnosti molekulárně cytogenetického vyšetření u osob s nízkou infiltrací kostní dřene nádorovými plazmocyty

Mikulášová Aneta, Kuglík Petr, Zaoralová Romana, Smetana Jan, Grešliková Henrieta, Kupská Renata, Burešová Ivana, Pour Luděk, Křivanová Andrea, Krejčí Marta, Adam Zdeněk, Zahradová Lenka, Klincová Mária, Hájek Roman (*Laboratoře molekulární cytogenetiky, Babákův výzkumný institut, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno; Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno; Univerzitní výzkumné centrum – Česká myelomová skupina, Babákův výzkumný institut, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno; Interní hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a LF, Brno*)

Úvod: Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) je definována jako přítomnost monoklonálního imunoglobulinu (M-Ig) v séru a nebo v moči při současném nesplnění diagnostických kritérií mnohočetného myelomu (MM) či jiného lymfoproliferativního onemocnění. Pro osoby s MGUS znamená tato diagnóza vyšší pravděpodobnost

vzniku nádorového onemocnění, nejčastěji v podobě MM. Již ve stádiu MGUS se v plazmocyttech nalézají specifické chromozomové aberace. Molekulárně cytogenetická vyšetření osob s MGUS jsou však značně komplikována nízkou infiltrací kostní dřevě nádorovými plazmocytami. Cílem naší práce byla optimalizace molekulárně cytogenetického vyšetření osob s MGUS. Soubor sledovaných osob a metodika: Během let 2008 a 2009 bylo do Laboratoře molekulární cytogenetiky dodáno k cytogenetickému vyšetření celkem 54 vzorků kostní dřevě (KD) od 49 osob s MGUS. Postupně byly vyzkoušeny tři strategie odlišení plazmocytů. Výsledky: 8 vzorků bylo vyšetřeno z plné kostní dřevě pomocí fluorescenční imunofenotypizace plazmocytů a následné interfázni fluorescenční in situ hybridizace (metoda FICTION). Z důvodu nízkého počtu plazmocytů se však podařilo vyšetřit pouze 2 z 8 (25 %) vzorků. Pomocí techniky MACS (magneticky aktivovaná separace buněk) bylo k dispozici 13 vzorků KD, které byly rozděleny podle CD138+/CD138-. Pomocí následné I FISH se na takto separovaných buňkách podařilo vyšetření u 8 z 13 (62 %) vzorků z CD138+ frakce plazmocytů. Zbýlých 5 vzorků nebylo možné vyšetřit z důvodu nízké čistoty. Technikou FACS (fluorescenčně aktivovaná separace buněk) bylo separováno celkem 33 vzorků pomocí znaků CD138+, CD19+/- a CD56+/-, z toho úspěšně vyšetřených vzorků bylo 31 z 33 (94 %). Technikou I-FISH hodnocení bylo zhodnoceno celkem 41 vzorků pacientů. Delece RB1 (del(13q)(14)) byla nalezena u 8 z 35 vyšetřených pacientů (22,9 %), přestavba 14q32 (IgH) u 14 z 21 pacientů (66,7 %), t(4;14)(p16.3;q32) (FGFR3/IgH) u 1 z 36 pacientů (2,8 %), gain (1)(q21) (zisk CKS1B) u 8 z 32 pacientů (25,0 %), hyperdiploidie u 5 z 34 pacientů (14,7 %) a non-hyperdiploidie u 29 z 34 pacientů (85,3 %). Závěr: Bylo ukázáno, že pro úspěšné provedení molekulárně cytogenetického vyšetření u pacientů s MGUS je rozhodující správná volba separace či odlišení plazmocytů. Až využití separace pomocí FACS umožňuje úspěšnou analýzu změn v genomu plazmatických buněk u osob s MGUS. Práce byla podpořena granty: MŠMT LC06027, MSM0021622434, MSM0021622415 GAČR P304/10/1395, IGA NS10406-3, NS10387-3.

1701.

Nesekreční myelom - sekreční potenciál a cytogenetické změny

Pika Tomáš, Balcárková Jana, Lochman Pavel, Minařík Jiří, Mikula Peter, Žmolíková Jana, Bačovský Jaroslav, Jarošová Marie, Ščudla Vlastimil

(III. interní klinika, LF UP a FN, Olomouc; Hematoonkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc; Oddělení klinické biochemie, FN, Olomouc; Hematologické oddělení, Nemocnice, Havířov; CGB laboratory Inc., Ostrava)

Úvod: Poměrně vzácnou variantou mnohočetného myelomu je nesekretorická forma nemoci (NSMM), charakterizovaná absencí detekovatelné M-komponenty v séru a/nebo v moči a s tím související obtížnější stanovení di-

agnózy a posléze i sledování průběhu onemocnění, což většinou bývá příčinou vyloučení těchto nemocných z klinických studií. Cíl: Cílem práce bylo zhodnocení přínosu vyšetřování sérových hladin volných lehkých řetězců (VLŘ) ve skupině nemocných s NSMM a dále vyhodnocení přítomných cytogenetických změn. Metody: Vyšetřený soubor tvořilo 8 nemocných splňující International Myeloma Working Group kritéria NSMM. Sérové hladiny volných lehkých řetězců byly hodnoceny systémem Freelite™. K určení chromosomových změn byla použita klasická cytogenetická analýza a metoda FICTION s lokusově specifickými sondami 1q21/1p36 (Kreatech, MP Biomedicals, CA, USA), IgH, RB1, t(4;14), t(11;14) a centromerickými sondami pro chromosomy 7, 9, 11, 15 a 17 (Abbott-Vysis, Downers Grove, IL, USA). Výsledky: Patologické sérové hladiny volných lehkých řetězců κ - nebo λ a jejich vzájemného poměru – κ/λ indexu byly detekovány u 4 nemocných, a to v kvantitě umožňující pravidelné sledování průběhu onemocnění pomocí systému Freelite™, zatímco u 2 nemocných byly sérové hladiny VLŘ v mezích normy, a ve 2 případech byl zaznamenán dokonce pokles obou VLŘ pod normální mez. U 6 nemocných byla zjištěna přítomnost delece RB1 genu spolu s přítomnou translokací (11;14), přičemž tato změna byla přítomna u všech pravých, čistě nesekrečních forem. U 2 těchto nemocných byla navíc zjištěna i zmnožení oblasti 1q21. U 1 nemocného byla zjištěna polyploidie a trisomie chromosomu 15, u jednoho nemocného nebylo možno cytogenetickou analýzu provést pro multifokální charakter onemocnění. Závěr: Stanovení sérových hladin volných lehkých řetězců umožňuje u části nemocných s NSMM dodatečně detekovat sekreci lehkých řetězců, což vede k reklasifikaci NSMM na „nemoc lehkých řetězců“ κ nebo λ a stává se v tomto případě nenahraditelným vyšetřením pro sledování průběhu onemocnění. Translokace (11;14) a delece RB1 genu se jeví v souladu s recentními poznatky dominantní cytogenetickou změnou u NSMM. S podporou VVZ MSM 619895205.

1814.

HevyLite - nová analytická metoda v diagnostice a hodnocení průběhu monoklonálních gamapatií

Ščudla Vlastimil, Pika Tomáš, Heřmanová Zuzana (III. interní klinika, LF UP a FN, Olomouc; Ústav imunologie, LF UP a FN, Olomouc)

Náplní sdělení je souhrnná informace o HevyLite (HLC-heavy/light chain) analytické metodě, rozšiřující dosavadní možnosti diagnostiky, typizace a monitorování průběhu maligních monoklonálních gamapatií (MG) a dalších B-buněčných lymfoproliferativních stavů včetně Waldenströmovy makroglobulinémie a primární systémové AL-amyloidózy. Jsou popsána východiska a metodické aspekty této nové automatizované kvantitativní imunochemické analýzy, využívající vysoce specifické polyklonální HLC protilátky, jejímž terčem jsou unikátní junkční epitopy mezi konstantními doménami těžkých a lehkých řetězců.

tězců molekul imunoglobulinu. Hevylite technika umožňuje separátní rozpoznání a kvantifikaci Ig kappa a Ig lambda (IgG-kappa a IgG-lambda, IgA-kappa a IgA-lambda a IgM-kappa a IgM-lambda) včetně jejich poměru umožňujícího zhodnocení klonality procesu. Metodika je citlivější, nežli je standardní gelová i imunofixační elektroforéza bílkovin séra. Vyšetření HCL nadějně rozšiřuje nejen možnosti diagnostiky, ale i monitorování průběhu maligních MG s citlivou detekcí remise, relapsu nebo progresu nemoci. Podpora grantu IGA MZ NR 9489 a VVZ MSM 6198959205

1680.

Extamedulární relaps jeho zvýšená incidence a špatná prognóza – zkušenosti jednoho centra

Pour Luděk, Adam Zdeněk, Kaiserová Petra, Krejčí Marta, Zahradová Lenka, Sandecka Viera, Szturz Petr, Klinčová Maria, Hájek Roman
(IHOK FN Brno, Masarykova univerzita, Brno; IHOK FN, Babákův výzkumný institut, Brno)

Mnohočetný myelom (MM) je typických případech charakterizovaný produkcí monoklonálního imunoglobulinu, cytopenií a osteolýzou skeletu. Extramedulární postižení - relaps (EM) znamená agresivnější průběh choroby. Pacienti s EM mají horší prognózu při použití konvenční léčby. Relaps s EM složkou je pozorován u asi 10% pacientů po autologní transplantaci. Cílem studie bylo určení incidence a prognózy u pacientů s EM relapsem v éře nových účinných léků. Hodnoceno bylo celkem 226 pacientů s relapsem MM (115M/111Ž, median věku: 61 let, median sledování 3,7 let). Hodnoceni byli všichni pacienti léčení na IHOK FN Brno s relapsem MM v letech 200-2008. Pro průkaz EM relapsu byla upřednostňováno histologické vyšetření, pokud nebylo možné provést biopsii bylo použito CT či MRI. Pacienti se vstupním EM byli vyloučeni z analýzy. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin - 1. skupina pacientů s EM relapsem souvisejícím s kostní tkání (B-EM) 2. skupina pacientů s EM v měkkých tkáních nesouvisejícím s kostí nebo s infiltrací solidních orgánů klonálními plasmocyty (ST-EM). Režimy s thalidomidem (33%), bortezomibem (38%) a lenalidomidem (5%) byly použity pro léčbu EM relapsu, u 42% pacientů společně s autologní transplantací. Standardně byla použita také radioterapie. Celkem 24% (55/226) pacientů mělo prokázán EM relaps (42% (22/55) - B-EM; 58% (32/55) - ST-EM). Nejčastější ve formě kožních ložisek 42% (22/55). EM relaps se objevil časně v průběhu choroby u 53% (29/55) nemocných již v prvním relapsu, u 33% (18/55) v druhém a později jen u 14% (8/55). Léčebná odpověď u obou skupin EM pacientů byla pozorována u 24% (13/55). Doba do progresu však činila pouze 5,4 měsíce(m). Medián celkového přežití (OS) (89,5 m pro všech 226 pts) byl signifikantně kratší u pacientů s EM oproti ostatním (109m vs 38m; p=0.0001). OS u pacientů s ST-EM byl zkrácen oproti pacientům s B-EM (30m

vs 45m; p=0,002). OS od data relapsu byl u všech pacientů s EM pouze 8 měsíců, ale u pacientů s ST-EM byl ještě kratší než u pacientů s B-EM 12m vs 4m, p=0.006). Naše data prokazují výrazně vyšší incidenci EM relapsu. I přes zavedení nových léků do léčebných algoritmu MM znamená EM relaps extrémně špatnou prognózu, která je ještě horší pokud se objeví EM nesouvisející s kostní tkání. Vzhledem ke zvýšené incidenci EM relapsu se tento problém stává hlavní výzvou pro léčbu MM, neboť účinná léčba pro tyto nemocné není stále k dispozici. Podpořeno granty MSM. 0021622434. MSMT LC 06027

1799.

18F – FDG PET/CT a 99mTc-MIBI scintigrafie v diagnostice relapsu mnohočetného myelomu

Bačovský Jaroslav, Mysliveček Miroslav, Ščudla Vlastimil, Minařík Jiří, Pika Tomáš
(III. interní klinika FN, Olomouc; Klinika nukleární medicíny LF a FN, Olomouc)

V nedávné době byly zavedeny ke zhodnocení aktivity a rozahu onemocnění u pacientů s mnohočetným myelomem (MM) a monoklonální gamapatií nejistého významu (MGNV) novější zobrazovací modalita 18F-FDG PET/CT a 99mTc-MIBI scintigrafie. Cílem naší práce bylo zhodnotit a srovnat přínos těchto metod v relapsu myelomu.. Materiál a metody: Do studie bylo zařazeno celkem 44 nemocných s podezřením na relaps MM. Všem pacientů byly provedeny 99mTc-MIBI scintigrafie a 18F-FDG PET/CT. Časový odstup mezi oběma vyšetřeními nepřesahoval 2 týdny. Výsledky obou vyšetření byly hodnoceny jako N (normální), D (difuzní) a F-FD (ložiskové nebo kombinované ložiskové a difuzní). Výsledky: Mezi oběma srovnávanými metodami nebyl v detekci nově diagnostikovaného MM a relapsu zaznamenán signifikantní rozdíl. 18F-FDG PET/CT detekovala s vyšší frekvencí než 99mTc-MIBI scintigrafie F-FD typ nálezu (p<0,039), naopak 99mTc-MIBI scintigrafie detekovala přesněji D typ nálezu (p=0,042). 18F-FDG PET/CT vizualizovala signifikantně více fokálních lézí než 99mTc-MIBI scintigrafie (p=0,002) a to jak celkově v souboru, tak při srovnání počtu fokálních lézí na pacienta. Obě srovnávané metody samotné nebo v kombinaci ovlivnily terapeutický postup u 17% pacientů. 18F-FDG PET/CT detekovala u více pacientů než 99mTc-MIBI scintigrafie u asymptomatických MM a u pacientů s MGNV častěji přechod do agresivnějších forem choroby s nutností terapie. Závěr: 18F-FDG PET/CT vyšetření je díky kombinaci poskytovaných morfoloických a funkčních informací a celotělovému charakteru vyšetření velmi cennou metodou v detekci fokálních lézí MM a jeví se jako vhodná metoda v primárním stážování choroby i v diagnostice relapsu. 99mTc-MIBI scintigrafie zůstává přes své limitace vedoucí k podhodnocování stadia MM nejdostupnější a relativně levnou celotělovou vyšetřovací metodou a je alternativní volbou. Podpora grantu IGA : NR 9489-3

AKUTNÍ LEUKEMIE II.

1775.

Klofarabin (CLO) v terapii akutní myeloidní leukemie (AML) – zkušenosti jednoho centra

Ráčil Zdeněk, Demovičová Alice, Krejčí Marta, Razga Filip, Mayer Jiří

(Interní hematologická klinika LF MU a FN, Brno)

Úvod: CLO je novým purinovým analogem, který v klinických studiích prokázal účinnost nejen v léčbě akutní lymfoblastické leukemie, ale také při použití u nemocných s AML - a to jak v monoterapii, tak v kombinaci s antracykliny nebo cytosinarabiosidem. Metody: Retrospektivní analýza pacientů s AML léčených režimy s CLO v rámci záchranné terapie (AML nereagující na iniciační léčbu nebo hematologický relaps AML) (CLO 22,5mg/m² den 1-5 + idarubicin 9mg/m², den 1-3; konsolidace ve stejném složení s redukcí dávek o 25%) nebo terapie molekulárního relapsu AML (CLO 40mg/m² den 1-5; konsolidace ve stejném složení). Výsledky: Od 4/2009 do 4/2010 bylo léčeno na našem pracovišti 14 pac. s AML protokoly s CLO (11 pac. záchranná terapie, 3 pac. léčba molekulárního relapsu). Z 11 pac. léčených v rámci záchranné terapie dosáhlo po indukční léčbě 5 (45%) kompletní remise, 2 (18%) partiální remise, 3 (27%) pac. neodpověděli a u jednoho nemocného nelze efekt hodnotit. Ze 3 pacientů léčených pro molekulární relaps dosáhli 2 (66%) kompletní molekulární remise AML (u jednoho pac. dosud nelze efekt hodnotit). 6 pac. následně podstoupilo 1-3 konsolidační léčebné cykly. U 8 pac. pak byla provedena alogenní transplantace krvetvorné tkáně (u 6 pac. v kompletní remisi, u 2 pac. s aktivní chorobou). Infekce byly nejčastější komplikací spojenou s terapií CLO režimem. 9 (81%) pac. se záchrannou terapií a 2 (66%) pac. léčení pro molekulární relaps mělo infekční komplikaci během indukční léčby. U 6 (54%) pac. se záchranným režimem šlo o infekci závažnou (nejčastěji bronchopneumonii), u ostatních šlo o běžnou febrilní neutropénii. Frekvence infekčních komplikací výrazně poklesla po zavedení rutinní antimykotické profylaxe posakonazolem (60% vs. 33%). K úmrtí došlo u 63% pac. podstupujících záchrannou terapii (18% komplikace v průběhu terapie CLO režimem, 27% progresse AML, 18% komplikace po alogenní HSCT). Všichni pacienti léčení pro molekulární relaps přežívají. Souhrn: Použití CLO vedlo v prezentovaném (v ČR dosud největším) souboru pac. s AML k 63% léčebných odpovědí u pac. podstupujících záchrannou terapii AML. Celkové dlouhodobé přežití pac. v této vysoce rizikové skupině je však i přes úspěch iniciační léčby CLO omezené (celkové přežití 37%). Nejzávažnější komplikací léčby CLO režimem jsou infekce (bronchopneumonie) - jejich frekvenci však významně omezuje současná antimykotická profylaxe posakonazolem. CLO se jeví být nadějným lékem při použití v terapii molekulárního relapsu AML.

1722.

Léčba Ph pozitivní akutní lymfoblastické leukemie dospělých v běžné praxi: zkušenosti jednoho centra

Folber František, Doubek Michael, Jurček Tomáš, Krejčí Marta, Brychtová Yvona, Mayer Jiří

(Interní hematologická klinika FN a LF MU, Brno)

Úvod: Ph pozitivní akutní lymfoblastická leukemie dospělých (Ph+ ALL) patří mezi hematologická onemocnění s obzvláště nepříznivou prognózou, přestože se léčebné vyhlídky v poslední době poněkud zlepšily díky inhibitorům tyrozinokinázy (TKI). Naším cílem bylo zhodnocení jejich vlivu v běžné praxi jednoho hematologického centra. Pacienti a metody: Do analýzy bylo zařazeno celkem 24 pacientů s nově diagnostikovanou Ph+ ALL, z nichž 14 (58 %) bylo léčeno kombinací chemoterapie a TKI (imatinibu) a zbylých 10 (42 %) pouze chemoterapií, většina v době, kdy ještě TKI nebyly dostupné. U 11 (46 %) pacientů byla součástí léčby transplantace krvetvorby: 8x od nepříbuzného dárce, 1x od HLA shodného sourozence a 2x autologní. V získaných datech jsme hodnotili dosažení kompletní hematologické remise (CR) a kompletní molekulární remise (CMR), výskyt relapsu a faktory ovlivňující celkové přežití (OS). Zvláštní pozornost jsme věnovali vlivu přidání TKI k chemoterapii. Výsledky: U 19 (79 %) z 24 pacientů byla dosažena CR (medián doby do dosažení CR 37 dní), 12 (75 %) z 16 sledovatelných pacientů dosáhlo CMR (medián doby do dosažení CMR 67 dní). V 9 (47 %) případech došlo k relapsu onemocnění (medián doby do relapsu 7,6 měsíce), který byl následován pouze velmi krátkým intervalem přežití bez ohledu na druh záchranné léčby. Molekulární relaps byl v naprosté většině případů následován i relapsem hematologickým (medián doby do molekulárního relapsu 2,9 měsíce). Na konci období sledování s mediánem 8,7 měsíce je 8 (33 %) pacientů stále naživu v CR (pouze jeden z nich byl léčen bez TKI) a 16 (67 %) mrtvých. K úmrtí došlo nejčastěji následkem infekce (9 pacientů, 56 %) a progresse ALL (5 pacientů, 31 %). Medián celkového přežití byl 9,2 měsíce, přičemž nejdelší přežití měli ti pacienti, kteří dosáhli CR ($p < 0,001$) nebo CMR ($p = 0,026$) a podstoupili alogenní transplantaci ($p = 0,003$). Přidání TKI k chemoterapii bylo spojeno s vyšší pravděpodobností dosažení CR ($p = 0,075$) a CMR ($p = 0,05$), avšak neovlivnilo výskyt relapsu ($p = 0,26$) ani nevedlo k prodloužení celkového přežití ($p = 0,13$). Závěr: Jak vyplývá z údajů z běžné praxe, u pacientů s Ph+ ALL je nejlepších léčebných výsledků dosaženo kombinací chemoterapie a TKI s následnou alogenní transplantací krvetvorných buněk.

1715.

Výsledky léčby dětí s relapsem a primárně rezistentní akutní myeloidní leukémií ve studii „Relapsed AML 2001/01, 02“

Starý Jan, Sedláček Petr, Smíšek Petr, Štěrbá Jaroslav, Hrstková Hana, Blažek Bohumír, Mihál Vladimír, Hak Jiří, Procházková Daniela, Černá Zdena, Timr Pavel, Zemanová Zuzana, Jarošová Marie, Oltová Alexandra, Schwarz Jiří, Mejstříková Ester, Hrušák Ondřej, Zuna Jan, Janotová Iveta, Vodičková Elena, Zámková Alena, Vávra Vladimír, Kaspers Gertjan

(Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2.LF a FN Motol, Praha; Brno, Ostrava, Olomouc, Hradec Králové, Ústí nad Labem, Plzeň, České Budějovice, Amsterdam-Holandsko)

Přestože se výsledky léčby dětí s akutní myeloidní leukémií (AML) stále zlepšují, 30% pacientů prodělá relaps leukémie a 5-10% onemocnění je primárně rezistentních na chemoterapii. Prognóza těchto pacientů je velmi špatná. Pediatrická leukemická centra České republiky se v období VIII/2001-III/2009 zúčastnila mezinárodní studie léčby dětí s relapsem/primárně rezistentní AML „Relapsed AML 2001/01,02“. První blok léčby FLAG se skládal z fludarabinu 30 mg/m² x 5, cytosin arabinosidu 2g/m² x 5 a G-CSF. Randomizovanou studií byl ověřován význam přidání liposomálního daunorubicinu v dávce 60 mg/m² x 3. Pacienti s méně než 20% blasty v kostní dřeni den +28 obdrželi druhý blok FLAG a byli indikováni k transplantaci kostní dřene (HSCT), pacienti s více než 20% blasty d28 byli vyřazeni ze studie. Léčebnou alternativou pro ně bylo podání gemtuzumab ozogamicinu v dávce 7,5 mg/m² x 2. Do studie bylo v České republice zařazeno 20 dětí, 18 s prvním relapsem AML a 2 s primárně rezistentním onemocněním, 11 chlapců a 9 děvčat. Časný relaps méně než 12 měsíců od diagnózy prodělalo 11 dětí, pozdní relaps byl diagnostikován u 7 pacientů. Podle FAB klasifikace byly nejčastěji zastoupeny M5 (n=7) a M2 (n=6) leukémie. AML s nálezem fúzních genů AML1-ETO či CBFβ-MYH11 mělo 7 (35%) dětí, přestavbu MLL genu 6 (30%) pacientů. Dva pacienti zemřeli časnou smrtí, 6 bylo non-responderů, 12 (60%) dosáhlo remise, 11 z nich podstoupilo alogenní transplantaci kostní dřene (v 10 případech od nepřibuzného dárce), dvě děti zemřely na komplikace extenzivní chronické GVH nemoci, 7 pacientů prodělalo další relaps. Tři pacienti podstoupili dvě nepřibuzné HSCT. Celkem žije 6 (30%) dětí (4 v druhé remisi a dvě v třetí). Ze 13 pacientů s primárně rezistentní AML/časným relapsem žijí 4 (31%), ze 7 pacientů s pozdním relapsem 2 (29%). Léčbu Mylotargem absolvovalo 6 dětí (3 non-responderů na FLAG neúspěšně, třem dětem s relapsem po HSCT umožnil podstoupit druhou transplantaci). 5-letý EFS/OS je 17%/32%. Naše výsledky jsou srovnatelné s celkovými výsledky studie (z 495 pacientů dosáhlo remise 62% a 4-letý OS je 33%). Blok DaunoXome – FLAG dosáhl účinnější redukce blastů a vyššího pro-

centa remisí než FLAG. V plánované studii „Relapsed AML 2009“ je ke dvěma blokům DaunoXome-FLAG/FLAG přidán Mylotarg formou randomizované studie za účelem zvýšení úspěšnosti v dosažení remise a zlepšení její kvality.

1658.

Alogenní transplantace u pacientů s AML starších 50 let mají srovnatelné výsledky s příbuzným i nepřibuzným dárce. Finální analýza multicentrického podprojektu ALERT

Jindra Pavel, Mužík Jan, Indrák Karel, Žák Pavel, Alsabty Firas, Kozák Tomáš, Koza Vladimír, Cetkovský Petr, Karas Michal, Jungová Alexandra, Sičová Kateřina, Vogelová Jaroslava, Dušek Ladislav, Hrabětová Šárka (Hematologicko-onkologické oddělení FN, Plzeň; IBA MU, Brno; FN, Olomouc; FN, Hradec Králové; FN, Bratislava; FNKV, Praha; UHKT, Praha)

AML postihuje především starší lidi a jedinou reálně kurativní léčbou je alogenní transplantace krvetvorných buněk. Nicméně vzhledem k obavám z vyšší toxicity u nepřibuzných dárců a horší dostupnosti sourozenců u starší populace je její proveditelnost pro tuto skupinu považována za limitovanou. Pomocí retrospektivní multicentrické studie v rámci projektu ALERT jsme srovnali výsledky příbuzenských a nepřibuzenských transplantací u pacientů s AML starších 50 let. Pacienti a metodika: Retrospektivní analýza 96 pacientů starších 50 let (medián 56, 50-68) konsekutivně transplantovaných v 5 českých a slovenských centrech buď s příbuzným (SIB, n=59) nebo nepřibuzným (MUD, n=37) dárce. Obě skupiny byly srovnatelné co do věku, pohlaví pacienta a dárce, typu conditioningu, typu štěpu, CMV statusu, stavu nemoci a cytogenetického risk-statusu. Pacienti MUD skupiny byly transplantováni se signifikantně vyšším počtem CD 34+ buněk (medián 6,5 vs 4,7x10⁶ /kg, p=0,004) a s mladšími dárce (medián 32 vs 55 let, p<0,001). Výsledky: S mediánem sledování 10 měsíců po transplantaci (1-132 měsíců, SIB i MUD srovnatelné) byl medián přežití (OS) a přežití bez nemoci (DFS) pro celý soubor 17, respektive 15 měsíců a 2-letá pravděpodobnost OS a DFS byla 45,4 a 41,9%, respektive. Mezi SIB a MUD skupinou nebyl v těchto parametrech zaznamenán žádný statisticky signifikantní rozdíl (2-r OS 48% vs. 42%, p=0,721; 2-r DFS 41,9% vs. 42,4%, p=0,896). Signifikančními faktory ovlivňujícími v univariální analýze OS bylo střední (RR 0,45) i nepříznivé (RR 3,13) cytogenetický risk-status a transplantace mimo CR (RR 2,14). V multivariální analýze pak zůstaly jedinými významnými faktory pro OS nepříznivá cytogenetika (RR 3,36, p=0,001) a transplantace mimo CR (RR 2,30, p=0,011). Stejně faktory byly v multivariální analýze identifikovány jako významné i pro DFS (RR 3,0, p=0,002, resp. RR 2,27, p=0,009). Žádný faktor – tedy ani typ dárce (pro MUD RR 2,57, p=0,15) – neměl zá-

sadní vliv na NRM. Faktory navyšující riziko relapsu v multivariantní analýze byly transplantace mimo CR (RR 4,61, $p=0,008$) a hraničně i myeloablativní transplantace (RR 2,95, $p=0,048$). Závěr: Výsledky jasně dokládají, že nepřibuzný dárce nemá negativní vliv na výsledek alogenní transplantace u pacientů s AML starších 50 let. Nepřibuzenská transplantace kostní dřeně je tudíž vhodné považovat za standardní kurativní terapii u této skupiny pacientů s AML. Podpora grantem NR9481-3/2007

3rd SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY

1806.

JAK2 is targeted by recurrent translocations in classical Hodgkin lymphoma

Katrien Van Roosbroeck, Luk Cox, Thomas Tousseyn, Idoya Lahortiga, Olga Gielen, Barbara Cauwelier, Pascale De Paepe, Gregor Verhoef, Peter Marynen, Peter Vandenberghe, Chris De Wolf-Peeters, Jan Cools, Iwona Wlodarska (*CME, Leuven, Belgium*)

The genetics and molecular biology of classical Hodgkin lymphoma (cHL) is poorly understood. Besides difficulties of cytogenetic analysis of cHL, we have identified and characterized a novel t(4;9)(q21;p24) found in one cHL case. Extensive interphase FISH analysis of the 9p24 and 4q21 regions mapped both breakpoints in regions harbouring JAK2 and SEC31A, respectively. Further molecular studies of this case identified a SEC31A-JAK2 in-frame fusion transcript in which exon 24 of SEC31A is fused to exon 17 of JAK2. To determine the in vitro oncogenic potential of SEC31A-JAK2, a chimeric expression construct was designed and introduced into mouse haematopoietic IL3-dependent Ba/F3 cells. SEC31A-JAK2 was found to transform Ba/F3 cells to IL3-independent growth, demonstrating its implication in oncogenic transformation. Constitutive activation of the ERK pathway, downstream of the SEC31A-JAK2 fusion, was found. Moreover we showed that SEC31A-JAK2 is sensitive for JAK2 inhibitors. An in vivo role of the fusion was assessed with a murine bone marrow transplant model. All six recipients of SEC31A-JAK2 transduced bone marrow cells developed a fatal disease after 107 – 174 days, that was diagnosed as a T-lymphoblastic lymphoma (3 mice) and a myeloid-like disorder (2 mice). To determine the incidence of JAK2 rearrangements in cHL, we screened 12 cHL by cDNA-based nested PCR and 158 unselected cHL cases by FISH. Using this approach, we identified one additional case with a SEC31A-JAK2 fusion showing 4q21 and 9p24 breakpoints identical to these in the index case and two cHL cases with JAK2 rearrangements not involving SEC31A. Moreover, low copy gains and amplifications of JAK2 were observed in 40.5% and 20.2% of cHL cases, respectively. In summary, we proved that JAK2 is recurrently targeted by

chromosomal translocations in cHL. We identified and molecularly characterized the novel t(4;9)(q21;p24) resulting in a SEC31A-JAK2 fusion found in two NSHL cases and identified another not yet characterized JAK2 rearrangements in two additional cHL cases. The oncogenic potential of the SEC31A-JAK2 fusion was demonstrated both in vitro in the mouse haematopoietic IL3-dependent Ba/F3 cell line and in vivo in a murine bone marrow transplant model. Although aberrant expression of various PTKs including JAK2 has already been documented in cHL, our results indicate that at least in some cHL cases, this aberration can be driven by a chromosomal translocation.

1757.

In search of clinical relevance of MIR155 host gene upregulation in B-cell chronic lymphocytic leukemia

Stopka Tomáš, Vargová Karina, Čuřík Nikola, Burda Pavel, Savvulidi Filipp, Pospíšil Vít, Berková Adéla, Basová Petra, Trněný Marek, Karban Josef, Obrtlíková Petra, Nečas Emanuel, Zavadil Jiří
(*Pathological Physiology and Center of Experimental Hematology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague; First Medical Department - Hematology, General Faculty Hospital, Prague, Czech Republic*)

Our study involves patients (NPTS=46) with chronic B-lymphocytic leukemia (B-CLL) that all display elevation of microRNA miR-155 (compared to normal B cells), that represents as supported by others novel candidate pathogenic factor in B-CLL (Marton et al, 2008; Wang et al, 2008). All patients in this study were analyzed for prognostic markers including expression of CD38 and ZAP-70, IgVH mutation status and cytogenetics by FISH. We herein present evidence that MYB is also overexpressed in B-CLL and positively regulate miR-155 levels. These data are supported by evidence indicating that transcription factor MYB (Myeloblastoma protein) is associated with lymphocytic development and its targets are involved in development of B-cells (Lei et al, 2004). MYB physically associates with the promoter of MIR155 host gene (MIR155HG, also known as B-cell integration cluster) in B-CLL and stimulates its transcription in reporter assay. The chromatin structure of MIR155HGp in B-CLL displays a spreading of hyperacetylation of histone H3K9. Our data support candidate mechanism in B-CLL that includes MYB directly stimulating MIR155HGp coincident with its epigenetic dysregulation. The data are documenting clinical relevance of the novel pathogenic mechanism within the B-CLL patient cohort and will be presented in respect to their clinical outcome.

1637.

The origin of 22q11 deletion and microRNA-650 expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL)

Mraz Marek, Plevova Karla, Pavlova Sarka, Stano Kozubik Katerina, Tichy Boris, Lochmanova Jana, Malcikova Jitka, Borsky Marek, Verner Jan, Brychtova Yvona, Doubek Michal, Trbusek Martin, Mayer Jiri, Pospisilova Sarka (Center of Molecular Biology and Gene Therapy, Dept of Internal Medicine – Hematooncology, Faculty of Medicine MU and University Hospital Brno, Brno, Czech Rep.)

The use of array-CGH and SNP-arrays facilitated discoveries of novel recurrent chromosomal abnormalities present in CLL. Recently, Gunn et al (2009) described a deletion of 22q11 in CLL, and defined the minimal deleted region as 0,34Mb (containing PRAME, ZNF280A, ZNF280B). This locus encodes mentioned protein-coding genes and lambda immunoglobulin light chain (IgL) subgenes. Interestingly, the subgenes of V2 family of IgL include a miR-650 gene and its homologs, which overlay their leader exon. The expression of miRNAs was previously associated with immune functions (Vigorito, 2007; Koralov, 2008) and known prognostic markers in CLL (Calin, 2005; Mraz, 2009). We analyzed genomes of 40 CLL patients using array-CGH (CGH Microarray 4x44K, Agilent) and FISH (del13q14, del17p13, del11q23,+12). The 22q11 rearrangements were characterized in detail by PCR detection (BIOMED-2 protocol). The Real-Time PCR (TaqMan, ABI) was performed for protein-coding genes and miR-650 located at 22q11. Using aCGH additional aberrations to FISH were found in 90% of samples and among them, the deletions in 22q11 were observed most often (ranging in size up to ~0,77Mb). Altogether, 38% of patients (15/40) had detectable deletion in this locus and according to our finding, all observed deletions were a consequence of a VJ rearrangement event, which leads to an elimination of genes located between VJ elements. In our cohort, deletions of 22q11 containing protein-coding genes constituted only ~44% (n=7) and 56% patients (n=8) harbored smaller deletions not involving these genes. Surprisingly, the Real Time-PCR for miR-650 reported higher expression of miR-650 in CLL cells utilizing V2-8, V2-5, V2-14, V2-23 subgenes for IgL (n=10) compared to samples utilizing different V lambda family or expressing kappa Ig (n=30). We suggest that the overlap between miR-650 and the leader exon of V2 IgL subgenes provides a mechanism for coordinated IgL-miR-650 expression. To assess the target genes of miR-650 we performed a microarray profiling (Human One-Array) post transfection of CLL cells with a short RNA mimicking miR-650. The transfection led to a significant down-regulation of tens of mRNAs. Moreover, the predicted targets of miR-650 with highest score include EBF and VPB1, whose expression is essential for immature phenotype of pre-B lymphocytes. The observation of coordinate expression of IgL and miR-650 has a potential great relevance for B cell biology. IGA MZCR NS10439-3/2009, MUNI/A/1012/2009

1745.

Diverse asparagine synthetase expression in lymphoid blasts is not relevant to the sensitivity to L-Asparaginase

Heřmanová Ivana, Trka Jan, Starková Júlia (CLIP-Childhood leukaemia investigation Prague; Klinika dětské hematologie a onkologie UK, 2. lékařská fakulta, Praha)

Childhood ALL is treated with combined chemotherapy, which includes the enzyme L-Asparaginase (L-Asp). The cytotoxic effect of L-Asp consists in its ability to deplete extracellular asparagine and glutamine. The sensitivity of primary ALL cells to this depletion is traditionally explained by decreased activity of asparagine synthetase (ASNS). Although increased ASNS level was indeed shown to be connected with L-Asp resistance, the exact relationship between ASNS expression and L-Asp sensitivity has not been elucidated so far. Glutamate dehydrogenase (GDH) is an enzyme necessary for glutamine synthesis. Microarray analysis showed significantly lower expression of GDH gene in primary TEL/AML1[+] blasts in comparison with TEL/AML1[-], which might lead to deficiency of glutamine in these cells and consequently higher sensitivity to L-Asp. The aim of this study was to pursue the association of ASNS gene expression, protein level and sensitivity to L-Asp in ALL cell lines and primary paediatric ALL samples. We also focused on the role of GDH in the L-Asp mechanism of action. We showed that ASNS protein levels reflected ASNS mRNA levels and these correlated negatively with sensitivity to L-Asp. UOCB6 as the most resistant cell line (IC50=0.04U/ml) had the highest expression of ASNS (normalized ASNS, nASNS=4.946), followed by NALM6 (IC50=0.01U/ml; nASNS=1.8), REH (IC50=0.6x10⁻⁴; nASNS=1.176) and RS4;11 (IC50=0.3x10⁻⁴; nASNS=0.024). Detection of protein content in primary ALL blasts was thwarted by extremely low ASNS expression compared to cell lines. A gradual silencing of ASNS gene in REH cell line led to gradual increase of L-Asp sensitivity till the level of 50%. Further knock-down did not influence the L-Asp sensitivity. Accordingly, ASNS knock-down did not affect L-Asp cytotoxicity in highly sensitive RS4;11 cell line. We found lower GDH gene expression in primary TEL/AML1[+] compared to TEL/AML1[-] leukaemias (p=0.019). Silencing of GDH gene in TEL/AML1[+] REH cell line increased L-Asp sensitivity. Our data demonstrate that in cells with very low ASNS expression, as shown in primary ALL blasts and L-Asp-sensitive cell line, the difference in ASNS levels does not affect sensitivity to L-Asp. We identified GDH as a new player in the response to cytotoxic effect of L-Asp. Furthermore, we suggest a relationship between ASNS and GDH based on our observations of increased GDH expression in cells with silenced ASNS gene. Support: GAUK92710, MSM0021620813.

1744.

Adaptor protein NTAL enhances proximal signalling and potentiates corticosteroid induced apoptosis in T-ALL

Svojr Karel, Kalina Tomas, Brdicka Tomas, Kacerova Te-reza, Stary Jan, Zuna Jan

(CLIP, Dept. of Paediatric Haematology and Oncology, 2nd Medical School, Charles University, Prague, Czech Republic; Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences, Czech Republic; Dept. of Paediatric Haematology and Oncology, 2nd Medical School, Charles University, Prague, Czech Republic)

Aim: Signalling from pre T-cell receptor (TCR) is important in T-lineage acute lymphoblastic leukaemia (T-ALL) development. LAT is transmembrane adaptor protein essential for signal transmission from TCR. NTAL, an analogue of LAT lacking a binding site for PCKgamma, is not expressed in healthy T lymphocytes. We analysed impact of NTAL and LAT expression on biology and treatment response in T-ALL. **Materials and Methods:** Levels of NTAL and LAT expression in diagnostic bone marrow samples of 39 paediatric patients with T-ALL were analysed using RQ-RT-PCR. T-ALL Jurkat cell line expressing no NTAL (Jurkat/wt) and derivative Jurkat cell line transfected with NTAL construct (Jurkat/NTAL+) were used for in-vitro experiments. To analyse effect of corticosteroid treatment we used methylprednisolone at 1mM concentration. Moreover, we stimulated TCR signalling using C305 IgM antibody. Apoptosis rate, phosphorylation status and expression level of key signalling molecules were assessed by flow cytometry and RQ-RT-PCR. **Results:** Patients, responding favourably to prednisone pre-treatment express higher levels of NTAL than patients responding unfavourably ($p=0.028$); LAT expression is stable ($p>0.9$). The same effect was confirmed in in-vitro experiment - after 48 hours of methylprednisolone treatment the percentage of surviving Jurkat/NTAL+ vs. Jurkat/wt cells was 11% vs. 31% ($p<0.05$). After TCR stimulation, Jurkat/NTAL+ cells show significantly higher levels of ERK phosphorylation compared to Jurkat/wt (median 1.5 fold) while phosphorylation status of p38 and JNK does not differ. Moreover, after TCR stimulation Jurkat/NTAL+ cells show higher levels of activation (assessed by CD69 levels: 70% vs. 60%, $p<0.05$) and apoptosis (21% vs. 47% surviving cells, $p<0.05$). The apoptosis is triggered by mechanisms other than via activation of FAS or FASL as expression of these proteins are stable. **Conclusions:** We conclude that NTAL is a tumour suppressor enhancing proximal signalling of lymphocytes and sensitising leukemic T-cells to corticosteroid induced apoptosis. Supported by MSMT NPV 2B06064 and MSMT VZ MSM0021620813

1764.

Unique monocytic transdifferentiation during the ALL treatment in a subgroup of BCP ALL patients with aberrant expression CD2 (LFA-2)Mejstříková Ester, Slámová Lucie, Froňková Eva, Mužíková Kateřina, Vodičková Elena, Zuna Jan, Bourquin Jean-Pierre, Marschalek Rolf, Zemanová Zuzana, van Delft Frederik, Kalina Tomáš, Fišer Karel, Smíšek Petr, Votava Tomáš, Trka Jan, Starý Jan, Hrušák Ondřej
(Klinika dětské hematologie a onkologie LF2 UK a FN Motol, Praha; Oddělení klinické hematologie FN Motol, Praha; Division of pediatric Oncology, Zurich, Switzerland; Johann Goethe Universität, Frankfurt am Main, Germany; Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, 1.LF UK a VFN, Praha; Institute of Cancer Research, London, UK)

BACKGROUND. Models of human hematopoiesis assume either early separation of myeloid and lymphoid lineage or common lymphoid-myeloid progenitors. Bipotential B-macrophage progenitor was identified in human bone marrow. Case reports demonstrated simultaneous presence of B cell malignant clone and histiocytic/dendritic cell sarcoma with identical Ig-TCR rearrangements. **RESULTS.** We originally noticed rare subset of patients ($n=6/713$ BCP-ALL) with significant immuno-phenotypic changes towards monocytic lineage at days 8-33 (especially increase of CD14 and CD33). Remarkably, these patients typically had monocytosis by morphology and/or by cytometry (FC) during prednisone prephase but not at diagnosis. We performed FACSsorting experiments and searched for leukemia-specific Ig-TCR rearrangements among monocytes at d8 to 33. All 8 sorted mature monocytes contained Ig-TCR rearrangements identical to diagnostic sample. One patient developed secondary monocytic AML after 6 months of ALL therapy; retrospectively, however, secondary blasts contained identical Ig-TCR rearrangements compared to diagnosis. Therefore, these monocyte-like cells represented switched ALL blasts. Interestingly 5/6 of cases expressed CD2. We studied complex monocyte-like features in prospective 8-color cytometric study evaluating simultaneously B cell and monocytic maturation pathway. Among 78 patients, frequency of B/monocytic intermediary cells at day 8 significantly correlated with CD2pos ($p=0.0015$). Thus, CD2 heralds monocytic transdifferentiation, which may remain subtle or in 14% of CD2pos cases (6/44) results in major monocytosis or secondary leukemia. All patients with transdifferentiation pattern during therapy and CD2pos had germline MLL and DNA index equal to 1, no patient had FLT3/ITD, BCR-ABL, E2A-PBX or TEL-AML. So far we did not identified using SNP arrays common genetic lesion for all patients except for CDKN2A deletion in 5/9 cases, 3/9 cases showed IKZF1 gene loss and/or altered gene expression. **CONCLUSION.** We identified significant correlation of aberrant CD2 and ability of blasts to transdifferentiate into monocytic cells with complete loss of B cell markers during induction therapy. Supported

by:P301/10/1877,NS/10004,NPV2B06064,MSM002162
0813,MZOFNM2005.

HEMOSTÁZA

Národní hemofilický program (20')

Penka Miroslav (*Brno*)

Trombofilní stavy – nové aspekty (20')

Dulíček Petr (*Hradec Králové*)

Nová antitrombotika – současnost a budoucnost (20')

Krčová Věra (*Olomouc*)

Splenektomie u dětských pacientů s imunitní trombocytopenickou purpurou (20')

Pospíšilová D, Ptoszková H, Hrstková H, Smíšek P, Sulovská L, Procházková D. (*Olomouc*)

MNOHOČETNÝ MYELOM II.

1706.

Nové a „staronové“ léčebné strategie v léčbě mnohočetného myelomu v roce 2010

Hájek Roman

(*Interní hemato-onkologická klinika, FN, Brno*)

Přes významný pokrok v léčbě je mnohočetný myelom považován za stále nevyhlášené onemocnění. Proto je léčba indikována jen u pacientů se symptomatickým mnohočetným myelomem. V léčbě je používán některý z vysoce účinných léků (thalidomid, bortezomib a lenalidomid) kombinovaný nejméně s glukokortikoidy a alkylačním cytostatikem (melfalan, cyklofosfamid), v řadě režimů i s dalšími cytostatiky, antracykliny a novými léky. Autologní transplantace patří stále mezi standardní vysoce účinné postupy, zatímco alogenní transplantace patří stále mezi postupy doporučené ke zkoušení v rámci klinických studií, případně u vysoce rizikových nemocných v relapsu nebo progresi po předchozím zklidnění onemocnění indukční léčbou. V tomto sdělení stručně shrnujeme současné moderní postupy, které by dále mohly posunout výše uvedené standardní postupy a dlouhodobé léčebné výsledky u mnohočetného myelomu.

1789.

Monoterapie nízkodávkovaným thalidomidem - možnost indukční léčby mnohočetného myelomu u seniorů

Maisnar Vladimír, Machálková Kateřina, Radocha Jakub, Široký Oldřich, Malý Jaroslav

(*II. interní klinika - oddělení klinické hematologie, FN a LF UK, Hradec Králové*)

Úvod: Thalidomid je jedním z „nových léků“ mnohočetného myelomu (MM). Jeho imunomodulační aktivita a řada dalších účinků byla prokázána jako efektivní v léčbě pokročilého a refrakterního onemocnění, od počátku roku 2008 bylo v České republice schváleno jeho používání i v rámci primoterapie. Léčba MM ve skupině nemocných starších 75 let často představuje problém daný špatným status performance, četnými komorbiditami a dalšími limitacemi použití systémové chemoterapie. Cílem naší prezentace je upozornit na možné využití monoterapie thalidomidem v této indikaci. Pacienti a metody: V roce 2007 jsme publikovali výsledky retrospektivní studie zaměřené na efektivitu monoterapie nízkodávkovaným thalidomidem u nemocných s relabujícím MM (*Eur J Haematol* 2007; 79: 305-309). Velmi dobré zkušenosti s tímto postupem nás v minulých letech vedli k jeho využití i v rámci primoterapie MM u nemocných, kde z různých důvodů nebylo možné použít standardní léčbu (špatný PS ve 47%, toxicita Melphalanu s Prednisoneem ve 20% případů) anebo byla neúčinná (rezistence na MP ve 33% případů). Celkem byla monoterapie thalidomidem podána 15 nemocným (7 mužům a 8 ženám) s mediánem věku 77 let (rozmezí 71-85 let). U 14 (93%) nemocných byla použita dávka 100mg thalidomidu denně, u jednoho nemocného pak 1x 100mg ob den. Medián délky podávání byl 10 měsíců (rozmezí 2-37 měsíců). Výsledky: Efekt léčby byl hodnotitelný u 14 (93%) nemocných. Léčebná odpověď typu PR a lepší (ORR) byla zaznamenána u 4 (29%) nemocných (1x VGPR a 3x PR), u jednoho nemocného bylo dosaženo MR (tj. OBR 36%). U 4 nemocných byla léčebná odpověď vyhodnocena jako stabilní onemocnění a u 5 nemocných došlo v průběhu léčby k další progresi onemocnění. Důležité je pozorování, že u 4 nemocných, kteří na léčbu reagovali, přetrvával léčebný efekt dlouhodobě – u 3 z nich dosud po 30, 32 resp. 60 měsících sledování nedošlo k progresi, jedna nemocná zemřela bez souvislosti s MM, v době úmrtí byla v remisi již 50 měsíců. Z nežádoucích účinků byla v popředí periferní neuropatie, která byla zaznamenána celkem u 3 (20%) nemocných po 8, 31 resp. 34 měsících léčby thalidomidem. Závěr: Monoterapie thalidomidem podle nás představuje zajímavou léčebnou alternativu u nemocných, kde z různých důvodů nelze standardní léčebný postup využít nebo je neúčinný. Léčebný efekt se bohužel nedá dopředu odhadnout, nicméně, pokud se dostaví, většinou trvá dlouhodobě. Minimální toxicita nízkodávkovaného thalidomidu umožňuje jeho dlouhodobé podávání.

1746.

Bortezomib v léčbě mnohočetného myelomu v České republice

Starostka David, Walterová Lenka, Wróbel Marek, Gumulec Jaromír, Adamová Dagmar, Kessler Petr, Obernauerová Jarmila, Gregora Evžen, Špička Ivan, Schützová Miroslava, Ščudla Vlastimil, Maisnar Vladimír, Hájek Roman

(*Odd. klin. hematologie, NsP, Havířov; Odd. klinické hematologie, Krajská nemocnice, Liberec; Onkologické centrum J.G. Mendela, Nový Jičín; Ústav klinické hematologie, FN, Ostrava; Hematologicko-transfúzní odd., Slezská nemocnice, Opava; Oddělení hematologie a transfuziologie, Pelhřimov; Hematologicko-transfúzní odd., SZZ Klauďánova nem., Mladá Boleslav; Oddělení klinické hematologie, FN Královské Vinohrady, Praha; Interní klinika, VFN, Praha; Hematologicko-onkologické oddělení, FN, Plzeň; III. Interní klinika, FN, Olomouc; II. interní klinika - Oddělení klinické hematologie, FN a LF UK, Hradec Králové; Interní hematologická klinika, FN a LF MU, Brno*)

Bortezomib, má jedinečný mechanismus účinku, který je zprostředkován inhibicí proteasomu. K jeho urychlenému schválení pro léčbu mnohočetného myelomu prostřednictvím FDA a EMEA vedly výborné výsledky studií fáze II.a III. V České republice se začal bortezomib používat od roku 2005. Jeho mimořádný přínos v klinické praxi je dán největším počtem dosažených kompletních remisí, velmi rychlým nástupem účinku a druhotně zjištěným profylaktickým účinkem proti trombembolické nemoci. Výhodou režimů na bázi bortezomibu je skutečnost, že jeho farmakokinetika není signifikantně závislá na funkci ledvin a je tudíž ideálním lékem u nemocných s renálním selháním. Bortezomib je indikovaný jak v primoléčbě tak relapsu onemocnění, úhrada je však v ČR celoplošně povolena doposud jen pro relaps onemocnění. V České republice byla možnost použití bortezomibu v léčbě nemocných rozšířena v roce 2009 ze 6 na 13 center. Regionální hematologická centra sbírala první zkušenosti s léčbou, správným vyhodnocením nežádoucích účinků a optimální redukcí dávky. V regionálních centrech bylo bortezomibem v roce 2009 léčeno celkem 56 nemocných, z toho 76,8 % (43) v indikaci relapsu a 23,2 % (13) v indikaci nové diagnózy. V připravované analýze bude zhodnocen soubor nemocných léčených v regionálních centrech a výsledky budou porovnány s výsledky referenčních center, které mají zkušenosti s léčbou bortezomibem již víceletou. Analýza je provedena v rámci optimalizace použití režimů na bázi bortezomibu v České republice organizované Českou myelomovou skupinou

1655.

Efektivita kombinovaných režimů s thalidomidem a bortezomibem u 146 pacientů s prvním relapsem mnohočetného myelomu

Krejčí Marta, Adam Zdeněk, Křivanová Andrea, Pour Luděk, Zahradová Lenka, Mayer Jiří, Hájek Roman
(*IHOK, FN, Brno*)

Úvod: Nové léky, ke kterým patří například imunomodulační látky a inhibitory proteasomu, se staly důležitou součástí terapie mnohočetného myelomu (MM). Cílem sdělení je popsat efektivitu kombinované terapie s thalidomidem a s bortezomibem u 146 pacientů (pac.) s prvním relapsem MM a zhodnotit její účinnost. Metody: Klinická stádia dle Durie-Salmona při zahájení léčby 1. relapsu byla zastoupena následovně: III – 81% (119/146) pac., II – 17% (26/146) pac., I – 1% (1/146) pac.; klinická stádia dle ISS: 1 – 44% (64/142) pac., 2 – 31% (44/142) pac., 3 – 24% (34/142) pac. Renální insuficience byla přítomna u 14% (19/146) pac., medián věku byl 63 let (rozpětí 33-84). Režimy s thalidomidem (T) byly použity u 99 pac., T+alkylační látka+dexamethason u 86% (86/99) pac., T+dexamethason u 5% pac., samotný T u 8% pac. Denní dávka T byla 100-200 mg. Režimy s bortezomibem (B) byly použity u 47 pac., B+alkylační látka+dexamethason u 42% (20/47) pac., B+alkylační látka u 45% (21/47) pac., samotný B u 13% (6/47) pac.. Bortezomib byl podáván ve standardní dávce 1,3 mg/m² den 1,4,8,15. Léčebný cyklus se opakoval po 21-28 dnech do maxima 8 cyklů nebo do progresu. Medián léčebných cyklů s T a B byl 5 (rozpětí 1-8). Mezi pacienty léčenými režimy s T a B nebyly statisticky významné rozdíly v základních klinických parametrech, jako jsou věk, klinická stádia dle DS a ISS, typu M-proteinu a přítomnosti renální insuficience, rovněž léčba první linie byla srovnatelná, nebyly v ní použité nové léky. Výsledky: Celková léčebná odpověď (ORR) ve skupině s T režimy byla 56% (52/93), 12% (11/93) pac. dosáhlo CR, 20% (19/93) pac. VGPR, 24% (22/93) pac. PR, 6% (6/93) pac. MR nebo SD a 38% (35/93) pac. mělo progresi MM. Medián doby do progresu (TTP) od zahájení léčby relapsu byl 15,1 měsíce, medián celkového přežití (OS) 30,5 měsíce. Celková léčebná odpověď (ORR) ve skupině s B režimy byla 45% (17/38), 5% (2/38) pac. dosáhlo CR, 16% (6/38) pac. VGPR, 24% (9/38) pac. PR, 18% (7/38) pac. MR nebo SD a 37% (14/38) pac. mělo progresi MM. Medián TTP od zahájení léčby relapsu byl 14,5 měsíce, medián OS 34,4 měsíce. Závěr: Kombinované režimy s thalidomidem a s bortezomibem jsou efektivní v terapii prvního relapsu MM s ORR 45-56%. Mediány TTP a OS jsou podobné pro obě léčebné skupiny. Nezanedbatelná část pacientů (37-38%) má však při této léčbě progresi a další optimalizace léčebné strategie pro relaps onemocnění je nezbytná. Práce byla podpořena projektem MUNI/A/1012/2009.

1785.

Použití G-CSF u nemocných s mnohočetným myelomem léčených lenalidomidem

Sandecká Viera, Maisnar Vladimír, Gregora Evžen, Pavlíček Pavel, Ščudla Vlastimil, Minařík Jiří, Schützová Miroszlava, Špička Ivan, Straub Jan, Zahradová Lenka, Hájek Roman

(Interní hematologická klinika, FN, Bohunice, Brno; Oddělení klinické hematologie, Hradec Králové; Oddělení klinické hematologie, FN Královské Vinohrady, Praha; III. Interní klinika, FN, Olomouc; Hematologické oddělení, FN, Plzeň; I. Interní klinika, VFN, Praha)

Úvod: Lenalidomid patří mezi vysoce účinné léky-imunomodulační látky známé jako IMIDy, látky strukturou příbuzné thalidomidu. U nemocných s mnohočetným myelomem (MM) byla v klinických studiích prokázána vysoká účinnost tohoto léku v primoléčbě i u relabovaných nemocných. Na rozdíl od thalidomidu a bortezomibu lék nezpůsobuje neuropatii. Limitující toxicitou je hematologická toxicita, zvláště pak myelosuprese. Tato analýza přináší rozbor použití podpurné léčby pomocí růstového faktoru G-CSF při režimech s lenalidomidem u nemocných s MM relabujícím či refrakterním na předchozí podávanou léčbu v šesti referenčních centrech CMG v České republice (Brno, Hradec Králové, Olomouc, Plzeň, Praha VFN a FN KV). Metodika a soubor pacientů: V letech 2008-2009 byly známé údaje o spotřebě G-CSF u 160 ze 174 léčených nemocných s MM v ČR. Základní charakteristika souboru jsou uvedené v tabulce. Nemocní byli léčeni v 57,5% (100/174) dvojkombinací (nejčastěji lenalidomid s dexametazonem) nebo v 42,5% trojkombinací (nejčastěji režimem lenalidomid s dexametazonem a adriamycinem). Růstový faktor G-CSF (Neupogen 300 ug nebo 480 ug) byl podáván při myelotoxicitě st. > 2. Výsledky: Celkem u 49% (79/160) nemocných byl v průběhu léčby indikovaný a použitý G-CSF. Průměr injekcí podaný u jednoho nemocného byl 9,87 a prů-

měrná dávka spotřebovaná u jednoho nemocného byla 5982 ug. Je nutné zdůraznit, že data nejsou konečná, neboť jen 51% nemocných v hodnoceném souboru již ukončilo léčbu režimem na bázi lenalidomidu. Rozbor hematologické toxicity a taktiky léčby s využitím podpurné léčby pro udržení účinné dávky lenalidomidu bude součástí prezentace. Závěr: Lenalidomid je mimořádně účinný a dobře tolerovaný lék používaný v léčbě mnohočetného myelomu. Nejvýznamnějším nežádoucím účinkem je hematologická toxicita, zvláště myelosuprese. Použití G-CSF patří mezi standardní podpurná a v některých případech profylaktická opatření, která umožní bezpečnější použití lenalidomidu a rovněž tak udržení dávky a pokračování v léčbě bez přerušení. To je podstatné pro rychlé zklidnění onemocnění. U významně předléčených nemocných používáme rutinně G-CSF asi u poloviny nemocných při léčbě lenalidomidem.

1714.

Léčba AL-amyloidózy - retrospektivní analýza ze dvou moravských pracovišť

Adam Zdeněk, Pika Tomáš, Ščudla Vlastimil, Pour Luděk, Krejčí Marta, Zahradová Lenka, Minařík Jiří, Szturz Petr, Hájek Roman

(Interní hematologická klinika LF MU a FN, Brno; III. int. klinika LF UP a FN, Olomouc)

Od roku 2000 jsme celkem léčili 32 pacientů s depozity lehkých řetězců ve formě AL-amyloidózy, a 2 pacienty s depozity lehkých řetězců ve formě amorfních hmot. Dle histologie kostní dřevě byla plazmacelulární proliferaci zaklasifikována ve 12 případech jako mnohočetný myelom a ve 22 případech jako primární systémová AL-amyloidóza. Medián věku při stanovení diagnózy byl 63 (34-91) let. Amyloid způsobil: nefrotický syndrom u 22 (68%), renální insuficienci u 7 (22%), kardiomyopatii u 11 (34%), hepatosplenomegalii u 3 (9%), manifestní koagulopatii u 2 (12%), periorbitální hematomy 2 (6%), klinicky závažnou viscerální a somatickou neuropatii u 3 (6%), makroglosii u 2 nemocných. Léčba obsahující dexametazon v kombinaci s adriamycinem (VAD), nebo s cyklofosfamidem (CAD, CD, nebo s melfalanem - MD) byla použita u 24 osob. U 4 z nich pak zakončena vysokodávkovanou chemoterapií a v těchto 4 případech bylo dosaženo hematologické a orgánové CR s trváním remise 113+, 87+, 50, 45+ měsíců. U zbývajících 20 pacientů léčených dexametazonovými režimy s alkylační látkou či adriamycinem dosáhlo 7 hematol. CR a VGPR, ve 2 případech s kompletní orgánovou léčebnou odpovědí a ve 5 případech s parciální orgánovou odpovědí. U dalších 7 pacientů byla dosažena hematol. PR bez orgánové léčebné odpovědi. Kombinace thalidomidu, dexametazonu a cyklofosfamidu (CTD) byla použita u 8 pacientů. Dva z těchto pacientů nedokončili ani dva cykly (1x nezvladatelná obstrukce, 1x exitus). Celkem 6 pacientů absol-

Celkový počet pacientů	174
Počet předchozích linií	
1	12 (6.9%)
2	42 (24.1%)
3	63 (36.2%)
4	30 (17.2%)
5	14 (8.0%)
6	7 (4.0%)
7	6 (3.4%)
Počet předchozích linií	
průměr (SD)	3.2 (1.4)
medián	3.0
min-max	1.0-7.0
Léčba	
Bortezomib	152 (87.4%)
Thalidomid	143 (82.2%)
Lenalidomid	6 (3.4%)
řádné nové léky* v předchozí léčbě	9 (5.2%)
Režim léčby	
dvojkombinace	100 (57.5%)
trojkombinace	74 (42.5%)

vovalo nejméně 4 cykly této léčby, 2x bylo dosaženo hemat. CR a 3x PR. Léčba kombinací s bortezomibem byla použita ve 4 případech a u všech byla dosažena hematol. CR a v jednom případě odstup od léčby dovolu- je vyhodnotit také orgánovou léčebnou odpověď jako CR. Celkem 14 pacientů zemřelo s mediám přežití 6 měsíců (1-33), zatímco 18 pacientů žije s mediánem sledování 30 měsíců (7-124). Více než 5 let žijí 4 (12 %) pacienti. Závěr: Pacienti s AL-amyloidózou přicházejí často se značným poškozením organismu, kdy tolerance léčby je nízká a křečcí nemocní umírají dříve, než se může dostavit efekt léčby. Časné stanovení diagnózy umožní podávat agresivní léčbu s vyšší pravděpodobností dosažení hematologické CR, protože pouze při dosažení hematol. CR je naděje na pozdější orgánovou léčebnou odpověď a tedy i na zlepšení kvality života a dosažení dlouhodobějšího přežití. Klíčová slova: AL-amyloidóza Podpořeno projektem MUNI/A /1012/2009

1696.

Výsledky alogenních transplantací krvetvorných buněk u pacientů s mnohočetným myelomem – zkušenost centra.

Vokurka Samuel, Koza Vladimír, Jindra Pavel, Karas Michal, Steinerová Kateřina, Lysák Daniel, Schützová Mirosłava, Svoboda Tomáš, Vozobulová Věra, Švojkrová Mája, Mohammadová Lekaa, Jungová Alexandra, Hrabětová Marcela
(Hematologicko-onkologické odd. Fakultní nemocnice, Plzeň)

Úvod: Význam alogenních transplantací krvetvorných buněk (SCT) u pacientů s mnohočetným myelomem je s ohledem na vysokou mortalitu, morbiditu a zatížení potransplantačními relapsy velmi diskutabilní otázkou. Alogenní SCT však současně představuje léčbu s kurativním potenciálem. Cíl: ověření výsledků aloSCT u pacientů s mnohočetným myelomem. Metodika: retrospektivní analýza jednoho centra, statistika GraphPad InStat - Statistica Software, Kaplan-Meier, log-rank test. Soubor: n=18, věk 52 (39-63) let, 4x transplantace protokol Bu/CY2 v 1997-2002, 14x protokol FLU/MEL v 2001-2008, příbuzenský dárce 55%, doba od diagnózy do SCT 2,1 (0,5-9) let, nepříznivá genetika 62%, počet předchozích sérií chemoterapie včetně autologní SCT 4 (1-7). Výsledky: medián doby sledování od SCT 50 (11-61) měsíců. Protokol Bu/CY2 (n=4) mortalita 100% s mediánem OS 3 (1-6) měsíce. Protokol FLU/MEL (n=14) 93% léčebných odpovědí, 43% kompletních remisí, transplantační mortalita 21%, non-relaps mortalita 43%, pravděpodobnost dvouletého a čtyřletého přežití bez relapsu a progresu (PFS) 34% a 17% a pravděpodobností přežití pět let (OS) po transplantaci 47%, akutní GVHD 29%, chronická GVHD 46%. U všech pacientů s relapsem (3x) nebo progresí (5x) po SCT byla zahájena další léčba zahrnující thalidomid nebo bortezomib. Závěr: Naše výsledky odpovídají zkuš-

nostem publikovaným v dostupné literatuře. Protokol FLU/MEL lze považovat za účinnou předtransplantační přípravu. Prospěch z alogenní SCT lze spíše očekávat u pacientů s minimální nádorovou zátěží a bez většího předlčení. Provedení alogenní SCT by mělo být zvažováno u mladých pacientů s nedostatečnou nebo časně selhávající odpovědí na moderní léčebné protokoly obzvláště v případě dostupnosti HLA identického sourozence. U většiny pacientů lze očekávat relaps myelomu, nicméně je možnost další úspěšné léčby moderními léky. Výzvou je využít potenciál alogenní SCT a imunomodulační efekt bortezomibu, thalidomidu nebo lenalidomidu.

CML/MYELOPROLIFERACE

1839.

Registr nemocných s esenciální trombocytémií a jinými myeloproliferacemi s trombocytémií léčených Anagrelidem k prvnímu čtvrtletí roku 2010

Penka Miroslav, Schwarz Jiří, Ovesná Petra, Indrák Karel, Doubek Michael, Dulíček Petr, Pospíšilová Dagmar (Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice, Brno; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Institut biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity, Brno; Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc; Interní hemato-onkologická klinika LF MU a FN, Brno; Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky LF UK a FN, Hradec Králové; Dětská klinika FN, Olomouc; Česká pracovní skupina pro myeloproliferativní choroby)

Úvod: anagrelid je v ČR používán dle doporučení České pracovní skupiny pro myeloproliferativní choroby k léčbě trombocytémie provázející chronické myeloproliferace – především esenciální trombocytémií a opakovaně byly již také prezentovány výstupy z Registru nemocných léčených Anagrelidem®, naposledy vloni (Vnitřní lékařství. 2009; 55/11: I- XII). Metodika: zmíněný registr je veden od r. 2005 a od počátku je jeho cílem stanovení podrobného klinického a laboratorního profilu nemocných. Během svého užívání doznává struktura Registru významných změn, které reagují na výstupy získávané z každé dosavadní analýzy dat. Také vyplněnost databáze se rok od roku zvyšuje a v některých položkách dosahuje až 97 %. Doba sledování u nejdéle sledovaných nemocných činí 72 měsíců. Výsledky a diskuse: V databázi Registru jsou k dubnu 2010 údaje o 717 nemocných. Z toho bylo hodnoceno 672 nemocných s diagnózou chronické Ph negativní myeloproliferativní choroby. Letošní analýze byli podrobeni pouze nemocní s esenciální trombocytémií, polycytemia vera a primární myelofibrózou. Jedná se o 418 žen a 254 mužů s věkovým mediánem 50 let. Na rozdíl od prvních let představují 2/3 souboru sledovaných nepředlčení nemocní, což znamená, že se pacienti dostávají brzy na specializovaná pracoviště. Častěji se také setkáváme s kombinovanou léčbou Anagrelidem® a to zejména u starších nemocných. Ze sledovaných rizikových parametrů předchorobí narůstá výskyt hyper-

tenze, z laboratorných ukazateľů se JAK2 mutace zjišťuje u cca poloviny nemocných a zatímco nějakou formu trombotické diatézy zjišťujeme v anamnéze u 7 – 10 % nemocných, pak s krvácením se setkáváme u 1 – 5 % zaregistrovaných pacientů. Oproti předchozím letům se jedná o pokles, což je velmi pravděpodobně dáno rychlejším zachytem nemocných v bezpříznakovém období. Z hlediska léčby dosahujeme u sledovaných nemocných rychlé odpovědi, přesto do roka nedosahuje odpovědi 16.3 % pacientů. Dávka Anagrelidem® se sice zvyšuje, ale ani v této skupině nepřesahuje v průměru 2.38 mg na 24 hodin. Ke komplikacím dochází v prvním roce léčby u 6.2 % nemocných, z toho k trombotickým příhodám v cca 2.5 %, zatímco k (malým) krvácivým projevům ve 4 % případů. Závěr: Z údajů vyplývá, že stále nedosahujeme v ročním horizontu u určitého procenta nemocných léčebné odpovědi. I přesto, že výsledky péče v analyzovaných údajích vyznívají rok od roku příznivěji, přetrvávají rezervy v intenzifikaci léčby, které Registr pomáhá odhalit.

1729.

Vztah genetických mutací a morfológie kostnej drene pacientov s myeloproliferatívnymi neopláziami

Marcinek Juraj, Burjanivová Tatiana, Balhárek Tomáš, Szépe Peter, Plank Lukáš

(Ústav patologickej anatómie a Konzultačné centrum hematopatológie Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského, Martin; Ústav molekulárnej biológie Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského, Martin)

ÚVOD: Diagnostika myeloproliferatívnych neoplázií (MPN) je založená na korelácii morfológie kostnej drene (KD), klinicko-laboratórných údajov a výsledkov genetických analýz. Pri MPN najčastejšie nachádzame mutáciu JAK2V617F, postihujúcu takmer všetky prípady pravej polycytémie (PV) a 50-60% pacientov s primárnou myelofibrózou (PMF) a esenciálnou trombocytémiou (ET). Pri MPN nachádzame aj mutácie TET2 génu, resp. mutácie exónu 12 u pacientov s PV a mutácie trombopoetínového receptora u pacientov s PMF a ET. Ich dôkaz je súčasťou dg. kritérií MPN, aj keď v bližšej subtypizácii týchto ochorení hrá hlavnú úlohu bioptické vyšetrenie KD. V našej práci sme korelovali prítomnosť niektorých týchto mutácií s morfológiou KD. **METÓDY:** Súbor pozostával zo 64 prípadov klinicky potvrdenej PV resp. ET a 70 prípadov PMF. Morfológia KD bola analyzovaná semikvantitatívne so zameraním na hodnotenie morfológických znakov kľúčových pre diferenciálnu diagnostiku MPN. Mutácia JAK2V617F bola analyzovaná metódou alelovo-špecifickej PCR z DNA izolovanej z parafrímových blokov KD, mutácie exónu 12 aj sekvenačnou analýzou. **VÝSLEDKY:** Morfológia KD väčšiny prípadov zodpovedala klinicky stanovenej dg. MPN, často s prímiesou málo početných atypických morfológických znakov, spochybňujúcich klinicky stanovený typ MPN. V časti prípadov závažnosť týchto atypických znakov fa-

vorizovala iné MPN. JAK2V617F sme potvrdili u 94% pacientov s PV, 64% pacientov s ET a v 73% prípadov PMF (doteraz analyzovaných 62 pacientov). V prípadoch ET a PMF sme nezaznamenali zreteľné rozdiely v morfológii KD vzhľadom na prítomnosť JAK2V617F. 2 pacienti s PV bez JAK2V617F vykazovali mutáciu exónu 12 (R541-E543delinsK, H538-K539delinsF). Morfológia KD týchto pacientov pripomínala obraz typický pre PV, avšak s absenciou niektorých znakov typických pre PV (morfológia mgk, aktivácia granulopoézy). **ZÁVER:** Podobne ako výsledky iných štúdií, ani my sme nepotvrdili jednoznačný vplyv uvedených mutácií na morfológiu KD pacientov s MPN. Možno to odôvodniť jednak rôznou mierou prítomnosti mutácie JAK2V61F u jednotlivých pacientov s MPN, celým radom ďalších mutácií pri týchto ochoreniach a najmä absenciou kauzálnej mutácie, zodpovednej za vznik MPN. Do úvahy treba brať aj značný vplyv vonkajších (terapia) či vnútorných faktorov (progres MPN, iné sprievodné ochorenia) ovplyvňujúcich morfológiu KD. Napriek tomu je analýza genetických mutácií kľúčovou súčasťou diagnostického algoritmu MPN. Práca podporená Grantom VEGA č.1/034/10

1709.

Imatinib v prvej linii léčby pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) v chronické fázi (CP). Můžeme srovnat výsledky z reálné klinické praxe s výsledky dosaženými v klinických studiích?

Žáčková Daniela, Klamová Hana, Dušek Ladislav, Mužík Jan, Dobešová Blanka, Ryšavá Jana, Ráčil Zdeněk, Machová Poláková Kateřina, Pospíšil Zdeněk, Doubek Michael, Dvořáková Dana, Jurček Tomáš, Razga Filip, Moravcová Jana, Cetkovský Petr, Trněný Marek, Mayer Jiří
(Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Masarykova univerzita, Brno; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Institut biostatistiky a analýz, Masarykova univerzita, Brno; Ústav matematiky a statistiky, Masarykova univerzita, Brno)

Imatinib (IM) zásadne zmenil léčbu CML a dramaticky zlepšil její prognózu, zejména pak u pacientů v CP. Nejrobustnějším zdrojem dat o účinnosti IM v první linii léčby CP-CML je mezinárodní studie IRIS. Dat z každodenní klinické praxe je stále nedostatek. Cílem práce bylo zhodnotit účinnost IM v 1. linii u neselektované populace pacientů s CP-CML a porovnat výsledky z reálného života s výsledky klinických studií. Databáze pacientů v CP-CML léčených IM v 1. linii v definovaném regionu, zvaná INFINITY, byla podrobena analýze respektující platná doporučení European LeukemiaNet (ELN). Hlavním cílem bylo zhodnotit podíl kompletních hematologických (CHR), kompletních cytogenetických (CCgR) a velkých (MMolR) a kompletních (CMolR) molekulárních odpovědí. Dále pak odhad pravděpodobnosti přežití celkového (OS), bez transformace do pokročilé fáze (TFS), bez progresu definované dle studie IRIS (PFS), bez události, respektující i selhání IM dle kritérií ELN

a jeho vysazení z důvodu intolerance (EFS), a bez změny na jinou léčbu (alternative treatment-free survival, ATFS). Ve snaze ještě lépe zachytit reálnou situaci pacientů, kteří při neúspěchu IM mohou profitovat z léčby novými účinnými léky, jsme vymodelovali i tzv. current leukemia free survival (CLFS). Celkem bylo zhodnoceno 152 pacientů (medián 55 let; 20-77; 69 mužů a 83 žen) léčených IM v období let 2003–2009 s mediánem sledování 31,2 měsíců (5,7-68,1). Odhadovaná kumulativní incidence CHR, CCgR, MMolR a CMolR ve 4 letech byla 95,3%, 80,6%, 65,4% a 39,2%, respektive. Odhadovaná pravděpodobnost OS, TFS, PFS, EFS a ATFS ve 4 letech byla 91,5%, 88,4%, 78,1%, 60,7% a 67,6%, respektive. Nehematologická a hematologická toxicita všech stupňů se vyskytovala u 78,3% a 62,5% pacientů, resp. Toxicita st. 3/4 však byla přítomna jen u 8,5% a 12,5% pacientů, resp. Celkem 36 pacientů (23,7%) trvale ukončilo léčbu IM v mediánu 16,1 měsíců (1-51): 4 podstoupili elektivní alogenní SCT, 9 pacientů IM netolerovalo, selhání a/nebo progresse byly důvodem ukončení ve 22 případech a v jednom kombinace selhání a intolerance. Celkem 7 pacientů zemřelo (4,6%); 3 z nich na progresi CML. Na souboru pacientů léčených mimo klinické studie avšak ve vysoce specializovaných centrech jsme potvrdili velmi dobrou účinnost a tolerabilitu IM. Nicméně, při podrobnějším výběru událostí pro kalkulaci EFS je nadhodnocení analýzy přežití bez události ve studii IRIS zjevné. Podpořeno CELL – The Czech Leukemia Study Group for Life a grantem MZOUHKT2005.

1712.

Sledování monitorace u pacientů s CML léčených TKI 2.generace, data z registru CAMELIA

Jungová Alexandra, Koza Vladimír, Voglová Jaroslava, Sninská Zuzana

(Hematologicko onkologické oddělení FN, Plzeň; 2.IK, Hradec Králové; FN, Bratislava)

Úvod: Tyrosinkinázové inhibitory 2. generace (dasatinib, nilotinib) jsou používány od r. 2006 jako následná léčba při selhání léčby imatinibem (progrese CML či toxicita léčby). Zároveň s tímto výrazně poklesl počet indikací k alogenní transplantaci kostní dřeně. Dle EBMT dat ale zároveň vzrůstá počet aloSCT indikovaných pro akcelerovanou fázi či blastický CML. Soubor nemocných a metodika: V registru CAMELIA je zařazeno cca 1000 pacientů s CML. K sledování bylo analyzováno 796 pacientů z 8 center (data k 12/2009), z nichž na TKI 2.generace je nyní 81 pacientů. Mladších nemocných ve věku do 65 let bylo 35 (16 mužů- 45 %, 19 žen- 55 %, medián věku 59,8 roku). Průměrná doba podávání TKI 2. druhé generace byla 26,1 měsíce. U tohoto souboru byly analyzovány: věk nemocného, doba podávání TKI, dosažení či nedosažení hematologické, cytogenetické a molekulárně genetické odpovědi, včetně kvantifikace bcr-abl, zahájení vyhledávání kompatibilního dárce a počet provedených transplantací. Výsledky: K 12/2009 žije 32 nemocných (91%), 2 paci-

enti zemřeli v důsledku transformace nemoci (5 %), 1 nemocný ztracen ze sledování (4%). Ze zbývajících 32 pacientů mladších 65 let je v CCyR 10 pac. (31 %), MCyR dosáhlo 7 pac., mCyR 5 pac. a MMoR 7 pac. Dále 3 pacienti nedosáhli žádné remise ani po 8, 10 a 30 měsících podávání . Do 18 měsíců nedosáhlo CCyR 8 nemocných a u 5 pacientů nebyla cytogenetika provedena a není dosaženo CMoR. Vyhledávání dárce od r. 2009 dosud pouze u 7 pac. z indikace CML a z toho neprovedena žádná alogenní transplantace . Diskuse: Díky generačně nové léčbě inhibitory TKI není dnes aloSCT v chronické fázi CML (až na výjimky) indikována. Při selhání imatinibu je doporučováno podání inhibitorů 2. generace, ovšem za pečlivé monitorace léčebného výsledku. Při nedostatečné odpovědi v určitém časovém intervalu či při znovuobjevení se nemoci by mělo být zahájeno okamžité vyhledávání vhodného dárce, případně zahájena příprava k transplantaci. Rostoucí počet aloSCT indikovaných pro akceleraci a blastický zvrát CML v databázi EBMT vzbuzuje podezření na nadměrný entuziasmus v inhibitory TKI vedoucí k pozdní indikaci transplantace. Výsledky z registru CAMELIA vzbuzují podezření stejné. Ani jeden z 13 nemocných bez náležité odpovědi nebyl transplantován i přes pravděpodobnost, že minimálně 3-4 nemocní museli mít dárce příbuzného.

1766.

Frekvence mutací v BCR-ABL kinázové doméně u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) léčených tyrozinkinázovými inhibitory – zkušenosti IHOK FN Brno

Jurček Tomáš, Rázga Filip, Žáčková Daniela, Dobešová Blanka, Ráčil Zdeněk, Ježíšková Ivana, Dvořáková Dana, Mayer Jiří

(Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematoonkologická klinika, FN a LF Masarykovy univerzity, Brno; Interní hematoonkologická klinika, FN a LF Masarykovy univerzity, Brno)

Bodové mutace v BCR-ABL kinázové doméně (KD) patří k hlavním mechanismům vzniku rezistence na léčbu tyrozinkinázovými inhibitory (TKI). Dnes je známo více než 90 mutací v 55 aminokyselinách, kdy 15 z těchto mutací reprezentuje více jak 85% všech případů. Frekvence výskytu mutací se liší v jednotlivých fázích CML. Zatímco v chronické fázi (CP) je výskyt mutací poměrně nízký, tak v akcelerované fázi (AP), či blastickém zvrátu (BC) je detekce mutací mnohem vyšší, což je zřejmě úzce spjata s celkovou genomickou nestabilitou. Na našem pracovišti detekujeme mutace pomocí nested RT-PCR, kdy je v prvním kole amplifikována část genu BCR-ABL a v druhém pak úsek kódující ABL KD, který je následně přímo sekvenován. V období 2002-2009 byla provedena mutační analýza celkem u 92 pacientů (CP 76, AP 7, BC 9) a mutace byla detekována u 30 (32,6%) z nich, kde v CP bylo 32,9%, v AP 0,0% a v BC 55,6%. U těchto pacientů bylo zachyceno celkem 39 mutací postihujících 15 různých aminokyselin, přičemž u šesti pacientů by-

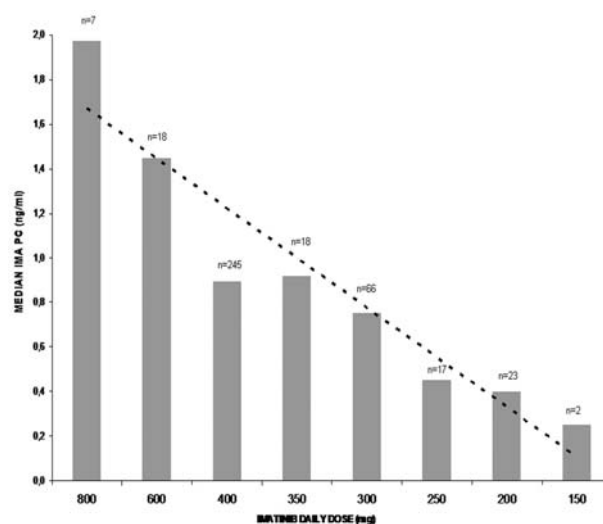
lo detekováno více mutací současně. Zastoupení detekovaných mutací bylo následující: M244V 7,7%; G250E 7,7%; Q252H 5,1%; Y253H 12,8%; E255K 10,3%; E279K 2,6%; T315I 25,6%; F317L 5,1%; M351T 7,7%; E355G 2,6%; F359C 2,6%; L387M 2,6%; H396R 2,6%; K419E 2,6% a F486S 2,6%. V době stanovení mutace bylo 60,0% pacientů v progresi onemocnění. Typ progresie byl tento: ztráta kompletní hematologické odpovědi (CHR) 44,4%; ztráta velké cytogenetické odpovědi (MCgR) 11,1%; BC 16,7%; a jiné 22,2%. Změnu terapeutické intervence představovalo: navýšení dávky imatinibu 23,3%; změna na dasatinib 36,7%; nilotinib 10,0%; hydroxyureu 6,7%; transplantace 6,7% a jiné 13,3%. Změnou terapie bylo dosaženo: CHR 16,7%; kompletní cytogenetická (CCgR) 10,0%; částečná cytogenetická (PCgR) 3,3%; jiná CgR 3,3%; velká molekulární (MMolR) 6,7%; kompletní molekulární (CMolR) 6,7%, zatímco progresie zůstala u 26,7%. Celkem u 16,7% pacientů se následně vyvinula nová mutace. Analýza popsaného souboru pacientů potvrdila řadu publikovaných dat, jako je incidence mutací či frekvence jejich zastoupení. Dále se ukazuje, že záchyt mutací nemusí nutně souviset s progresí nemoci (60,0% s vs 40,0% bez progresie). Nejčastější změnou léčby byl přechod na TKIs druhé generace (téměř 50%). Nepřehlédnutelný však zůstává fakt, že i přes značnou léčebnou efektivitu TKIs až 26,7% pacientů po změně léčby dále progredovalo. Podpořeno grantem MŠMT ČR, No. MSM0021622430

1645.

Imatinib (IMA) plasma concentration (PC) monitoring and its correlation with treatment response in chronic myelogenous leukemia (CML): a single centre experience

Ráčil Zdeněk, Vyskočilová Markéta, Maláškova Ludmila, Rázga Filip, Žáčková Daniela, Mayer Jiří
(*Interní hematoonkologická klinika LF MU a FN, Brno; Oddělení klinické biochemie a hematologie, FN, Brno*)

Background: Correlation between the probability of therapeutic response in patients with CML treated with IMA and IMA PC was recently described, suggesting that IMA trough PC levels should be above 1.04 ng/ml. However data from large group of „real-life“ CML patients (out of clinical trials), where IMA PC monitoring is performed, are still lacking. **Aims:** To evaluate correlation of IMA trough PC with daily IMA dose, treatment response and influence of alfa1-Acid glycoprotein (AGP) on IMA PC in „real-life“ group of CML pts. **Methods:** HPLC was used for IMA trough PC monitoring. **Results:** Between 9/2008 and 1/2010 IMA PC have been detected in 397 samples from 108 pts. (median: 3 samples/ pt., range: 1-22). Median IMA daily dose at the time of monitoring was 400 mg (range: 150-800 mg). Median duration of IMA treatment at the time of sampling was 28 months (range: 0.5-99). Median IMA PC for pts. with 24 h. IMA dosing was 830 ng/ml (n = 83 pts.) and for 12 h. dosing 1450 ng/ml (n = 14 pts.). Mean inter-patient and intra-patient variability of IMA PC was 31% and



17%. There was a clear correlation between daily dose of IMA and IMA PC (Figure). IMA PC below suggested level 1.0 ng/ml was measured in 57% of samples and this percentage decreased with daily dose of IMA (65% in 300 mg/day group, 60% in 400 mg/day, 10% in 600 mg/day and 0% in 800 mg/day group) 67 pts. with IMA as first line therapy were further analyzed regarding correlation of their IMA PC and achieved cytogenetic response. Medians of all samples obtained from single pt. were used for analysis. Any significant difference was found between medians of IMA PC in pts. with ant without CCyR – 0.938 ng/ml vs. 0.836 (p=0.560, Mann-Whitney) Finally our analysis found statistically significant correlation between IMA PC and AGP concentration in plasma at the time of sampling – for different ranges of AGP concentrations the median of IMA PC were as follows: AGP < 0.5 mg/ml - IMA PC 0.780 ng/ml, AGP 0.5 to 1.0 mg/ml - IMA PC 0.940 ng/ml, AGP 1.0 to 1.5 mg/ml – IMA PC 1.10 ng/ml, AGP > 1.5 mg/ml – IMA PC 1.24 ng/ml (p < 0.001) (Kruskal-Wallis ANOVA). **Summary/conclusions:** Our analysis did not found any correlation between IMA PC and cytogenetic response in patients with CML treated with IMA as first line therapy. On the contrary, our analysis showed that the resulting PC IMA depends on the current administered dose of IMA and the current AGP concentrations of AGP at the time of sampling.

1795.

Plazmatické hladiny imatinibu (IPL) nekorelují u nemocných s CML s odpovědí na léčbu, ale lze je úspěšně použít u individuálních pacientů k úpravě dávkování

Faber Edgar, Friedecký David, Mičová Kateřina, Skoumalová Ivana, Rohoň Peter, Rožmanová Šárka, Divoká Martina, Jarošová Marie, Indrák Karel, Adam Tomáš
(*Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Laboratoř dědičných metabolických poruch, FN, Olomouc*)

Úvod: Dvě velké a několik menších studií prokázaly, že IPL korelují s cytogenetickou a molekulární odpovědí

(CO a MO) u nemocných s CML léčených imatinibem (IM). Na druhé straně jiní autoři závislost nepotvrdili. V doporučeních ELN 2009 nebyly IPL komentovány. Cíle: Stanovení IPL se staly na našem pracovišti součástí monitorování pacientů s CML od roku 2007. Všichni nemocní podepsali před odběry informovaný souhlas. Metody: IPL byly měřeny vysoce citlivou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií s použitím UHPLC UltiMate 3000 RS (Dionex, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem API 4000 (Applied Biosystems, USA). Vzorek byl vyhodnocen pokud byl nemocný léčen IM alespoň 18 měsíců pro zhodnocení CO a MO, nebyl jiný důvod suboptimální odpovědi nebo selhání a vzorek byl odebrán alespoň jeden měsíc od zahájení léčby a 24 ± 6 hodin po požití léku. Nemocní předléčení interferonem byli hodnoceni zvlášť. Ke statistickému hodnocení byly použity Spearmanova korelační analýza a Mann-Whitneyho U-test. Výsledky: k analýze bylo dostupných 553 vzorků od 112 pacientů s CML (45 žen, 55 z nich předléčených interferonem). Medián věku byl 56 let (22-81) doba sledování 72 měsíců (18-236). 81 % pacientů dosáhli kompletní CO a 58 % velkou MO. Přes statisticky významnou korelaci mezi dávkou IM a IPL $CC=0,336$; $p<0,001$ jsme nezjistili statisticky významnou asociaci mezi IPL a pravděpodobností dosažení optimální CO nebo MO. Zjistili jsme vysokou inter-individuální IPL variabilitu v rozmezí 394-3133 mg/l ($n=86$, 24 ± 1 hodin po užití dávky 400 mg) a intra-individuální variabilitu (14,2 až 43,3 %; $n=82$, 24 ± 2 hodin po užití dávky 400 mg). U 2 pacientů s nízkou IPL (<900 ng/ml) vedlo zvýšení dávky ke zvýšení IPL (>2000 a >1400 ng/ml) a k dosažení optimální odpovědi. Závěry: U našich pacientů s CML jsme neprokázali jasnou korelaci mezi IPL a odpovědí na IM. Je to pravděpodobně způsobeno rozdíly ve spolupráci nemocných, biologii CML a dalších faktorech, jejichž vliv lze v běžné klinické praxi těžko eliminovat. U nemocných s vysokou intra-individuální variabilitou IPL lze vyslovit podezření na horší spolupráci. Na druhé straně jsme však prokázali, že u individuálních nemocných se suboptimální odpovědí a nízkou IPL vede zvýšení dávky IM k optimalizaci léčebné odpovědi. Práce byla podpořena granty NS9627-3, NS9949-3 MZ ČR, MSM 6198959223 a MSM 6198959205 MŠMT ČR.

EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE

1830.

Ribosomal deficiencies cause translational deregulation of genes crucial for erythropoiesis

Horos Rastislav, IJspeert Hanna, Mensah Fane, Taskesen Erdogan, Touw Ivo, Pospisilova Dagmar, Lindern Marieke (Dept. Hematology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands)

Diamond Blackfan Anemia (DBA) is a rare congenital pure red cell aplasia in which mutations in distinct ribosomal proteins (RPs) for small (40S) and large (60S)

subunit have been identified in over ~54% of patients. It remains elusive why loss of such ubiquitously expressed proteins causes a distinct erythroid phenotype. Previously, we showed that selective translation of transcripts with a complex RNA structure in the 5' untranslated region is crucial in Stem Cell Factor (SCF) dependent expansion of the early erythroid compartment. We therefore investigated if polysome recruitment of specific mRNAs is affected in erythroblasts deficient for RPs. Mouse primary erythroblasts were cultured in presence of erythropoietin, SCF and dexamethasone under serum free conditions. Knockdown of RPs was achieved using lentivirus-delivered shRNA followed by analysis of subpolysomal and polysome-bound RNA by sucrose gradient centrifugation. Subpolysomal and polysome-bound RNA fractions from 3 independent experiments were used for expression profiling. The ratio of polysome association was calculated per gene for each experiment and datasets from wt, scrambled shRNA treated, Rps19 and Rpl11 deficient conditions were compared using ANOVA with multiple testing ($p<0,05$). Downregulation of either Rps19 or Rpl11 by resulted in reduced proliferation and differentiation. Cells showed a specific reduction of the 40S and 60S ribosomal subunit upon knock down of Rps19 and Rpl11, respectively. Ratios comparisons revealed that SCF-dependent transcripts were found enriched in polyribosomes, whereas a set of mRNAs, including Bag-1 (Bcl2-associated athanogene 1) and Csde1 (cold shock domain containing E1) were lost from translating polyribosomes upon RP deficiency. We next analyzed selective translation of these genes in erythroblasts from DBA patients. Protein expression of identified target genes (BAG1, CSDE1) was reduced in erythroblasts derived from DBA patients as compared to controls, whereas their transcript level on total mRNA remained unchanged. Further investigation showed that loss of Bag1 and Csde1 inhibited erythroid differentiation. In conclusion, we identified transcripts whose translation is selectively affected in RP deficient erythroblasts cultured from mouse fetal livers or DBA patients. We propose that the erythroid phenotype in DBA patients is caused by defective translation of a specific set of mRNAs that are essential for erythroid development.

1809.

Erythropoietin therapy in a patient with defective erythroid iron utilization improves survival of mutant erythroid progenitors

Horváthová Monika, Pospíšilová Dagmar, Vondráková Jana, Divoký Vladimír (Ústav biologie LF UP, Olomouc; Dětská klinika FN, Olomouc; Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc)

Erythroid iron utilization relies on a receptor-mediated endocytosis of holotransferrin bound to a transferrin receptor and subsequent efflux of iron from endosomes by divalent metal transporter 1 (DMT1). Homozygous or

compound heterozygous mutations in DMT1 are associated with hypochromic microcytic anemia. We have performed comprehensive in vitro analysis using erythroid progenitors of the first DMT1 mutant (1285G>C DMT1) patient who exhibited severe anemia (hemoglobin (Hb) 74 g/l). Hematopoietic colony assay revealed defective growth of patients' erythroid colonies (BFU-Es), which could be rescued by iron saturated salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone - Fe-SIH, which delivers iron directly to the mitochondria without any need of transport proteins. The rescue was dependent on the presence of high erythropoietin (EPO) doses. Based on this result, recombinant human EPO (rh-EPO) was administered to our patient. rh-EPO treatment (2.4 K_U/kg once a week for two months) significantly increased the patient's Hb level (91 g/L) and improved her overall condition. The interruption of rh-EPO therapy led to immediate decrease in Hb level (to 74 g/L) within a month. In a retrospective study we have analyzed frozen mononuclear cells collected before initiation and two months after initiation of EPO therapy with the aim to characterize the molecular mechanisms responsible for the success of EPO treatment. Hematopoietic colony assay revealed significant increase in plating efficiency and cellularity of the patient's BFU-Es after the therapy. We subsequently performed TUNEL assay and immunofluorescence analysis with BCL-XL antibody in cytospined BFU-E colonies and showed decreased rate of apoptosis in post-treatment BFU-Es in comparison to pre-treatment BFU-Es. Interestingly, phosphorylation of the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) remained unchanged. Since eIF2 is highly phosphorylated in iron-deprived erythroid cells, it is unlikely that EPO treatment simply increased iron utilization in erythroid cells. Consistently all other hematological or iron status parameters, except Hb levels, remained unchanged. To summarize, we propose that the success of EPO therapy in our DMT1 mutant patient resulted from improved survival of the patient's erythroid progenitors. Grant support: Czech Grant Agency, grant No. P305/10/P210; Ministry of Health, Czech Republic, grant No. NS/9935 - 2; Palacky University Internal Grant No. LF_2010_013.

1703.

Atransferinémia. Patofyziológia, diagnostika, terapia a popis prípadu

Lipšic Tomáš (HTO, Klinika laboratórnej medicíny - OÚSA, VŠZaSP, Bratislava)

Atransferinémia – vzácná porucha metabolizmu železa (Fe), môže byť vrodená (CAT), alebo získaná (AT). Vrodená atransferinémia je dedičná autosomálne recesívna porucha génu pre transferín. Následne dochádza k nedostatku funkčného železa, insuficientnej erytropoéze, poruchám imunity a rastu, nadbytku železa v tkanivách a k ich toxickému poškodeniu. Homozygotná forma je charakterizovaná absenciou transferínu, nízkymi hodnotami železa, väzobnej kapacity transferínu, transferínu (Trf) a vysokými

mi hodnotami feritínu, výraznou hypochrómnu mikrocytovou anémiou (MHA) a hemosiderózou (HS). Nadbytok železa má za následok poškodenie pečene, myokardu, pankreasu, endokrinných žliaz a kĺbov - kam sa predilekčne prebytok Fe ukladá. Doteraz bolo popísaných 11 prípadov (9 rodín), genetickou analýzou boli potvrdené 4 prípady. Diagnostika spočíva v základnom hematologickom vyšetrení, vyšetrení komplexného profilu železa a bielkovín (transferínu) a v DNA analýze. Stav nadbytku Fe (HS) detegujú špecializované laboratórne, zobrazovacie a histologické metódy. V súčasnosti jediná efektívna terapia je cyklické podávanie purifikovaného humánneho transferínu v intervaloch daných jeho poločasom. Pokiaľ už došlo k nadbytku železa v tkanivách je indikovaná chelatačná terapia. Pacientku s homozygotnou formou defektu génu Trf sledujeme 44 rokov od veku 2 mesiacov (1966), kedy sa prezentovala s výraznou MHA a opakovanými infekciami. Bola opakovane hospitalizovaná a liečená transfúziami erytrocytov, antibiotikami. Postupne sa manifestovali poruchy rastu, endokrinných orgánov, pečene a srdca. V r. 1973 bola stanovená diagnóza CAT. Bola zahájená aplikácia humánneho Trf 1x/mesiac (1973-81), neskôr 2x/mesiac (1982-99) a následne došlo k úplnej úprave anémie. Diagnóza bola potvrdená analýzou DNA (2004). Od r. 1999 pre potvrdený nadbytok železa bola indikovaná chelatačná terapia. Ani komplexná terapia neupravila ireverzibilné poškodenie tkanív – pacientka má hepatomegáliu, kardiomyopatiu, panhypopituitarizmus a artropatiu. Pri pravidelnej substitúcii Trf mala pacientka v rokoch 1999-2010 normálne hodnoty hemogramu a feritínu, v profile železa pretrvávajú atransferinémia, orgánové a funkčné zmeny sú len čiastočne upravené. Ide o druhý diagnostikovaný prípad na svete a prvý liečený purifikovaným Trf. Dôležitosť včasnej diagnostiky a substituúnej liečby je jednoznačná.

1824.

Intronic LINE-1 insertion in the β -globin gene causes β -thalassemia due to aberrant splicing, nonsense-mediated decay and decreased rate of β -globinL1 allele transcription

Piterková Lucie, Kučerová Jana, Indrák Karel, Divoký Vladimír

(Ústav biologie, LF, UP, Olomouc; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Beta-thalassemia is a common hereditary hemoglobin disorder characterized by quantitative reduction of functional beta globin chains. The patients, mother and daughter of Ukrainian descent exhibited typical laboratory features of beta-thalassemia trait. Molecular analyses revealed that the full-length (6 kb) retrotransposon LINE-1 (L1) was inserted in the antisense orientation into the intron-2 of the beta globin gene (collaboration with Dr. J. Prchal, Salt Lake City, UT). The total level of expression of the affected beta globin gene transcript was reduced to 10-15% of the total beta globin mRNA and thus le-

ading to beta+thalassemia. Based on recently published data we hypothesize that RNA production of mutated gene was affected by the combination of several events. We demonstrated that the observed reduction in steady-state level of beta globin mRNA is partially caused by aberrant splicing followed by activation of nonsense-mediated decay (NMD) pathway, leading to increased degradation of aberrant beta globin mRNA variants. Reduction in expression of beta globin mRNA from beta globinL1 allele comes also from altered rate of transcription. We performed PCR-based nuclear run-on assay and forty minutes of in vitro transcription revealed 30% decrease in beta globin L1 allele transcription rate compared to wild-type beta globin allele. We also observed the beta globinL1 3' enhancer sequence was fully methylated. However, treatment with a demethylating agent did not increase the expression of the beta globin transcript of the beta globinL1 gene. Therefore the methylation of the beta globinL1 3' enhancer sequence is only a secondary event probably associated with enhancer displacement by L1 insertion. The other known mechanisms of intronic L1-mediated gene disruption as premature polyadenylation and gene breaking were not detected in our case.

1776.

In vitro technique to assess biological properties of BCR/ABL kinase domain variants identified in CML patients

Peková Soňa, Čmejla Radek, Dvořáková Lucie, Voglová Jaroslava, Bělohávková Petra, Karas Michal, Žejšková Lenka, Plachý Radek, Mazal Oldřich, Haugvicová Renata (*Chambon, a.s., Laboratoř molekulární diagnostiky, Praha; Oddělení klinické hematologie FN, Hradec Králové; Hematologicko - onkologické oddělení FN, Plzeň*)

Background: With the advent of novel treatment modalities in chronic myeloid leukemia (CML) represented by tyrosin kinase inhibitors (TKIs), CML clones harboring BCR/ABL kinase domain mutations emerge. Recurrent BCR/ABL kinase domain mutations have been tes-

ted for their sensitivity to TKIs in vitro and the data proved to be valuable for clinical hematologists. During routine laboratory testing, novel BCR/ABL kinase domain variants with unknown biological response to TKIs are being revealed in CML patients. Importantly, the mutations are identified at relatively low levels of minimal residual disease (MRD), which prevents their direct assessment of in vitro TKIs sensitivity. Molecular techniques enable to construct novel BCR/ABL kinase domain mutations in vitro and test them for their susceptibility to TKIs even at low MRD levels, several months prior to hematological relapse. Aims: The aim of the study was to develop a laboratory technique for in vitro mutagenesis and in vitro TKIs testing of novel variants of BCR/ABL kinase domain identified in CML patients. Methods: As a kind gift from Drs. Nikolas von Bubnoff and Justus Dwyer, Munich, Germany, we have obtained a retroviral pLXRN-based construct harboring wild type BCR/ABL fusion, containing transforming core domain of human BCR fused to mouse ABL. Constructs harboring novel BCR/ABL with kinase domain mutations were prepared using site-directed mutagenesis. Packaging cell line Eco-Pack293 transfected with retroviral BCR/ABL construct was used to produce retroviral particles and transduce IL-3 dependent murine cell line Ba/F3. Polyclonal stable populations of wild type BCR/ABL (sensitive to all TKIs), T315I (resistant to all TKIs), and A344V and ins G at nt 744 (novel BCR/ABL kinase domain variants identified in our cohort of CML patients) expressing Ba/F3 cells were prepared upon withdrawal of IL-3 and the cells were exposed to a panel of TKIs (kindly provided by Novartis and BMS). Results and conclusions: By combining site-directed mutagenesis and retroviral transduction techniques we have developed a methodology to test novel variants of BCR/ABL kinase domain for their in vitro sensitivity to TKIs at low levels of MRD. This technique allows in a short time to prepare stable cell lines harboring authentic BCR/ABL kinase domain mutations, and test them for their in vitro susceptibility to available TKIs. We believe this approach represents just another example of personalized molecular medicine.

Postery

OŠETŘOVATELSTVÍ

(1) 1829.

Profylaxe a léčba orální mukozitidy po autologní transplantaci s přípravkem Caphosol

Gabrielová Michaela, Löfflerová Simona

(I.Interní klinika, Transplantační jednotka, VFN, Praha)

Úvod: V péči o orální mukozitidu přinášíme nové zkušenosti s využitím Caphosolu. Přípravek je určen k vyplachování úst. Účelem je zvlhčování a udržování zvýšené hygieny sliznice dutiny ústní, jazyka a orofaryngu. Metody: V roce 2009 a 2010 jsme prospektivně analyzovaly 15, kteří podstoupili autologní transplantaci v přípravném režimu BEAM u lymfomů a Melfalan u myelomů. Výplachy Caphosolem byly prováděny- při poklesu leukocytů pod $1,0 \times 10^9/l$, výplachy prováděny 4x – 10x denně. Ukončení výplachů Caphosolem- ústup orální mukozitidy (čistá, zdravá sliznice a normální příjem výživy). Spokojenost s vyplachováním Caphosolem- obecně vysoká, pouze dva pacienti přerušili vyplachování Caphosolem, tři pacienti popisují pocit sucha v ústech po vyplachování Caphosolem. Výsledky: Hodnoceno bylo 15 pacientů. Zánět sliznice dutiny ústní byl hodnocen denně dle standardních kritérií WHO (grade 0-4). Celkový výskyt orální mukozitidy byla: gr. 0 měli 3 pacienti (20%), gr. 1 měli 4 (26%), gr. 2 měli 4 (26%), gr. 3 měli 3 (20%) a gr.4 měl 1 (6,6%) pacient. Střední doba trvání orální mukozitidy byla 3,5 (0-11) dní. Bolest dutiny ústní byla hodnocena v průběhu podávání Caphosolu pomocí stupnice vizuální analogové škály bolesti (VAS 0-10, 0= žádná bolest, 10= nesnesitelná bolest). Více než polovina pacientů měla mírné až žádné bolesti. Střední doba trvání bolesti byla 9 dní (7-11). Nutnost podávání opioidů (Morphin) byla u 4 pacientů (26%), medián doby podávání opiátů byl 7,2 (6-10) dnů. Úplná parenterální výživa byla nutná nasadit u 8 pacientů (53%). Medián hospitalizace byl 21 (16-24) dnů. Závěr: Využití Caphosolu v prevenci a urychlení hojení orální mukozitidy se jeví velmi slibně. Vzhledem k nízkému počtu zařazených pacientů, pokračujeme v prospektivním sledování. Téměř 85% pacientů by doporučilo Caphosol v prevenci a léčbě orální mukozitidy ostatním pacientům, kteří podstoupí transplantaci.

(2) 1677.

Léčba nemocné s refrakterní formou trombotické trombocytopenické purpury - kazuistika

Hnídková Irena, Strnadová Blažena, Tomšová Hana, Kňourková Lidmila, Lánská Miriam (II.interní klinika - Oddělení klinické hematologie FN a LF, Hradec Králové)

Úvod: Trombotická trombocytopenická purpura (TTP) je vzácné onemocnění, které v neléčených případech ve-

de u 90% nemocných ke smrti. Zlatým standardem léčby tohoto onemocnění zůstává výměnná plazmaferéza. V našem sdělení popisujeme úspěšnou léčbu nemocné s refrakterní TTP. Kazuistika: jednalo se o ženu V.H., nar. 1949, která v úvodu onemocnění pozorovala zvýšený výskyt hematomů, následně se objevily závratě, praktický lékař uzavřel diagnózu vertebrogenní syndrom (již přítomna trombocytopenie a anémie dle dok.), následně dochází k výraznému zhoršování stavu se zmateností. Nemocná byla přijata na naše oddělení, již 1. den diagnostikována TTP a neprodleně zahájena léčba plazmaferézou. Výkon probíhal na JIP vzhledem k závažnosti stavu, cestou zavedené dialyzační kanyly v centrální žíle za monitorace životních funkcí. Plazmaferéza byla prováděna denně na separátoru Cobe Spectra, s výměnou jednoho objemu plazmy s hrazením dárcovskou plazmou ve 100%. Tato léčba vedla ke vzestupu trombocytů, ale při snížení frekvence výkonů ob den a rozvojem sepse dochází k opětovnému poklesu trombocytů. Proto opět plazmaferézy prováděny denně bez dostatečného efektu, dochází k progresi stavu s nutností napojení na umělou plicní ventilaci a rozvojem opakovaných tonicko-klonických křečí. Bylo rozhodnuto o zintenzívnění léčby a plazmaferézy byly prováděny 2x denně. Pro přetrvávající tonicko-klonické křeče i v průběhu plazmaferéz bylo nutné pečlivé monitorování nemocné, přerušování výkonu, úprava antiepileptické medikace. Ani přes zintenzívnění léčby plazmaferézou nedochází k úpravě krevních parametrů, vzhledem k celkovému stavu nebyla možná splenektomie, proto podán rituximab v týdenních intervalech (celkem 4krát). Při této terapii dochází k normalizaci počtu trombocytů a zejména postupnému zlepšování stavu nemocné, křeče zcela vymizely. Nyní je nemocná 1/2 roku pouze sledována naší ambulancí, laboratorní parametry jsou v normě. Závěr: léčba TTP byla u dané nemocné úspěšná až v kombinaci plazmaferéz a nových léčebných možností (rituximab). Touto kasuistikou jsme chtěli poukázat na náročnou léčbu tohoto vzácného onemocnění, na nutnost včasné diagnostiky a možnosti využití plazmaferéz v 12 hod intervalu. Tato léčba vyžaduje komplexní ošetrovatelskou péči, která je nedílnou součástí moderní léčby.

(3) 1676.

Naše zkušenosti s terapeutickou plazmaferézou v léčbě neurologických onemocnění

Strnadová Blažena, Hnídková Irena, Tomšová Hana, Kňourková Ludmila, Lánská Miriam (II.interní klinika - Oddělení klinické hematologie FN a LF, Hradec Králové)

Úvod: terapeutická plazmaferéza se v posledních letech stala již standardní léčbou řady onemocnění. Naše separátorové centrum využívá tuto léčebnou metodu nejenom v léčbě hematologických onemocnění ale u celé řady dal-

ších indikací. Ve spolupráci s neurologickou klinikou provádíme léčebné plazmaferézy i u nemocných s neurologickým onemocněním. V posledních letech tyto výkonu tvoří přibližně 1/3 všech léčebných plazmaferéz prováděných na našem pracovišti. Metody: retrospektivně jsme hodnotili 33 nemocných (n.) a celkem 35 epizod (2 n. léčení 2x), kteří byli v období od 1.1.2001 do 1.3.2009 léčení plazmaferézou pro neurologické onemocnění. Jednalo se o 12 mužů a 21 žen s mediánem 46 let v rozmezí 13-84 let. U 12 n. (celkem 14 epizod - 2 n. byli léčení dvakrát v různém časovém období) se jednalo o akutní dekompenzaci myastenie gravis, 10 n. mělo akutní polyradikuloneuritidu (syndrom Guillain-Barré), 6 n. roztroušenou sklerózu, 1 n. byla léčená pro multifokální motorickou neuropatii, 2 n. pro akutní diseminovanou encefalomyelitidu (ADEM) a u 2 n. paraneoplastické projevy. 12 n (34%) bylo před zahájením plazmaferéz na umělé plicní ventilaci. Plazmaferézy byly prováděny na separátoru COBE SPECTRA, v různých časových schématech (většinou ob den -86%), provedena výměna 0,8 - 1 L celkového objemu plazmy. Jako náhradní roztoky byla použita kombinace albuminu s krystaloidy v poměru 2:1. Většina n. měla zaveden centrální žilní dvoucestný dialyzační katetr - 86%, ve v. subclavia nebo v. femoralis. U nemocných vyžadujících intenzivní péči (umělá plicní ventilace, nestabilní oběh, monitorace životních funkcí) jsme výkony prováděly na JIP neurologické kliniky nebo KARIM. Po celou dobu výkonu (3-4 hod) byli nemocní trvale sledováni sestrou separátorového centra ve spolupráci se sestrou daného oddělení. Výsledky: U 33 n. jsem hodnotili 35 epizod. Celkem bylo provedeno 174 léčebných plazmaferéz s mediánem 5 výkonů na 1 n., rozmezí 3-15 výkonů. K léčebnému efektu došlo u 30 epizod (86%). Ke zlepšení došlo zejména u nemocných s dekompenzací myastenie gravis (93%), u n. s Guillain-Barrého syndromem (90%). Komplikace jsem pozorovali u 4 n. (12%). Závěry: léčebná plazmaferéza je účinnou a bezpečnou léčebnou možností u vybraných neurologických onemocněních. Nízké procento komplikací svědčí pro bezpečnost této léčené možnosti, ale tento výkon vyžaduje zkušený sesterský tým. Podporováno výzk. záměrem MZO 00179906.

CLL

(4) 1682.

In vivo model chronické lymfocytární leukemie

Verner Jan, Folber František, Forejtková Sylva, Moulis Mojmír, Chovancová Jana, Stehlíková Olga, Doubek Jaroslav, Klabusay Martin, Trbušek Martin, Pospíšilová Šárka, Hampl Aleš, Doubek Michael, Mayer Jiří

(Centrum mol. biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, LF MU a FN, Brno; Interní hematologická klinika, LF MU a FN, Brno; Ústav patologie, FN, Brno; LF MU, Brno; Laboratoř flowcytometrie a celulární terapie, Interní hematologická klinika, LF MU a FN, Brno; Ústav fyziologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno; Biologický ústav, LF MU, Brno)

Úvod: Chronická lymfocytární leukemie (CLL) patří mezi maligní lymfoproliferativní onemocnění, v jehož léčbě se využívají cytostatické léky, monoklonální protilátky a transplantace krvetvorných buněk. Vytvořením in vivo modelu CLL u imunodeficitního myšního příjemce by bylo možné sledovat leukemické buňky a jejich odpověď na terapii v prostředí živého organismu, neboť předpověď úspěšnosti léčby a sledování leukemických buněk in vitro je omezená. Metody: Za účelem vytvoření myšního - xenotransplantačního - modelu CLL jsme použili myší kmen NOD SCID gamma (The Jackson Laboratory, Maine, USA). Tento geneticky modifikovaný kmen je velmi vhodný pro studium lidských nádorových onemocnění. Je charakteristický těžkým imunodeficitem (spontánní mutace genu Prkdc a cílená mutace v genu IL2Rgamma) - především absencí funkčních T a B lymfocytů, NK buněk a komplementu a minimální funkcí myeloidních buněk a dalších součástí nespecifické imunity. Pro iniciační studii byly vytvořeny dvě skupiny myší. První skupinu (n = 5) tvořily myši, kterým bylo aplikováno intraperitoneálně 5×10^6 buněk lidské nádorové linie MEC1 (CLL v polymfocytární transformaci) v 0,1 ml PBS (fyziologický roztok s fosfátovým pufrům). Druhá skupina (n = 5) byly negativní kontroly, kdy byl myším intraperitoneálně aplikován pouze PBS. Po 4 týdnech byla zvířata usmrcena. Následně byly analyzovány vzorky periferní krve, sleziny, jater a kostní dřeně. Výsledky: V pokusné skupině byl zjištěn úbytek hmotnosti myší, lehká hepatomegalie a výrazná splenomegalie. Histologická a imunohistochemická analýza prokázala masivní ložiskovou infiltraci jater, sleziny a kostní dřeně polymorfními nezralými buňkami, které odpovídaly obrazu transformované CLL. V periferní krvi byla zjištěna těžká anémie a trombocytopenie a výrazná leukocytóza s přítomností nezralých buněk v diferenciálním rozpočtu. Kontrolní skupina myší nejevila rozdíly oproti běžné populaci stejného kmene. Závěr: V první části našeho experimentu jsme úspěšně vytvořili myší model CLL. V dalších fázích budeme pokračovat modely jiných hematologických malignit a jejich cytostatickou léčbou. Podpořeno výzkumným záměrem MŠMT ČR MSM0021622430 a grantem IGA NS9683-3/2008.

TRANSPLANTACE

(5) 1842.

Alogénná transplantácia krvotvorných buniek u pacientov s refraktérnou/relabovanou Hodgkinovou chorobou – skúsenosti jedného centra

Rusiňáková Zuzana, Raida Luděk, Faber Edgar, Indrák Karel (Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc)

Úvod: Alogénná transplantácia (alloSCT) u pacientov s relabovanou alebo refraktérnou Hodgkinovou chorobou (HD) je stále kontroverznou liečebnou metódou, na ktorú neexistuje jednoznačné stanovisko a diskutovanou je i otázka existencie GvL efektu. Na našom pracovisku sme vyhodnotili výsledky alloSCT u HD a poukázali na

výrazné špecifiká transplantácie u tohto ochorenia. Metóda: V rokoch 2004 - 2009 11 pacientov s HD s mediánom veku 33 rokov podstúpilo alloSCT od príbuzného (27%) alebo nepríbuzného darcu (73%) po nemyeloablatívnom prípravnom režime (6x FC+ATG, 2xFC, 3x FC+ATG+LD TBI). S výnimkou 1 pacienta všetci v minulosti absolvovali autológnu SCT. Priemerne pacienti podstúpili 3 línie liečby (2-5), pričom medián doby od diagnózy k alloSCT bol 46 mesiacov. Periférne kmeňové bunky boli podané 8, kostná dreň 3 príjemcom s mediánom prevedených CD34 + a jadrových buniek $5,8 \times 10^6/\text{kg}$, resp. $6,5 \times 10^8/\text{kg}$. Prevencia GvHD bola u 6 príjemcov zabezpečená iba cyklosporínom A, ktorý bol u ďalších 4 doplnený o mykofenolát mofetil a u 1 o metotrexát. Výsledky: K prihojeniu štepu došlo u 10 pacientov (u 1 nehodnotený), pričom 80% pacientov malo zmiešaný a 20% kompletný chimérizmus deň +30 po alloSCT. aGvHD sa rozvinula u 3 pacientov(27%). cGvHD sa objavila u 5 (72%) zo 7 hodnotených pacientov. Celková mortalita bola 36%. Príčinou úmrtia bola intersticiálna pneumónia, aGvHD IV st., progresia choroby deň +22 po alloSCT, nekrotizujúca kolitída komplikujúca aGvHD. Zo 7 pacientov, u ktorých bolo možné hodnotiť liečebnú odpoveď dosiahlo 6 pacientov kompletnú remisiu (CR) a jedna PR choroby. S mediánom sledovania 533 dní sú 2 pacienti v CR a jeden v PR. K progresii/re-lapsu choroby došlo u 4 pacientov s mediánom 22 mesiacov po alloSCT. Záver: Aj napriek malému súboru, naše skúsenosti poukazujú na sporné výsledky alloSCT u pacientov s HD, pričom jednou z príčin môže byť nedostatočná expresia MHC znakov na povrchu nádorových buniek. V súlade s literatúrou nemala alloSCT efekt u pacientov s chemorezistentnou chorobou. Sporný je i medián trvania CR po transplantácii. U väčšiny pacientov sme pozorovali suspektne B-symptómy či ďalšie potiaže, ktoré predchádzali vlastnej progresii nádoru umožňujúcej verifikáciu choroby. V prípade pacientov pretrvávajúcich v CR, nie sme schopní definovať znaky choroby, ktoré by mohli predisponovať k dlhodobej odpovedi na alloSCT, ani jednoznačne určiť, či dosiahnutie CR súvisí s GvL efektom, alebo sa na ňom podieľajú iné imunologické mechanizmy.

(6) 1794.

Plerixafor - nová naděje pro poor mobilizery

Kořístek Zdeněk, Folber František, Navrátil Milan, Žmijáková Andrea, Švábová Helena, Mayer Jiří
(*Interní hematologická klinika, FN, Brno*)

Úvod. U pacientů s myelomem a lymfomy selhává mobilizace v 10-25% případech, což představuje významný medicínský problém. Plerixafor je reverzibilní antagonist receptoru CXCR4 a inhibuje jeho vazbu na SDF-1 (stromal-derived factor 1), která je zásadní při udržování hematopoetických progenitorů v kostní dřeni. Plerixafor tak způsobuje významnou mobilizaci progenitorů do krve i u pacientů, u kterých oby-

klá mobilizace selhala. Pacienti a metody. Na našem pracovišti prodělalo od 3/2009 do 4/2010 mobilizaci s použitím plerixaforu 13 pacientů (8 M, 5 Ž) ve věku 57 let (medián, 34-68) s diagnózou M. Hodgkin (HD, n=2), mnohočetný myelom (MM, n=5) a NHL (n=6, různé typy). Všichni pacienti s MM byli léčeni thalidomidem nebo revlimidem. Čtyřem pacientům byla mobilizace s plerixaforem indikována bez předcházejícího pokusu o standardní mobilizaci: 2 pacienti s MM byli už po autologní transplantaci, jedna pacientka s MM byla extenzivně předléčená a na revlimidu, jeden pacient s NHL byl také těžce předléčen a s infiltrací kostní dřenež základní chorobou. Schéma mobilizace: G-CSF 10 ug/kg/den s.c. ráno ode dne 1 do ukončení odběrů, plerixafor 240 ug/kg/den s.c. ve 22. h ode dne 4 do ukončení odběrů. Leukaferézy byly prováděny v den 5 (od 8 h) a dle výtěžnosti i v den 6 a případně v den 7. Podmínkou zahájení aferéz byla koncentrace CD34+ buněk v krvi vyšší než 5/ul. Pro aferézy byl použit separátor COBE Spectra. Plerixafor poskytla firma Genzyme v rámci Patient named program. Výsledky: V den 5 bylo průměrně 25 CD34+ buněk/ul (medián 28, 1-66). Odběr zahájilo 12 pacientů, 10 pacientů pokračovalo druhou a dva pacienti třetí leukaferézou. U jednoho pacienta mobilizace selhala a leukaferézy nezačal. Výtěžnost byla následující (medián, od-do): první leukaferéza $2,77 \times 10^6$ CD34+ buněk/kg ($0,50-4,25$) a $24,47 \times 10^4$ CFU-GM ($6,25-31,87$), druhá leukaferéza $1,65 \times 10^6$ CD34+ bb./kg ($0,46-4,56$) a $21,45 \times 10^4$ CFU-GM ($8,18-34,42$), třetí leukaferéza $0,96 \times 10^6$ CD34+ bb./kg ($0,32-1,60$) a $14,41 \times 10^4$ CFU-GM ($5,90-22,92$). Devět pacientů již prodělalo autologní transplantaci pomocí progenitorů získaných po plerixaforu a engraftment se nelišil od běžných transplantací. Nezávažné nežádoucí účinky (bolesti kostí, zažívací potíže) byly u 46% pacientů. Závěr: Plerixafor je velmi cenným lékem a prokázal vysokou efektivitu i u pacientů, kdy standardní mobilizace selhala, případně byli velmi těžce předléčení. Nežádoucí účinky se zásadně neliší od obvyklé mobilizace a pacienty významně neohrozily.

(7) 1774.

Hodnocení kardiální toxicity během transplantace krvetvorných buněk pomocí nových biomarkerů poškození myokardu

Horáček Jan M., Jebavý Ladislav, Vašatová Martina, Tichý Miloš, Žák Pavel, Malý Jaroslav
(*Katedra válečného vnitřního lékařství, FVZ UO, Hradec Králové; Ústav klinické biochemie a diagnostiky, FN a LF UK, Hradec Králové; II. interní klinika – oddělení klinické hematologie, FN a LF UK Hradec Králové*)

Úvod: Kardiální toxicita patří mezi závažné komplikace onkologické léčby. Cílem naší studie bylo sledování kardiotoxicity během transplantace krvetvorných buněk (TKB) pomocí sady biomarkerů kardiálního poško-

zení – glykogenfosforyláza BB (GPBB), kardiální typ proteinu vázajícího mastné kyseliny (H-FABP), kardiální troponin I (cTnI), kreatinkináza MB (CK-MB mass), myoglobin. Zkušenosti s GPBB a H-FABP v této souvislosti jsou velmi limitované a jedná se o prioritní výsledky. Soubor a metodika: Do studie byla zařazeno 53 pacientů (průměrný věk $49,9 \pm 12,3$ let, medián 54 let, 33 mužů), u kterých byla provedena TKB pro hematologickou malignitu (AML 27, MM 12, NHL 5, HL 4, ALL 3, CML 1, MDS 1). Třicet transplantací bylo autologních a 23 alogenních. Kardiální biomarkery byly měřeny 1 den po dokončení přípravného režimu (po PR) a 1 den po převedech KB (po TKB). Koncentrace biomarkerů nad horní mezí referenčního rozmezí doporučenou výrobcem (Randox) byly považovány za zvýšené. Hodnoty cut-off pro kardiální poškození byly následující: $7,30 \mu\text{g/l}$ pro GPBB, $4,50 \mu\text{g/l}$ pro H-FABP, $0,40 \mu\text{g/l}$ pro cTnI, $4,80 \mu\text{g/l}$ pro CK-MB mass, $76,0 \mu\text{g/l}$ pro myoglobin. Výsledky: Byly zjištěny významné elevace GPBB u 8 (15,1 %) pacientů po PR a u 9 (17,0 %) pacientů po TKB. U 1 pacienta (1,9 %) došlo k mírnému vzestupu H-FABP po TKB. Ostatní kardiální biomarkery (cTnI, CK-MB mass, myoglobin) zůstaly v referenčním rozmezí u všech pacientů. Byla zjištěna korelace mezi elevací GPBB a poruchou diastolické funkce LK na echokardiografii ($r = 0.603$; $p < 0.0001$). U žádného pacienta nedošlo k manifestaci kardiotoxicity v peritransplantačním období. Závěry: Naše výsledky naznačují, že podání PR a následná TKB jsou spojeny s poškozením myokardu, které se manifestuje zvýšeným uvolňováním GPBB z kardiomyocytů, což může korelovat s poruchou diastolické funkce LK na echokardiografii. U asymptomatických pacientů mohou být tyto nálezy považovány za projev akutní subklinické kardiotoxicity. Není jasné, zda tyto akutní změny budou předpovídat rozvoj kardiomyopatie spjaté s onkologickou léčbou v budoucnosti. Další studie na větším počtu pacientů budou potřeba k potvrzení našich předběžných výsledků a definování role nových biomarkerů kardiálního poškození při hodnocení kardiotoxicity v onkologii. Práce byla podpořena z výzkumného záměru MO 0FVZ0000503 a MZO 00179906. Práce byla přijata k publikaci do Bone Marrow Transplantation (doi:10.1038/bmt.2009.306).

(8) 1711.

První zkušenosti s podáváním i.v. busulfanu v rámci přípravy před autologní nebo alogenní transplantací krvetvorných buněk, zkušenost jednoho centra

Jungová Alexandra, Koza Vladimír, Vokurka Samuel, Karas Michal

(Hematologicko onkologické oddělení FN, Plzeň)

Úvod: Busulfan je často používán v rámci protokolů předtransplantační přípravy. V myeloablativních režimech je používán v p.o. dávce 1mg/kg/den . Vysoká dávka v p.o. aplikaci má však svá úskalí a vedlejší účinky. Individuální vstřebání léku GIT vede především k va-

riabilním hladinám v krvi, vyžadujícím jejich monitoraci s rizikem vysoké toxicity (např. VOD) či naopak zvýšeného rizika relapsů. Nekomfortní je i aplikace velkého počtu tablet. Z těchto důvodů řada center ve světě přechází na i.v. aplikaci léku. Soubor nemocných a metodika: Na HOO v Plzni je používán i.v. busulfan v předtransplantační přípravě od roku 2008. Dosavadní soubor představuje 25 nemocných (14 mužů, 11 žen, medián věku 34 let) s dg.-13 ALL, 8 AML, 1 CML, 1 MDS, 1 OMF a 1 myelosarkom. Transplantát- 19 x PBSC (76 %), 6x BM (24 %). Přípravný protokol Bu/CY2: Bu $0,8 \text{mg/kg}$ a 6 hodin v dny -9 až -6.den, CY 60mg/kg/den i.v. -4.až -3.den, ve většině případů (nepříbuzenské aloSCT kombinace s ATG 5mg/kg/den -3 až -1). Sledována byla mukositivity, zvracení, CNS paroxysmy, engraftment, VOD, počet relapsů. Z 25 pacientů dosud žije 21 (84 %), 4 zemřeli (16%)- 2 na relaps nemoci a 2 pacienti na komplikace aGvHD (1x sepse, 1x kortikorezistentní GvHD střeva). Nikdo z pac. nezemřel na toxicitu protokolu. 4 pac.(16%) zrelabovali (z toho 1 pacientka molekulárně geneticky). Výsledky: Podávání v režimu $0,8\text{mg/kg}$ a 6 hodin 1.-4.den (kumulativně v průměru 918mg). Z komplikací nejčastější GIT toxicita ve smyslu mukositivity dutiny ústní (grade III.-IV. u 7 pac. (28 %)). VOD II.st. se vyskytla pouze u 1 pacienta (4 %). Elevace jaterních testů – bilirubin nad $50\mu\text{mol/l}$ u 6 pacientů (25 %) a elevace transamináz nad dvojnásobek normy u 9 pacientů (38 %). Akutní GvHD se vyskytla u 7 pacientů (28%), z toho v 6 případech (24 %) akutní forma I.-IV.stádia. U všech nemocných došlo k přihojení štěpu, s mediánem doby přihojení 14.5 dne pro leuko nad $0,5 \times 10^9$ a 16 dnů pro trombo nad 20×10^{12}). Závěr: Naše zkušenosti jsou v korelaci s daty udávanými v zahraniční literatuře a potvrzují velice dobrou snášenlivost i.v. podávaného busulfanu. Nespornou výhodou je lepší nastavení plazmatické hladiny léku s předpokladem omezení nejzávažnějších vedlejších účinků. Neocenitelnou výhodou je i nezatěžování nemocného podáním desítek tablet denně během transplantační přípravy. I.v. busulfan by se měl stát běžnou součástí přípravných transplantačních protokolů.

(9) 1699.

CMV infekcia po alogénnej transplantácii kmeňových krvetvorných buniek

Žiaková Barbora, Bojtárová Eva, Kubalová Stanislava, Demečková Eva, Mistrík Martin

(Klinika hematológie a transfúziológie LFUK, SZU a FNŠP, Bratislava-SK)

Úvod: Napriek možnostiam prevencie zostáva cytomegalovírus (CMV) jedným z najčastejších patogénov, ktorý sa podieľa na morbidite a mortalite u pacientov po alogénnej transplantácii kmeňových krvetvorných buniek (TKB). Reaktivácia CMV infekcie je závažnou komplikáciou po TKB. CMV status príjemcu je preto predomi-

nantným rizikovým faktorom pre vznik infekcie. K ostatným rizikovým faktorom, ktoré môžu zvyšovať riziko CMV infekcie, patria aj akútna alebo chronická reakcia štetu proti hostiteľovi (GvHD) a s ňou spojená imunosupresívna liečba (IS). Metódy: Retrospektívne sme analyzovali údaje u 67 pacientov (37 mužov, 30 žien), ktorí sa v období od 01/2006 do 12/2009 podrobili alogénnej TKB. 51 pacientov dostalo štep od HLA identického súrodenca, 16 pacientov od zhodného nepríbuzného darcu. 5 pacientov sa podrobilo alogénnej TKB v uvedenom období dvakrát. Medián veku pacientov v čase TKB bol 34,5 roka (rozsah 19 – 63 rokov). Prítomnosť CMV sme dokazovali pomocou metódy RQ – PCR v DNA izolovanej z plnej krvi pred TKB. Následne sme realizovali rutinný monitoring počas hospitalizácie 1x týždenne, ambulantne v priebehu prvého roku po TKB 1-4 x mesačne v závislosti od rizika reaktívacie CMV. Všetci pacienti dostávali dlhodobo profylakticky acyklovír alebo valgancyklovír až do ukončenia IS liečby, pri pozitívite CMV PCR - DNA sme zahájili preemptívnu liečbu gancyklovírom. Výsledky: Reaktíváciu CMV do dňa +100 po TKB sme zaznamenali u 16 pacientov (23,8%), z toho u 8 pacientov sme súčasne zaznamenali akútnu GvHD kože, čreva alebo pečene (do dňa +100 po TKB). U 3/8 pacientov došlo k rozvoju CMV ochorenia (hepatitída, encefalitída, enteritída). 2 z 3 pacientov zomreli, 1 v dôsledku CMV ochorenia. Záver: Monitorovanie a včasný dôkaz CMV virémie, ako aj antivírusová profylaxia a účinná preemptívna liečba patria k účinným metódam zabraňujúcim vzniku CMV choroby.

(10) 1663.

Development of the public cord blood registry in Slovakia

Polonska Marina, Ďuríková E., Bachratý J., Hamid Z. (*Eurocord-Slovakia, Slovak Placental Stem Cell Registry, Bratislava-SK*)

BACKGROUND: Since first cord blood transplantation in 1988 for patients with Fanconi anemia cord blood has become a proven source of hematopoietic stem cells for transplantation. In order to provide transplant physicians with high quality cord blood units (CBU), continuous cord blood banking and cooperation is inevitable on international levels. From 1995 directed cord blood banking for siblings and public cord blood banking started in Slovakia. Currently Eurocord-Slovakia acts as certified cord blood processing facility and public cord blood registry in Slovakia. **MATERIAL AND METHODS:** Eurocord-Slovakia employs international guidelines for donor selection, testing and criteria for CBU release and shipment through the membership in NetCord and WMDA. The project Extension of Slovak Cord Blood Registry is supported by Financial Mechanisms EEA, Norwegian Financial Mechanism and by Slovak Republic Government. Published cord blood transplant outcomes reveal the importance of the amount TNC

for cord blood engraftment, therefore a new approach of CBU selection was employed in our registry. Currently only CBU with minimum 150×10^7 TNC are selected for public inventory. **RESULTS:** Until March 2010 Eurocord-Slovakia has processed cord blood from more than 2500 voluntary donors. Since 2007 (grant implementation) there has been an increase in the volume of collected cord blood and increase in TNC content of cryopreserved units. The median volume collected increased from 91 ml to 126 ml. The median TNC after processing increased from 129×10^7 to 162×10^7 . According to the BMDW Annual Report our registry currently maintains the highest average TNC in comparison to other registries. Eurocord-Slovakia has provided 5 CBU for unrelated transplantations internationally with median TNC 219×10^7 per unit. At present 605 HLA-A, B, DRB1 typed CBU are available for transplantation. Through the sibling's donor program 118 CBUs were processed for family members of which 5 CBU were released for related transplantation. **CONCLUSIONS:** Cord blood units prepared in Eurocord-Slovakia are accepted by transplant centers worldwide. Public cord blood banking in Slovakia has increase steadily in the past two years mostly thanks to international grant; however for future governmental and public health funding is needed.

(11) 1641.

Alogenní transplantace po redukováné přípravě u rizikové akutní lymfoblastické leukémie v 1. kompletní remisi – zkušenosti jednoho centra

Karas Michal, Steinerová Kateřina, Jindra Pavel, Lysák Daniel, Vokurka Samuel, Svoboda Tomáš, Koza Vladimír (*Hematologicko-onkologické odd. FN, Plzeň*)

Úvod: akutní lymfoblastická leukémie (ALL) s rizikovými faktory (Ph+, t(4;11), t(1;19), leukocytóza, pro-B-ALL, pozdní dosažení CR) je indikací k provedení alogenní transplantace krvetvorných buněk (aloSCT) po myeloablativní přípravě. U starších nemocných a nemocných s dalšími onemocněními by však tato byla spojena s vysokým rizikem léčebné mortality (TRM). V úvahu by mohlo přicházet provedení aloSCT po redukováné přípravě (RIC), s níž jsou však v případě ALL zatím jen limitované zkušenosti. V tomto sdělení shrnujeme naše výsledky aloSCT po redukováné přípravě u rizikové ALL v 1. kompletní remisi (CR). **Pacienti a metody:** v letech 2004 až 2008 podstoupilo 11 pacientů s rizikovou ALL v 1. CR s mediánem věku 55 let (rozmezí 25-57 let) aloSCT po RIC (fludarabin+melfalan). Zdrojem krvetvorných buněk byla periferní krev s mediánem transplantovaných CD 34+ buněk $5,92 \times 10^6/\text{kg}$ (rozmezí 1,89-14,90 $\times 10^6/\text{kg}$). V 5 (45%) případech se jednalo o příbuzného a v 6 (55%) případech o nepříbuzného dárce (1x s HLA neshodou). Jako prevence nemoci z reakce štetu proti hostiteli (GVHD) byl podáván cyclosporin A a methotrexát. Další postupy, léčba komplikací, jejich hodnocení a hodnocení výsledků léčby probíhalo dle standard-

ních kritérií. Výsledky: u všech nemocných bylo v den +30 dosaženo kompletního dárcovského chimerismu (CC) a trvala CR onemocnění. Akutní GVHD se rozvinula u 4 (36%) pacientů a ve všech případech se jednalo o postižení 2.stádia. Chronická GVHD se rozvinula u 4 (36%) pacientů (1x limitovaná, 3x extenzivní). 6 (55%) pacientů s mediánem doby 6 měsíců (rozmezí 2-13 měsíců) od transplantace zrelabovalo a 3 z nich zemřeli. 3 pacienti po intenzivní chemoterapii a DLI dosáhli 2.CR a 2 z nich nadále žijí v 2.CR (2 a 5 měsíců). Z důvodu TRM zemřeli 2 (18%) pacienti (sepsa při GVHD) a žádný z nich do dne +100 po aloSCT. Předpokládaný DFS a OS ve 2 letech je 31% a 53%. Závěr: při limitaci velikostí souboru a dobou sledování získané výsledky ukazují, že aloSCT po RIC u nemocných s rizikovou ALL v 1.CR, kteří nejsou vhodní k myeloablativní přípravě, je poměrně dobře tolerována a že v části případů tento postup vede k udržení CR, ale za relativně vysoké incidence relapsů. Vzhledem k limitovaným zkušenostem a ne zcela jednoznačným výsledkům aloSCT po RIC u rizikové ALL v 1.CR (včetně našich zkušeností) je tento postup nadále spíše postupem experimentálním bez jednoznačně doloženého léčebného významu.

(12) 1650.

Aktivace CMV-specifických CD8+ T lymfocytů pomocí adenylátcyklázového toxoidu nesoucího epitopy odvozené od CMV proteinu pp65

Jelínek Jiří, Adkins Irena, Šebo Petr, Michálek Jaroslav (*Univerzitní centrum buněčné imunoterapie, Babákův výzkumný institut, LF MU, Brno; Sektor buněčné a molekulární mikrobiologie, Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i., Praha*)

Cytomegalovirus (CMV) je oportunní patogen, kterým je v průběhu života infikováno 50-80 % populace. Zatímco u zdravých jedinců probíhá CMV infekce většinou asymptomaticky, u imunodeficientních pacientů však může primární či rekurentní CMV infekce vyvolat závažné až život ohrožující onemocnění. Mezi rizikové skupiny patří mimo jiné pacienti podstupující imunosupresivní léčbu včetně příjemců allogenních hematopoetických buněk. Jedna z možností prevence a léčby těchto pacientů rezistentních na virostatika spočívá ve specifické vakcinaci s využitím peptidových epitopů odvozených od CMV antigenů. K posílení imunitní odpovědi lze využít nosič, který dopraví peptidový antigen do antigen prezentujících dendritických buněk. Adenylátcyklázový toxoid (Cya-AC-) odvozený od toxinu bakterie *Bordetella pertussis* se jeví jako ideální vektor, který je schopen dopravit krátké peptidové antigenní sekvence cíleně do dendritických buněk a navodit robustní antigenně-specifickou imunitní odpověď. Tato studie se zabývala aktivací imunitní odpovědi pomocí CyaA-AC- nesoucího peptidové epitopy odvozené od imunodominantního CMV proteinu pp65 in vitro. Aktivace imunitní odpovědi byla monitorována u mononukleárních buněk periferní krve zdravých CMV-seropo-

zitivních a seronegativních dárců pomocí průtokové cytometrie a kvantitativní analýzy produkovaných cytokinů metodou Cytometric Beads Array. Výsledky ukázaly, že CyaA-AC- nesoucí CMV antigenní epitopy aktivuje specifické CD8+ T lymfocyty. Tyto výsledky opodstatňují další využití CyaA-AC- v diagnostice a terapii CMV infekce a ukazují, že CyaA-AC- může sloužit jako model pro dopravu nádorově specifických antigenů do antigen prezentujících buněk s cílem indukce protinádorové imunoterapie. Tato studie byla sponzorována granty: MSMT NPVII 2B06058 a IGA MZCR NS9871.

PODPŮRNÁ PÉČE

(13) 1661.

Retrospective analysis of invasive aspergillosis in hematooncological department during 2005-2008

Weinbergerová Barbora, Ráčil Zdeněk, Kocmanová Iva, Lengerová Martina, Tošková Martina, Winterová Jana, Mayer Jiří (*IHO FN, Brno; OKM FN, Brno*)

Background: Invasive aspergillosis (IA) is a serious infectious complication in immunocompromised patients (pts.). Particularly pts. with hematological malignancies are at high risk of IA. Methods: The goal of our retrospective analysis was to evaluate incidence, early diagnostic possibilities and effect of antifungal therapy in proven and probable IA in immunocompromised pts. in our institution during 2005-2008. We followed EORTC/MSG criteria in evaluation of IA diagnosis (2002) and therapy response (2008). Results: In the mentioned period we documented 54 probable and 7 proven isolated pulmonary IA. Prolonged profound neutropenia (56%) and long-term use of corticosteroids (34%) were identified as the major risk factors of IA. 20 cases (33%) had normal finding on pulmonary X-ray. 54 cases (89%) had abnormality on pulmonary CT with "halo" sign as the most frequent finding (34%). 93% pts. had consecutive positivity of serum-galactomannan (S-GM). In 38 cases (62%) consecutive positivity of S-GM occurred before (3 days in avg.) pathologic scan. These drugs or combination were used as primary therapy: 41% voriconazole (VORI), 7% itraconazole (ITRA), 5% caspofungin (CASPO), 38% VORI+CASPO, 3% amphotericine B deoxycholate (AMB) and 6% none. Overall RR to primary therapy was 56% (VORI 60%, VORI+CASPO 78%, ITRA 25%, CASPO 0% and AMB 0%). In 9 cases we have to use salvage therapy (VORI+CASPO in 7 pts., posaconazole+CASPO in 1 pt. and VORI in 1 pt.). Overall RR to salvage therapy was 78%. The overall mortality rate was 44%, with 11% attributable to IA. Conclusions: On the basis of our analysis we confirm common risk factors of IA and major role of S-GM and CT for early diagnosis and prompt start of antifungal therapy of IA. We reached good results in RR with using both VORI and combination of VORI+CASPO in primary therapy of IA. Antifungal combination had excellent effect also if used as salvage treatment of this infection. NS10441-3/2009 NS10442-3/2009

(14)

Palonosetron hydrochlorid: druhá generace antagonistů 5-HT₃ receptorů. Nová doporučení prevence akutní i oddálené nevolnosti a zvracení po vysoce emetogenní chemoterapii u onkohematologických pacientů

Marková Jana (Praha)

Abstrakt nedodán.

(15) 1687.

Měření plazmatických hladin posakonazolu u hematoonkologických pacientů

Winterová Jana, Ráčil Zdeněk, Malášková Ludmila, Rolencová Monika, Mayer Jiří
(*Interní hematoonkologická klinika FN, Brno; Oddělení klinické biochemie FN, Brno*)

Úvod: Posakonazol patří mezi azolové širokospektrální antimykotika, využívané jak v profylaxi, tak v empirické a cílené terapii invazivních mykotických infekcí. Pro rozdílnou biologickou dostupnost po perorálním užívání posakonazolu a v důsledku předpokládaných lékových interakcí se plazmatické koncentrace posakonazolu vyznačují velkou variabilitou měřených hodnot jak mezi jednotlivými pacienty, tak interindividuálně. Cíl a metody: Plazmatická hladina posakonazolu byla stanovována vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. U pacientů léčených posakonazolem na IHOK v období od listopadu 2008 do ledna 2010 byla provedena retrospektivní analýza naměřených plazmatických hladin posakonazolu společně s analýzou laboratorních výsledků a klinických parametrů. Výsledky: Ve sledovaném období bylo vyhodnoceno celkem 110 vzorků plazmy od 25 pacientů (1-17 odběrů u jednoho pacienta) Plazmatická hladina byla stanovena jednou u 10 pacientů, dvakrát u 5 pacientů, tři a vícekrát celkem u 10 pacientů. Medián sledování byl 31 (3-205) dní od zahájení terapie posakonazolem. Posakonazol byl podáván v 55% profylakticky, ve 7% jako empirická antimykotická léčba, ve 32% jako preemptivní terapie mykotické infekce a v 6% jako cílená antimykotická terapie invazivní mykózy. Pacienti užívali posakonazol ve formě orální soluče společně s na tuky bohatým jídlem v celkové denní dávce 200-980 mg, rozdělené do 2-4 dávek. Zjištěné plazmatické koncentrace posakonazolu při denní dávce 600 mg (2x 300) byly 0,2-3,1 µg/ml (medián 1,12). Při dávce posakonazolu 800 mg denně se plazmatické hladiny pohybovaly v rozmezí 0,2-3,1 µg/ml, mediány naměřených hodnot byly 0,7 µg/ml při 4 denních dávkách (á 200 mg) a 1,01 µg/ml při dávce 400mg 2x denně. Změna dávkovacího režimu z 2x 400 mg na 4x 200 mg denně vedla u dvou sledovaných pacientů k významnému vzestupu plazmatické koncentrace posakonazolu. Ze všech vyšetřených vzorků ve 30% (n=30) byla plazmatická hladina posakonazolu pod 0,5 µg/l a při této hladině mohla být antimykotická terapie nedostatečně efektivní a účinná. Závěr: Sledování plazmatických koncentrací posakonazolu u průběhu léčby může být velmi užitečné při

úpravě dávkování léku, a tím dosažení efektivní a účinné koncentrace a teda lepší odpovědi na antimykotickou léčbu u vysoce rizikových hematoonkologických nemocných. Podpořeno IGA MZ ČR NS/10441-3/2009

ZDRAVOTNÍ LABORANTI

(16) 1685.

Náplň práce kontrolní laboratoře na Krevním centru ve FN Ostrava

Jurajdová Lenka, Terkovičová P., Malušková A., Čermáková Z., Lakotová O.

(*Krevní centrum, FN, Ostrava-Poruba*)

Kontrolní laboratoř na Krevním centru ve FN v Ostravě-Porubě zahájila svou činnost v roce 1996. Náplň práce: - vyšetření jakostních požadavků transfuzních přípravků a plazmy k frakcionaci - účastní se na procesních validacích Další činnosti: a/ příprava fyziologického roztoku pro laboratorní účely /1x týdně/ b/ pro pacienty a několik externích zadavatelů vyšetřuje hladinu volného hemoglobinu c/ provádí kontrolu způsobilosti automatických pipet PŘÍPRAVKY, U KTERÝCH JE PROVÁDĚNA KONTROLA KVALITY: 1/ Plazmové /P,PA,PD/ 2/ Erytrocytové /EBR,ERD,EAR,RPK,ERDP/ 3/ Trombocytové /TA,TBSD/ 4/ Granulocytové /GA/ 5/ Kryoprotein VÝBĚR VZORKŮ: - namátkově- laborantka kontrolní laboratoře - počet vzorků-podle doporučení uvedených v *Quide to the preparation,use and quality assurance of blood components-14*.vydání a vyhlášky 143/2008sb. - pokud je vzorků méně-kontrolují se všechny

(17) 1683.

HLA typizace

Klimentová Hana, Vondráčková Hana (*ÚHKT, Praha*)

HLA typizace. Oblast HLA (hlavní histokompatibilní systém člověka) se nachází na krátkém raménku 6.chromozomu (6p21.3) a obsahuje 128 funkčních genů, tj.3 600 párů bází. Tyto geny kódují antigenní struktury rozpoznávací organismu cizí struktury a zahajující tak kaskádu imunitních odpovědí. Transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT) u pacientů s onkohematologickými onemocněními představuje kromě eliminace nádorových buněk také adopci imunitního systému dárce, a proto testování HLA shody pacient/dárce pro výběr vhodného dárce má zásadní význam pro úspěšnost HSCT. Genotypizaci provádíme polymerázovou řetězovou reakcí se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP) a přímým sekvenováním (SBT). Speciální softwary provádí vyhodnocování výsledků a díky navázání na mezinárodní pravidelně aktualizovanou databázi HLA alel jsou maximálně přesné. Po indikaci pacienta k HSCT vyšetřujeme příslušníky užší rodiny v lokusech HLA-A,-B,-DRB1 na úrovni alelických skupin (antigenů) – low resolution (LR), z něhož můžeme usoudit míru shody. Pro dětské pacienty provádíme podle standar-

dů EFI rodinnou studií – LR rodičů dítěte a sourozenců . U shodných sourozenců pokračujeme typizací ve vysokém rozlišení – High Resolution (HR) na úroveň alel. Pro HSCT je HLA shodný sourozenec nejvhodnějším dárce. (rychlá dostupnost, genetická podobnost). Vzorke pacientů, kteří nemají sourozence, nebo mají HLA neshodného, jsou typizovány na úroveň jednotlivých alel v lokusech HLA I.třídy -A,-B,-Cw, a HLA II. třídy -DRB1 , -DQB1 a výsledek je předán registru k vyhledávání vhodného nepříbuzného dárce. Typizační data nepříbuzných dárce z registrů jsou potvrzována a doplňována – výsledek je ověřen na HR.V případě nalezení neshod vedeme s klinickými lékaři diskuzi o vhodnosti dárce. Testování HLA systému pro potřeby pacientů ÚHK a KDHO Motol provádí naše laboratoř od roku 1993. Vyšetřovací metody jsou od roku 2002 akreditovány ČIA podle normy ISO/IEC 17025, od roku 2004 i podle ISO 15189 určené pro zdravotnické laboratoře. Naše pracoviště od roku 2007 držitelem akreditace EFI (Evropská federace pro imunogenetiku). Tato posouzení dokládají, že používané postupy jsou v souladu s odbornými standardy i nároky na kvalitu a její řízení, a proto můžeme testovat pro naše pacienty potenciální dárce z českých registrů (cca 55 tisíc) i celosvětové sítě zahraničních registrů (více než 14 milionů dárce).

(18) 1654.

Analyzátor TechnoTwinStation v imunohepatologické laboratoři

Kozelská Renata, Salamon Marek, Byrtusová Jana, Čermáková Zuzana, Lakotová Oldřiška
(*Krevní centrum, FN, Ostrava-Poruba*)

K vyšetřování vzorků dárce používá Krevní centrum FN Ostrava od roku 2009 analyzátor Techno TwinStation. Analyzátor Techno TwinStation a Lyra MP – Reader tvoří modul, který je propojen softwarem Maestro. Všechny operace jsou ovládány pomocí dotykového monitoru. Plně automatizovaný analyzátor Techno je schopen provádět pozitivní identifikaci vzorků, reagensů, karet a mikrotitračních desek pomocí čárových kódů. Automaticky kontroluje hladiny reagensů, čísla šarží a data expirací. Provádí pipetování buněčných suspenzí, inkubaci, centrifugaci, čtení a interpretaci výsledků. Je schopno vyšetřit 70 vzorků za hodinu, během jednoho cyklu vyšetří maximálně 36 vzorků a kapacita každé z 2 centrifug je 24 karet. Lyra MP- Reader je určen pro centrifugaci, agitaci a čtení mikrotitračních desek. Vyšetření dárce v laboratoři rutinní imunohepatologie tato vyšetření: 1.Vyšetření krevní skupiny a antigenu RhD u prvodárce 2.Vyšetření krevní skupiny a antigenu RhD u opakovaných dárce 3.Vyšetření Rh a Kell fenotypu u prvodárce 4.Vyšetření screeningu protilátek metodou NAT Firma Eurex Medica dodává veškeré diagnostické reagensy a pomůcky vyráběné firmou DiaMed, které jsou potřebné pro analyzátor. Techno TwinStation využívá pro vyšetřování dárce 3 druhy mikrotitračních desek ad1) DiaMed MP Test A-B-AB-DVI – DVI+–ctl/A1,B (pro vyšetření krevní skupiny a antigenu RhD dárce s prvním a druhým odběrem)

ad2) DiaMed MP Test A-B-D-ctl/A-B-D-ctl (pro vyšetření krevní skupiny a antigenu RhD u opakovaného dárce) ad3) DiaMed MP Test C,c,E,e,K,ctl (pro vyšetření Rh a Kell fenotypu u dárce s prvním a druhým odběrem) Identifikační karty LISS/Coombs se spolu s diagnostickými erytrocyty ID -DiaCell Pool používají pro vyšetření screeningu protilátek proti erytrocytům metodou NAT. Diagnostické erytrocyty DiaCell MP ABO jsou využívány pro vyšetření aglutininů u dárce s prvním a druhým odběrem. ID Diluent 1 (bromelin) je využíván pro vytvoření buněčných suspenzí. Pro promývání analyzátoru jsou potřeba roztoky Wash Solution A a B. Hlavními výhodami analyzátoru jsou: - jednoduchá obsluha - přátelský software - spolehlivost - validní výsledky - cena jeho provozu je adekvátní vůči spektru vyšetření, která provádí. V budoucnosti je uvažováno o využití analyzátoru pro další testy jako je kompletní předtransfuzní vyšetření a vyšetřování pacientů.

CML/MYELOPROLIFERACE

(19) 1769.

Expres sestřihových variant WT1: vývoj metodiky a první výsledky u pacientů s AML a CML

Lopotová Tereza, Žáčková Markéta, Polák Jaroslav, Schwarz Jiří, Klamová Hana, Machová Poláková Kateřina, Moravcová Jana

(*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*)

Prognostický význam celkové exprese WT1 byl prokázán u akutní (AML) i chronické myeloidní leukémie (CML). Existuje více než 36 isoform WT1, 4 hlavní vznikají kombinací sestřihu exonu 5 a KTS sekvence v exonu 9, shortWT1 (sWT1) vzniká použitím alternativního prvního exonu E1a. Varianty +5 byly spojeny s rezistencí k apoptóze (Reinshaw et al., 2004), sWT1 byla prezentována jako předpokládaná onkogenní varianta (Hossain et al., 2006). Naším cílem bylo zjistit, zda hladina konkrétní varianty nebo poměr variant může souviset s odpovědí na léčbu nebo mít prognostický význam pro pacienty s AML a CML, tedy zda je možné upřesnit informaci získanou analýzou celkové WT1 hladiny. Navrhli jsme, optimalizovali a validovali dva real-time PCR systémy: 1) Systém pro kvantifikaci 4 hlavních sestřihových variant WT1: kombinace společné sondy s forward primery hybridizujícími na rozhraní E5/6 nebo E4/6 a reverse primery hybridizujícími do oblasti obsahující nebo postrádající KTS. 2) Systém pro kvantifikaci varianty sWT1 a WT1 plně délky: PCR kombinující 1 společný reverse primer hybridizující do exonu 2, společnou sondu a forward primery hybridizující do exonu E1 nebo E1a. Dosud byly vyšetřeny celkové leukocyty periferní krve nově diagnostikovaných AML pacientů (n=41) a CML pacientů (n=25) v průběhu léčby imatinibem. Zjistili jsme, že čtyři hlavní sestřihové varianty WT1 (-5/-KTS, -5/+KTS, +5/-KTS, +5/+KTS) byly v AML i CML diagnóze exprimovány v podobném poměru 11:8:53:25 a 8:5:60:31. U vysoce rizikové AML v diagnóze jsme našli sníženou hladinu +5/+KTS a snížený poměr -KTS:

+KTS. Pokud jsme hodnotili expresi variant jako nezávislý prognostický faktor pro AML, našli jsme snížení poměru -5:+5 u pacientů rezistentních na léčbu ($p=0,0017$). V CML se varianta sWT1 objevuje až v akceleraci/blastické krizi. AML pacienti rezistentní k léčbě vykazují v diagnóze v porovnání s odpovídajícími pacienty zvýšenou hladinu varianty sWT1, avšak při současném zvýšení celkové exprese WT1. Závěrem, u AML poměr 4 variant i hladiny varianty sWT1 vykazují změny mezi rizikovými skupinami i skupinami s odlišnou reálnou odpovědí na léčbu. To naznačuje, že dané varianty WT1 mohou hrát roli při charakterizaci stavu i prognózy onemocnění. Vzhledem k počtu onemocnění, v nichž WT1 hraje roli, věříme, že námi vyvinuté PCR naleznou případně i širší využití. Podpořeno MZOUHKT2005.

(20) 1731.

Význam detekce mutací v MPL genu u pacientů s myeloproliferativními neopláziemi (srovnání dvou metod detekce: real-time PCR a sekvenace)

Kubová Barbora, Šimová Jarmila, Uvírová Magdaléna, Žmolíková Jana, Tichý Martin, Starostka David (CGB laboratoř a.s., Laboratoř molekulární genetiky, Ostrava; Nemocnice s poliklinikou, Havířov)

Myeloproliferativní neoplázie (MPN) jsou klonální onemocnění krvetvorby, která postihují prekursorovou hematopoetickou buňku. Nejčastěji se vyskytující somatickou mutací u MPN je mutace V617F v JAK2 genu. Vzhledem k tomu, že přibližně 50% pacientů s diagnózou esenciální trombocytémie (ET) a primární myelofibrózy (PMF) nese výše uvedenou mutaci, doporučuje se v současné době vyšetření dalších genetických změn – především mutace v genu pro trombopoetinový receptor (MPL). Získané mutace v MPL genu se vyskytují u tzv. BCR-ABL/Ph 1 negativních MPN, zejména u pacientů s diagnózou ET (1-5%) a PMF (5-10%). MPL gen (myeloproliferative leukemia virus oncogene, OMIM*159530) se nachází na chromozómu 1, lokusu p34 a kóduje receptor pro trombopoetin, transmembránovou tyrozin kinázu. Nejčastěji se vyskytujícími somatickými mutacemi v MPL genu jsou jednonukleotidové substituce v kodonu 515 (W515L a W515K). Uvedené mutace mají za následek konstitutivní, cytokin independentní aktivaci JAK2/STAT signální dráhy. Detekci mutací v exonu 10 MPL genu provádíme pomocí real-time PCR (MPL W515L/K MutaScreen™ kit, Ipsogen) a sekvenováním exonu 10 MPL genu (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems). V kazuistice (mutace W515L) uvádíme srovnání obou používaných metod. V současnosti zavádíme také sekvenaci exonu 11 MPL genu, jelikož se v literatuře uvádí, že více než 20% mutací by mohlo být opomenuto v případě analýzy zaměřené pouze na detekci mutací W515L a W515K. Real-time PCR: rychlá metoda s vysokou citlivostí – schopná detekovat až 1,5% DNA s mutací na pozadí genomické DNA bez mutace, detekce je však omezena pouze na mutace W515L a W515K, případně další mutace nejsou detekovány. Sekvenace: uvá-

děný detekční limit 15-20%, časově náročnější, schopná však detekovat všechny mutace v sekvenované oblasti MPL genu (méně časté substituce – např. W515R, W515A, S505N, delece/inzerce). V diagnostických kritériích WHO 2008 je pro diagnostiku MPN zahrnuta jak detekce mutací v JAK2, tak i v MPL genu. Detekce mutací v MPL genu může být tedy pomocným diagnostickým markerem v diferenciální diagnostice reaktivních, sekundárních trombocytémii a jiných forem MPN (přítomnost mutací v MPL genu je spojována s ET a PMF, nepřítomnost těchto mutací však nevyklučuje diagnózu ET a PMF).

(21) 1614.

Cytoredukční erythrocytaferéza v léčbě polycytemia vera – čtyřleté zkušenosti

Ptáček Jan, Sedláčková Karla (Hematologicko-transfuzní odd. Nemocnice, Frýdek-Místek)

Úvod: Při zvýšené hodnotě hematokritu dochází k nárůstu viskozity krve, zvýšení agregability erytrocytů a zpomalení průtoku krve v mikrocirkulaci se snížením perfuze kyslíkem důležitých orgánů (ledviny a mozek). Polycytemie vyvolává i zvětšení levé komory srdeční, snížení kontraktility myokardu a zvýšené riziko tromboembolických komplikací. Je-li hodnota hematokritu udržována na dolní hranici normy dochází k normalizaci rheologických parametrů a viskozity krve a možnost trombotických komplikací je podstatně redukována. Hodnotu hematokritu můžeme snížit opakovanými venepunkcemi nebo erythrocytaferézami. Soubor pacientů a metodika: V období 4 let byly erythrocytaferézy využity k léčbě souboru 12 pacientů s dg. polycytemia vera ve věku 52-79 let (1 žena, 11 mužů). U 6 pacientů byla současně indikována léčba hydroxyureou. Celkem bylo provedeno 47 cytaferéz na separátoru COBE-Spectra. Objem odebraných erytrocytů byl v průměru 731ml (363 – 882ml). K substituci byl použit fyziologický roztok, u odebraných objemů nad 750ml byl ještě přidán roztok 5% albuminu. Zahájení léčby bylo indikováno při průměrné hodnotě hematokritu 0,54 (0,49 – 0,59). Jako cílová hodnota byla zvolena hodnota hematokritu 0,41. Medián intervalů mezi jednotlivými výkony byl 6 měsíců, jeho délka se u jednotlivých pacientů velmi lišila v rozpětí od 1 do 26 měsíců. U žádného výkonu jsme nezaznamenali nežádoucí účinky, substituce kalcia nebyla pro nízký objem použitého antikoagulačního roztoku ACD-A prováděna. Diskuze: Vyšší ekonomické nároky na erythrocytaferézu ve srovnání s terapeutickou venepunkcí jsou kompenzovány u tohoto způsobu léčby možností odběru velkého objemu koncentrátu erytrocytů (v uvedeném souboru pacientů až 880ml) při jednom výkonu, což odpovídá odběru téměř 1800ml krve a ohleduplností k žilnímu systému pacienta. Izovolemickým provedením výkonu je eliminováno riziko vasovagální reakce a výkon je možno použít u kardiologicky kompromitovaných pacientů a pacientů vyšších věkových skupin. Úspora času pacienta v souvislosti s redukcí počtu návštěv lékaře není rovněž zanedbatelná. Erythrocytaferéza je u pacientů s dg. polycytemia vera vysoce účinná a bezpečná lé-

čebná metoda, v některých případech pomáhající oddálit zahájení léčby cytostatiky.

(22) 1845.**Koincidence chronické myeloidní leukemie (CML) a chronické lymfatické leukemie (CLL) – 3 případy z našeho pracoviště**

Skoumalová Ivana, Urbanová Renata, Rohoň Peter, Faber Edgar, Divoká Martina, Gazdová Jana, Holzerová Milena, Pikalová Zuzana, Jarošová Marie, Papajík Tomáš, Indrák Karel (*Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc*)

Výskyt sekundárních malignit u CLL je znám, současný výskyt CLL a CML je raritní. Na našem pracovišti jsme diagnostikovali CLL a CML u 3 pacientů. Výsledky: **PŘÍPAD 1.** U 57-letého muže dg. B-CLL (asymptomatická lymfocytosa) v 10/2007. Klinické st. Binet A, karyotyp +12, IgVH gen nemutovaný. Pro krátký zdvojovací čas lymfocytů podán 1 cyklus fludarabinu s CFA. Vzhledem ke změnám v rozpočtu leukocytů v 8/2008 cytogenetické vyšetření, stanovena dg. Ph+ CML, a2b3 BCR-ABL, střední riziko dle Sokala. V terapii pro CLL nepokračováno, zahájena léčba imatinibem 400 mg/den v 9/2008. V 5/2009 dosažena kompletní cytogenetická odpověď (CR) a velká molekulární odpověď (MR) v 1/2010. V 6/2009 diagnostikován adenocarcinom plic (klinické st. IV, T1N3M1 meta do mediastina a levé lopatky). Pokračováno v léčbě imatinibem s gemcitabinem. Terapie pro ca ukončena v 12/2009, pacient je v dobré kondici. **PŘÍPAD 2.** U 57-letého muže dg. Ph+CML, a2b3 BCR-ABL v 6/2009 (asymptomatická leukocytosa), vysoké riziko dle Sokala. V 8/2009 zahájena terapie imatinibem 400 mg/den a velká CR dosažena v 1/2010. V 2/2010 záchyt absolutní lymfocytosy a trombopenie. Imunofenotypizačně dg. B-CLL; ZAP 70 negativní, IgVH gen nemutovaný. Dle fluorescenční in situ hybridizace (FISH) delece 11q a cytogeneticky přídatná chromosomová změna (+16) v Ph+ klonu. Klinické st. Binet A, bez terapie pro CLL. Následně vývoj do blastického zvratu CML, mutace nenalezena. Pacient indikován k alogenní transplantaci. **PŘÍPAD 3.** U 71-letého muže dg. Ph+ CML, a2b2 BCR-ABL v 12/1999. Léčba interferonem alfa a perorálním AraC. Nedosažena CR, toxicita interferonu, od 1/2001 terapie imatinibem 400 mg/den. Kompletní CR dosažena v 1/2006, velká MR nedosažena. Pro absolutní lymfocytosu v 9/2004 imunofenotypizace a potvrzena dg. B-CLL (klinické st. Binet A, karyotyp s delecí 13q14, ZAP 70 pozitivní, IgVH gen mutovaný). Pacient bez terapie CLL do 2/2009 - léčba chlorambucilem a prednisone pro krátký zdvojovací čas lymfocytů a anemii. Terapie imatinibem přerušena, ale cytogenetická progresse CML. I přes obnovení léčby imatinibem hematologická progresse, potvrzena F311L mutace. Terapie změněna na inhibitor tyrosinkinázy 2. generace. Souhrn: Množství pacientů s CLL a CML bude vzhledem k prodloužujícímu se přežitím nemocných přibývat. Terapie těchto nemocných je výzvou pro klinické pracovníky. Tato práce je podporovaná grantem NS9949-3 (Ministerstvo zdravotnictví) a MSM 6198959205 (Ministerstvo vzdělávání, mládeže a sportu).

(23) 1820.**Detekcia mutácií v ABL kinázovej doméne BCR/ABL génu priamym sekvenovaním u pacientov s CML v slovenskej populácii**

Strhákova Lubica, Hojsiková Ivana, Geryková Bujalková Mária (*Medirex,a. s., Bratislava-SK*)

Chronická myeloidná leukémia je myeloproliferatívne ochorenie charakterizované prítomnosťou filadelfského chromozómu a/alebo fúzneho génu BCR/ABL. V súčasnosti je imatinib liekom 1. línie u pacientov s de novo diagnostikovaným ochorením CML. Najväčším terapeutickým problémom pri jeho podávaní je vznik rezistencie na liečbu a v priebehu 5 rokov ohrozuje 20-40 % chorých s CML. Cieľom nových liekov je prekonanie rezistencie na liečbu imatinibom novými inhibítormi tyrozínových kináz, ako sú dasatinib, nilotinib a bosutinib, avšak aj pri liečbe týmito inhibítormi sa stretávame s rezistenciou na liečbu. Metodika: Vzorky periférnej krvi pacientov s CML, bodové mutácie v ABL kinázovej doméne BCR/ABL génu detekujeme priamym sekvenovaním, vzhľadom na dĺžku sekvenovaného úseku (830 bázových párov) vykonávame u každého pacienta 4 sekvenačné reakcie. Výsledky: Z celkového počtu 48 pacientov s CML sme mutáciu v ABL kinázovej doméne zaznamenali u 10 pacientov (21%). 14 pacientov bolo v čase vyšetrenia mutácie v ABL kinázovej doméne BCR/ABL génu liečených imatinibom, 10 dasatinibom a 9 nilotinibom. U 15 pacientov s CML liečbu nepoznáme a v tomto súbore pacientov sme nezachytili žiadnu mutáciu. Celkovo sme zachytili 10 rôznych mutácií (M388L, E459K, M244V, F359V, D276G, T315I, G250E, L387M, Y253H, F317L). U 2 pacientov sme identifikovali súčasne 2 mutácie a obe v heterozygotnej forme. Pacient s mutáciou T315I exitoval. Záver: Sekvenovanie kinázovej domény BCR/ABL fúzneho génu umožňuje monitorovanie bodových mutácií BCR/ABL kinázovej domény u pacientov, ktorí sú liečení imatinibom alebo tyrozín kinázovými inhibítormi 2. generácie. Výhodou metódy je rýchlosť, nenáročnosť, postačujúca senzitivita homozygotného stavu mutácií, problémom ostáva senzitivita heterozygotnosti.

(24) 1796.**Retrospektívni analýza dlhodobých výsledkov liečby interferonem- α (INF- α) u nemocných s CML se zaměřením na pacienty s kompletní cytogenetickou a molekulární remisí (CCyR, CMR)**

Faber Edgar, Kuba Adam, Zapletalová Jana, Holzerová Milena, Rožmanová Šárka, Divoká Martina, Jarošová Marie, Indrák Karel

(*Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Oddělení statistiky Ústavu lékařské biofyziky LF UP, Olomouc*)

Úvod: INF- α byl hlavní konzervativní terapií před nástupem inhibitory tyrozínových kináz (TKI). Cílem naší studie bylo retrospektivně analyzovat pacienty s CML léčené na naší klinice INF- α se zvláštním ohledem na ty, kteří dosáhli CCyR a CMR. Materiál a metody: neselektovaný sou-

bor obsahoval 118 pacientů (žen z toho 51, tj. 43%) léčených INF- α v letech 1989 až 2006. Medián věku byl 50 let (18-71). Sokalův index byl nízký u 46, intermediární u 46 a vysoký u 25 nemocných. Pacienti byli léčeni INF- α v mediánu 12 měsíců (0,3-192 měsíců), nejčastěji dávkou 9 MU (1,5-10). Čas od diagnózy do zahájení léčby INF- α činil v mediánu 1 měsíc (0-43 měsíců). Během sledování 12 pacientů podstoupilo alogení a 8 autologní transplantaci krvetvorných buněk. 77 pacientů přešlo nakonec na léčbu TKI. Výsledky: Nejlepší CyR byla dosažena v mediánu 12 měsíců (0,3-47 měsíců) a to kompletní (20 pacientů; 18,9%), parciální (16 pacientů; 15,1%), malá (3 pacienti; 2,8%) a minimální (2 pacienti; 1,9%). 23 pacientů (21,7%) svou CyR v průběhu sledování ztratilo. Medián trvání nejlepší CyR byl 23 měsíců (1-167 měsíců). 9 pacientů s CCyR dosáhlo CMR, 3 pacienti v současné době pokračují v léčbě INF- α a 7 pacientů s CMR je bez léčby. Léčba INF- α byla ukončena u 115 pacientů z důvodů hematologické rezistence (22,6%), cytogenetické rezistence (23,5%), hematologické progresse (10,4%), cytogenetické progresse (16,5%) nebo intolerance (14,8%). U zbylých 12,64 % byly důvody ukončení různé, včetně CMR nebo transplantace. Pravděpodobnost přežití nemocných korelovala v log rank testu se Sokalovým indexem ($p=0,011$), s hladinou hemoglobinu ($p=0,001-0,03$) a počtem leukocytů ($p=0,023$). Závěry: Můžeme potvrdit, že nemocní měli po dosažení CCyR velmi dobrou prognózu. Zvláště dobrou perspektivu měli nemocní s dosaženou CMR, u nichž jsme mohli léčbu ukončit a všichni nadále udrželi dosaženou odpověď. Imunitní mechanismus působení INF- α příznivě ovlivnil výsledky následné léčby TKI. Práce byla podpořena granty NS9949-3 MZ ČR, MSM 6198959223 a MSM 6198959205 MŠMT ČR.

(25) 1772.

Optimalizace in vitro testování vlivu imatinibu na leukocyty pacientů s CML

Žáčková Markéta, Lopotová Tereza, Ondráčková Zuzana, Klamová Hana, Moravcová Jana
(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Pro sledování vlivu léčiv a různých agens na buňku jsou často využívány experimenty in vitro prováděné nejčastěji na buňkách modelových linií připravených z buněk pacientů s daným onemocněním nebo optimálně přímo na buňkách pacientů. V případě chronické myeloidní leukémie (CML) jsou využívány kultivace patientských leukocytů s imatinibem a dalšími tyrosin-kinázovými inhibitory (TKI) ke stanovení citlivosti pacientů k těmto léčivům. Podmínky kultivací záleží na parametrech, které jsou sledovány [White D. 2005, Blood 106(7), 2520-2526], [Cilloni, D. 2004, Cancer 101(5), 979-988]. Naším cílem bylo optimalizovat podmínky kultivací tak, aby je bylo možno použít pro více účelů a bylo možné z jedné kultivace získat co nejvíce potřebných informací o stavu i prognóze onemocnění. Optimalizovali jsme dobu inkubace leukocytů

s inhibítorem a používané koncentrace inhibítora. Hodnotili jsme aktivitu BCR-ABL kinázy (nepřímo fosforylací Crkl), hladinu transkriptů BCR-ABL a WT1 a míru apoptózy. Kultivace byly prováděny v časových intervalech 2h, 24h, 48h a 72h, při různých koncentracích imatinibu. Testy byly prováděny na celkových leukocytech CML pacientů. Jako Ph pozitivní kontroly byly použity buněčné linie K562, JURL-MK1 a CML-T1, jako negativní kontrola Ph negativní linie ML-2 a celkové leukocyty zdravých dárců. Potvrdili jsme, že vliv imatinibu na aktivitu BCR-ABL lze sledovat již po 2h, ale pro efekty na úrovni transkripce - následující inhibici BCR-ABL, je třeba buňky kultivovat déle. Po 72 hodinách již vysoké procento buněk prochází programovanou buněčnou smrtí anebo nekrozou, což může interferovat s výsledky a vede k nadměrným ztrátám materiálu. Doba kultivace 48hodin se jeví jako optimální jak pro sledování citlivosti pacientů k imatinibu tak i pro monitorování následných efektů inhibice BCR-ABL. Lze tedy uzavřít, že 48-hodinovou kultivaci lze použít nejen pro stanovení citlivosti pacientů k imatinibu, ale například i pro sledování závislosti různých buněčných dějů na aktivitě BCR-ABL. Potvrdili jsme tak možnost využití kultivací jako ekonomicky výhodné metodiky vhodné pro sledování změn probíhajících v CML buňkách po působení imatinibu a vytipování případných markerů citlivosti k léčbě. Podpořeno MZOUHKT2005

(26) 1770.

Sledování závislosti hladin miR-150 a miR-451 na aktivitě BCR-ABL a vzájemných vztahů miRNA a jejich targetů pomocí kultivace leukocytů CML pacientů s imatinibem

Lopotová Tereza, Žáčková Markéta, Klamová Hana, Machová Poláková Kateřina, Moravcová Jana
(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

MicroRNA (miRNA) jsou malé nekódující RNA inhibující translaci štěpením, vazbou a/nebo snížením stability cílových mRNA. Naše předchozí studie ukázala sníženou expresi miR-150 a miR-451 v leukocytech pacientů s CML v diagnóze a hematologickém relapsu (100% Ph+ buněk) v porovnání s hladinou naměřenou u zdravých dárců, u pacientů s velkou molekulární odpovědí. Myb (Lin et al., 2008) a MycN, targety miR-150, a GATA2 (Pase et al., 2009), target miR-451, přitom naopak vykazovaly v hematologickém relapsu a diagnóze overexpresi, MDR1 naopak downregulaci. Abychom zjistili, zda uvedené výsledky mohou souviset s BCR-ABL aktivitou a mohou být založené na skutečných funkčních vztazích, sledovali jsme jejich změny v průběhu kultivace buněk s imatinibem, selektivním inhibítorem BCR-ABL tyrosin-kinázy. Buňky leukemických linií i leukocyty nově diagnostikovaných CML pacientů (n=5) byly kultivovány s 1 a 10 μ M imatinibem a sklizeny po 2, 24, 48 hod. Aktivita proteinu BCR-

ABL byla imatinibem vzhledem k neovlivněné kontrole snížena a míra inhibice BCR-ABL zůstávala po celý průběh kultivace stabilní (hodnoceno mírou fosforylace Crkl). To umožnilo sledovat změny v expresi miRNA i předpokládaných targetů v celém průběhu kultivace. Zjistili jsme, že miR-150 vykazuje sníženou expresi v Ph+ buněčných liniích i leukocytech pacientů a ošetření buněk imatinibem nemá v průběhu kultivace na tuto hladinu vliv. Hladina Myb naopak zůstává v průběhu kultivace zvýšená a naznačuje tak, že Myb může být i v CML buňkách regulován prostřednictvím miR-150. Hladina MycN je variabilní, což naznačuje, že miR-150 patrně nepatří mezi výhradní regulátory této molekuly. Sníženou hladinu miR-451 se naopak ošetřením buněk linií i pacientů imatinibem daří restaurovat. Současně s nárůstem miR-451 dochází k poklesu GATA2, což naznačuje regulační závislost. MDR1 naopak po nárůstu miR-451 narůstá, což ukazuje spíše na nepřímý vztah. Závěrem lze říci, že získaná data ukazují, že zatímco snížená exprese miR-150 není přímo odvislá od aktivity BCR-ABL kinázy, downregulace miR-451 s aktivitou BCR-ABL s velkou pravděpodobností souvisí. V případě známých targetů Myb a GATA2 byl potvrzen jejich vztah ke sledovaným miRNA, v případě predikovaných MycN a MDR1, test ukázal na roli jiných regulátorů. Podpořeno MZOUHKT2005 a GAČR GA301/08/P154.

(27) 1751.

Stanovení plasmatických hladin imatinibu u pacientů s chronickou myeloidní leukémií - naše první zkušenosti

Bělohávková Petra, Voglová Jaroslava, Žák Pavel, Maláková Jana, Malý Jaroslav
(II. interní klinika – OKH FN a LF UK, Hradec Králové; ÚKBD FN, Hradec Králové)

Úvod: Imatinib v dávce 400 mg denně je standardní léčbou nemocných v chronické fázi chronické myeloidní leukémie (CML - CP). Vyšetření hladin imatinibu je užitečné provést v případech, kdy pacient na léčbu imatinibem dobře neodpovídá, při možných lékových interakcích, při závažných projevech toxicity imatinibu nebo při podezření, že nemocný lék neužívá. Úloha stanovení hladin imatinibu je stále zkoumána a budou nutná další data k ověření významu tohoto vyšetření. Souhrn: V loňském roce jsme u pacientů s CML začali vyšetřovat plasmatické hladiny imatinibu metodou kapalinové chromatografie. Hladina imatinibu byla odebírána 24 ± 2 hodiny po předchozí užití dávky. Ze zjištěných výsledků jsme se snažili stanovit, zda hladiny imatinibu korelují s dosažením optimální léčebné odpovědi. Prezentovaný soubor pacientů představuje 55 nemocných s CML - CP, kteří byli minimálně 12 měsíců léčeni imatinibem. Následně byl soubor rozdělen podle dosažené CCyR. Tento soubor je zastoupen 25 ženami a 30 muži s mediánem věku 58 let (rozpětí 32 – 83 let). Průměrná dávka imatinibu u pacientů je 386 mg/denně (rozpětí 200 – 600 mg). Redukce

dávek imatinibu byla nutná v šesti případech pro přetrvávající leukopenii nebo trombocytopenii. Zjištěná průměrná hladina imatinibu celého souboru byla 935 ng/ml (± 402 ng/ml). Ze souboru 48 pacientů dosáhlo CCyR ve 12 měsících s průměrnou hladinou imatinibu 952 ng/ml (± 415 ng/ml) a 7 pacientů, kteří CCyR nedosáhli, mělo průměrnou hladinu imatinibu lehce nižší – 831 ng/ml (± 380 ng/ml). Stejnou skupinu pacientů jsme také zhodnotili podle dosažené MMR v 18. měsíci léčby imatinibem (hodnoceno 52 pacientů). Průměrná hladina imatinibu u 35 nemocných s MMR byla 947 ng/ml (± 372 ng/ml) vs. průměrná hladina u 17 pacientů ne-MMR 938 ng/ml (± 468 ng/ml). Výsledky: Naše prezentované výsledky neprokázaly statistickou významnost ve zjištěných plasmatických hladinách u nemocných, kteří optimálně odpověděli na léčbu imatinibem oproti pacientům, kteří této odpovědi nedosáhli. Ve dvou případech zjištěná hladina imatinibu vedla k úpravě dávkování imatinibu (jednou zvýšení dávky imatinibu na 600 mg a jednou snížení dávky na 300 mg pro toxicitu imatinibu). Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906, EUTOS pro CML, CAMELIA

(28) 1743.

Liečba pacientov s chronickou myelocytovou leukémiou (CML) inhibítormi tyrozínkinázy 2. generácie na KHaT Bratislava

Sninská Zuzana, Martišová Michaela, Demečková Eva, Mistrík Martin
(Klinika hematológie a transfuziológie LFUK, SZU a FNSP, Bratislava-SK)

Úvod: Liečba CML dosiahla v poslednom desaťročí výrazný progres. Okrem klasickej liečby imatinib mesylátom sú dostupné aj druhogeneračné tyrozínkinázové inhibítory (TKI), nilotinib a dasatinib, ktoré u veľkej časti pacientov rezistentných na štandardnú liečbu navodia adekvátnu liečebnú odpoveď. Súbor: Od r.2006 sme na KHaT liečili 29 pacientov (13 mužov) s CML TKI 2.generácie vo veku 34–77 rokov (medián 51), 28 bolo v chronickej, 1 v blastovej fáze och. Podľa Sokalovho indexu bolo 12 pac. nízko, 8 stredne a 9 vysoko rizikových. Všetci boli pred zahájením liečby TKI 2.gen.liečení imatinibom 1 až 72 (medián 21) mesiacov v štandardnej dennej dávke 400mg, u 18 z nich sme ju eskalovali na 600mg na obdobie minimálne 3 mesiacov. Výsledky: Dôvodom na zahájenie liečby dasatinibom alebo nilotinibom bola u 25 pac.rezistencia a u 4 intolerancia liečby imatinibom (2xhematologická toxicita, 1xhepatotoxicita, 1xkožná toxicita). Mutácie sme vyšetřili u 6 pacientov s 2 pozitívnymi výsledkami. 17 pacientov bolo liečených nilotinibom 2–38 mesiacov (medián 15), v liečbe pokračuje 11 z nich, 6 liečbu ukončili (4 pre rezistenciu, 2 pre intoleranciu) a prešli na dasatinib. Po 3 mesiacoch 3 dosiahli CMR, 4 CCgR, 4 MCgR a 6 PCgR. Po 12 mesiacoch (11 pac.) sú 3 v CMR, 1 v MMO, 1 v CCgR a 6 vo PCgR. 12 pacien-

to bolo liečených dasatinibom 2–25 (medián 9,5) mesiacov, v liečbe pokračuje 8 z nich, 4 liečbu ukončili (3 pre rezistenciu, 1 pre toxicitu) a prešli na nilotinib. Po 3 mesiacoch 2 dosiahli CMR, 2 MMR, 2 CCgR, 2 MCgR a 1 PCgR. Nežiaduce účinky sa v priebehu liečby vyskytli celkovo u 16 pac., väčšinou ľahkého až stredne ťažkého stupňa. Z prejavov hematologickej toxicity sme anémiu CTC III pozorovali u 2 a trombocytopeniu CTC III u 3 pac., z ostatných sa raz vyskytla hepatotoxicita CTC II a dvakrát závažné pleurálne efúzie (pri dasatinibe). K 31.3.2010 žije 25 z 29 pac. (86,2 %), všetci 4 exitovali v blastovej fáze ochorenia. Záver: CML ešte pred 10 rokmi nemala takú priaznivú prognózu a jej priebeh zásadnejšou mierou mohla ovplyvniť jedine alogénna transplantácia, spojená s významným rizikom peritransplantačnej morbidita a mortality. Dnes v ére imatinibu a nových TKI sa prognóza pac. s CML zásadne zlepšila. Hoci imatinib je vysoko efektívny a dobre tolerovaný, rozvoj rezistencie predstavuje klinickú výzvu a miesto pre nové TKI, dasatinib a nilotinib. Vysvetlivky: PCgR – parciálna, MCgR – veľká, CCgR – kompletná cytogenetická remisia, MMR – veľká, CMR – kompletná molekulová remisia.

(29) 1742.

Stanovení intracelulární koncentrace imatinibu u pacientů s CML

Potěšil David, Rážga Filip, Stejskal Stanislav, Tesařová Lenka, Šimara Pavel, Peterková Martina, Dvořáková Dana, Mayer Jiří, Ráčil Zdeněk, Zdráhal Zbyněk (*Oddělení funkční genomiky a proteomiky, PŘF MU, Brno; Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, FN, Brno; Centrum analýzy biomedicínského obrazu, FI MU, Brno; Interní hematologická klinika, FN, Brno*)

Imatinib, inhibitor BCR-ABL tyrosinkinázy, je v současné době základem terapie chronické myeloidní leukémie (CML). U části nemocných s CML však terapie imatinibem selhává nebo vede pouze k suboptimální odpovědi. Farmakokinetika imatinibu je jedním z faktorů, který se může uplatnit v průběhu selhání léčby. Data sledující vztah plazmatické koncentrace imatinibu s léčebnou odpovědí jsou často kontraverzní. Studium intracelulární koncentrace imatinibu představuje další krok při objasnění mechanismu účinku léčiva. V porovnání s kvantifikací imatinibu v krevní plasmě, jde o komplexnější problém při požadavku na maximální možnou správnost získaných výsledků. Po optimalizaci analytických nástrojů byly proto ověřovány klíčové kroky preanalytické (příprava buněčného vzorku) i analytické fáze (izolace a stanovení intracelulárního imatinibu). V úvodních experimentech byl intracelulární obsah imatinibu zjišťován v leukocytech, které byly izolovány z plné krve. Postup izolace intracelulárního imatinibu byl předmětem optimalizace. K vlastnímu stanovení a kvantifikaci imatinibu bylo využito kapalinové chromatografie na reverzní fázi

v kombinaci s hmotnostním spektrometrem s iontovou pastí vybaveným nanospřejem (nanoLC-MS/MS). Imatinib byl kvantifikován pomocí vnitřního standardu (2H8-imatinib), který byl ke vzorku přidáván před začátkem izolačního postupu. Bylo testováno několik postupů izolace imatinibu z leukocytů. Kritickým krokem se ukázalo být rozrušení buněk detergentovou lyzí, případně ultrazvukem. Při následující izolaci imatinibu se nejlépe osvědčil postup založený na extrakci imatinibu pomocí organického rozpouštědla. Dále byly studovány faktory ovlivňující správnost analýz jako např. časová prodleva mezi odběrem a zpracováním vzorku krve, podmínky extrakce imatinibu z leukocytů, metody počítání buněk. Po optimalizaci jednotlivých kroků zpracování krve a izolace imatinibu z leukocytů a vlastního LC-MS stanovení bylo dosaženo limitu kvantifikace 100 pg imatinibu/vzorek (cca 5×10^6 buněk). Relativní směrodatná odchylka analýz paralelně připravených vzorků ($n = 5$) byla 9 %. V současné době probíhá ověření navrženého postupu na úvodní sérii pacientů. Práce byla podporována projekty Ministerstva zdravotnictví ČR (reg.č NS9683-3) a Ministerstva školství, sportu a tělovýchovy ČR (MSM0021622415 a MSM0021622430).

(30) 1720.

Dasatinib suppresses MEK-ERK pathway activity without sustained BCR-ABL inhibition and promotes BIM dependent apoptosis in chronic myeloid leukaemia cells

Šimara Pavel, Stejskal Stanislav, Peterková Martina, Mayer Jiří, Ráčil Zdeněk, Koutná Irena, Kozubek Michal (*Centre for Biomedical Image Analysis, Faculty of Informatics, Masaryk University, Brno; Department of Internal Medicine Hemato-Oncology, Masaryk University and University Hospital, Brno*)

Chronic myeloid leukaemia (CML) is a clonal disorder of haematopoietic stem cells, characterized by the BCR-ABL oncogene. The BCR-ABL oncogene encodes constitutively active tyrosin kinase. It was previously shown, that transient inhibition of BCR-ABL by dasatinib is sufficient to commit CML cells to apoptosis (Shah 2008). Dasatinib mediated apoptosis in K562 cell line is accompanied by increasing expression level of proapoptotic protein BIM. Our results confirmed high mRNA levels of BIM in both transiently and continuously treated (100nM dasatinib) K562 cells compared to low dose continuous (1nM) dasatinib treatment. Intracellular level of BIM protein is regulated via phosphorylation by ERK protein kinase and subsequent degradation in the proteasome. In our research, we inhibited proteasome degradation by bortezomib. Combination of dasatinib and bortezomib led to rapid increase in BIM expression after 20 minutes. However, we have not found any difference in cell viability caused by combinational treatment with bortezomib and dasatinib neither in continuous or in transient exposure.

BIM degradation is enhanced by BCR-ABL downstream signalling pathway MEK-ERK, known to be extremely active in CML cells. Dasatinib blocks MEK-ERK pathway by BCR-ABL targeting. Surprisingly, our results reveal sustained inhibition of MEK-ERK pathway even in the case of re-activation of BCR-ABL after drug wash-out, leading to activation of proapoptotic BIM expression and inhibition of its degradation. These findings suggest that equal increase of BIM in the case of transient and continuous dasatinib treatment is caused by MEK-ERK inhibition. This project is supported by grant of the Ministry of Education of Czech Republic NPVII (2B06052).

(31) 1710.

Harmonizace molekulárního monitorování hladiny transkriptů BCR-ABL a detekce mutací v kinázové doméně BCR-ABL u chronické myeloidní leukémie v ČR

Machová Poláková Kateřina, Rulcová Jana, Zemanová Karla, Nádvorníková Sylvie, Moravcová Jana
(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Léčba chronické myeloidní leukémie (CML) inhibitory tyrozinových kináz vyžaduje úzké propojení s molekulárním monitorováním léčebné odpovědi, založeném na kvantifikaci hladiny transkriptů BCR-ABL. Variabilita metodik mezi laboratořemi znemožňuje vzájemně porovnávat léčebné výsledky na molekulární úrovni. Aby bylo možno výsledky laboratoří co nejvíce přiblížit, případně je upravit přečtovými koeficienty, byly v rámci mezinárodní standardizace navrženy: primery a próba pro major BCR-ABL, primery a próby pro doporučené kontrolní geny (GUS, ABL, B2M) a standardy pro výpočet počtu kopií (Gabert et al. *Leukemia* 2003;17:2318 a Beillard et al. *Leukemia* 2003;17:2474). Současně bylo navrženo schéma pre-PCR i PCR kroků včetně způsobu výpočtu hladiny transkriptu BCR-ABL. V roce 2009 proběhlo již 3. kolo mezilaboratorního porovnávání zkoušek (MPZ) v oblasti monitorování hladiny transkriptů BCR-ABL v ČR, kterého se zúčastnilo 5 laboratoří. MPZ v ČR je součástí mezinárodního programu EUTOS for CML, který má za cíl harmonizovat vydávané výsledky dle mezinárodní stupnice (IS). Referenční laboratoří (RL) odpovědnou za organizaci tohoto porovnávání v ČR je Pilotní pracoviště jmenované na základě akreditačního řízení Českým institutem pro akreditaci. RL je součástí NRL pro DNA diagnostiku ÚHKT akreditovanou ČIA. Porovnávání bylo prováděno na otestovaných, předem připravených vzorcích s různou koncentrací BCR-ABL (dekadická řada). Z výsledků zaslanych jednotlivými laboratořemi byla hodnocena citlivost testu, linearita měření, parametry kvantifikace kontrolního genu a parametry kvantifikace genu BCR-ABL. Laboratoře, které v MPZ 2009 uspěly, obdržely certifikát. Ostatním byly popsány zjištěné nedostatky s doporučením, jak je odstranit, s možností nového přezkoušení po jejich odstranění. RL nabízí veškerou technickou podporu, možnost konzultací i praktické provede-

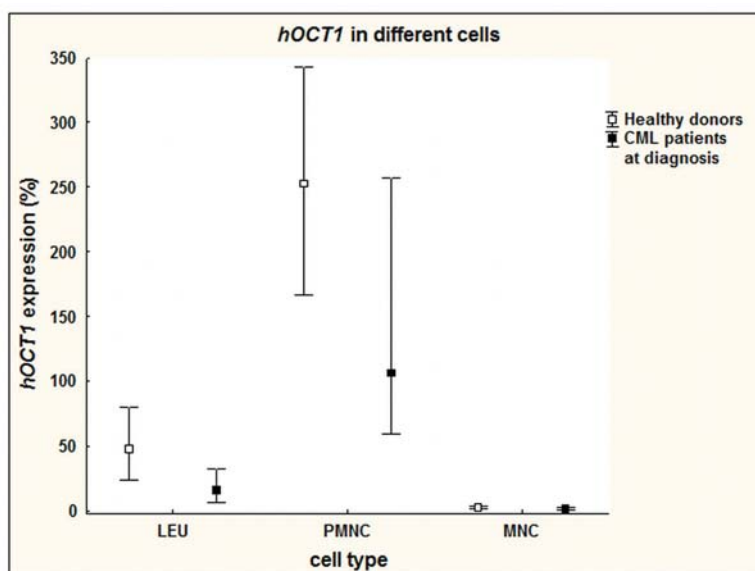
ní analýz na svém pracovišti. V roce 2010 proběhne rozšířené testování laboratoří na základě většího počtu vzorků pacientů podle návrhu ELN. Z výsledků testování budou určeny přečtovové koeficienty pro laboratoře, které úspěšně projdou MPZ. Potřeba standardizace je nezbytná i pro detekci BCR-ABL mutací. První testovací kolo v rámci EUTOS proběhlo na podzim v roce 2009 za účasti RL jednotlivých zemí. S výstupy testování budeme seznámeni na mítingu ELN, který předchází OHD, proto budeme moci referovat o jistě zajímavých výsledcích. První testovací kolo detekce mutací plánuje RL pro ČR uskutečnit v roce 2010.

(32) 1646.

The assessment of human organic cation transporter 1 (hOCT1) mRNA expression in patients with chronic myelogenous leukemia is affected by the proportion of different cells types in the analyzed cell population

Ráčil Zdeněk, Rázga Filip, Burešová Lucie, Jurček Tomáš, Dvořáková Dana, Žáčková Daniela, Mayer Jiří
(Interní hematologická klinika LF MU a FN, Brno; IBA, MU, Brno)

Objectives: The monitoring of hOCT1 mRNA expression in patients with chronic myelogenous leukemia (CML) was used for predicting the response to imatinib (IMA) treatment. However, different cell populations from patients who received various degrees of pretreatment were used for this analysis. Therefore, several biases in the hOCT1 expression results and their interpretation may arise. Patients & Methods: We investigated hOCT1 mRNA expression in different cell populations of peripheral blood (PB) from healthy volunteers (n=66) and in IMA naïve de novo CML patients (n=23) by analyzing changes in hOCT1 mRNA expression during the first 6 months of IMA therapy. The relationship of hOCT1 mRNA expression in a percentage of immature myeloid cells in PB with BCR/ABL transcript levels (both as markers of disease burden) was estimated. Results & Conclusions: The hOCT1 mRNA expression was significantly higher in PB polymorphonuclear cells (PMNC) compared to mononuclear cells (MNC). The hOCT1 mRNA expression in total PB leukocytes is therefore preferentially determined by the percentage of PMNC. Expression in each analyzed group of cells was always significantly lower in IMA naïve de novo CML patients compared to healthy volunteers (p<0.001). This difference disappeared after the initiation of IMA therapy, suggesting that CML tumor burden and the degree of pretreatment at the time of monitoring were both influencing factors. This was confirmed by a significant relationship between hOCT1 mRNA expression, the percentage of immature myeloid cells at time of diagnosis (p=0.004), and BCR/ABL transcript levels at the first month after the start of IMA treatment (p=0.006).



	LEU		PMNC		MNC	
N	66	23	35	15	33	15
Mean	87.7	29.1	393.9	142.2	4.6	1.6
Median	47.7	16.1	252.4	106.6	2.6	1.3
25-75%	23.2-80.0	6.8-32.8	166.8-342.7	59.9-257.3	1.9-3.6	1.0-2.3
Min.-max.	1.9-1160.2	0.5-146.7	4.4-3032.6	4.1-391.1	1.0-33.1	0.6-2.9

(33) 1627.**Výsledky liečby pacientov v chronickej fáze chronickej myelocytovej leukémie na HOK v Olomouci v rokoch 2000-2009**

Rohoň Peter, Rožmanová Šárka, Zapletalová Jana, Skoumalová Ivana, Divoká Martina, Holzerová Milena, Jarošová Marie, Indrák Karel, Faber Edgar
(Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc; Ústav lekárskej biofyziky LF UP, Olomouc)

Chronická myelocytová leukémia (CML) je klonovou poruchou hemopoetickej kmeňovej bunky s jej diferenciáciou prevažne do myeloidného radu. V súčasnej ére imatinibu (IM) a nových inhibítorov tyrozínových kináz (TKI) sa prognóza a kvalita života pacientov s CML zásadne zlepšila. V predloženej práci analyzujeme 110 dospelých pacientov s diagnózou CML v chronickej fáze, ktorí užívali IM či TKI 2. generácie v rokoch 2000-2009. 40 pacientov (36.4 %) začalo liečbu IM v 1. línii a 70 (63.6 %) po predchádzajúcej liečbe interferónom- α (IFN- α) (IM v 2. línii). Zo sledovaného súboru dlhodobo prežíva 104 pacientov (94.5 %), pravdepodobnosť 6-ročného prežitia bola 94 %. Pri porovnaní doby dosiahnutia odpovede pri liečbe IM v 1. a 2. môžeme konštatovať, že kompletnú cytogenetickú odpoveď dosiahlo 87.5 % vs. 80.0 % pacientov v mediáne 7 vs. 15 mesiacov ($p=0.02$), veľkú molekulovú odpoveď 67.5% vs. 41.4 % pacientov v mediáne 16 vs. 17 mesiacov ($p=0.34$) a kompletnú molekulovú odpoveď 32.5 vs. 40.0 % pacientov v mediáne 24 vs. 24 mesiacov ($p=0.42$). Výsledky liečby IM v 1. línii korelujú s literárnymi údajmi. Dosiahnuté celkové prežitie cho-

rých liečených IM v 2. línii po IFN- α je po 6 rokoch 95.4 % a patrí k najlepším z uvádzaných v literatúre. Z prognostických indexov sa ukázala výborná korelácia Sokalovho skóre a OS. Nezávislým prognostickým faktorom pre OS, prežitie bez progresie a prežitie bez udalosti boli ELN kritériá. Cytogenetická a molekulová progresia sa pri liečbe IM v oboch skupinách vyskytla u 27 pacientov (24.5%) a u 9 (8.2%) z nich bola potvrdená mutácia v ABL kinázovej doméne. Zo skupiny osôb s mutáciami mali 2 pacienti komplexný karyotyp, v jednom prípade sa súčasne počas liečby objavila v Ph negatívnom klone trizómia chromozómu 8. Práca je podporená: NS9949-3 IGA MZ ČR, MSM 6198959223 MŠMT ČR, MSM 6198959205 MŠMT ČR a LF_2010_004.

EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE**(34) 1688.****Sledování plazmatických hladin vorikonazolu u hematoonkologických pacientů**

Winterová Jana, Ráčil Zdeněk, Maláškova Ludmila, Mayer Jiří

(Interní hematoonkologická klinika FN, Brno; Oddělení klinické biochemie FN, Brno)

Úvod: Vorikonazol je širokospektrální antimykotikum používané v léčbě invazivních mykotických infekcí. Vyznačuje se velkou variabilitou dosažených plazmatických koncentrací, která je způsobená rozdílnou resorpcí (po perorálním užití) a četnými lékovými interakcemi. Měření plazmatických koncentrací vorikonazolu v průběhu léčby umožňuje individualizovat dávku a zlepšovat efektivitu antimykotické léčby. Metodika a cíle: Byla provedena retrospektivní analýza laboratorních výsledků naměřených plazmatických koncentrací vorikonazolu a klinických parametrů u pacientů léčených vorikonazolem na IHOK od 8/2005 do 1/2010. Hladina vorikonazolu byla měřena vysokoučinnou kapalinovou chromatografií. Výsledky: V uvedeném období bylo vyšetřeno celkem 836 vzorků plazmy od 148 pacientů. Vorikonazol byl podáván v 38 % jako profylaktická léčba, v 10% jako empirická antimykotická terapie a v 48 % jako preemptivní terapie invazivní mykotické infekce. Pouze ve 4% případů byl vorikonazol podáván jako cílená léčba prokázané invazivní mykózy. Pacienti užívali vorikonazol v celkové denní dávce 200-800mg. Naměřené plazmatické hladiny vorikonazolu se pohybovaly v rozmezí 0,2-13,4 μ g/ml. 9,8% ($n=82$) ze všech vyšetřovaných vzorků bylo pod hranicí detekce použité metody (0,2 μ g/ml). Plazmatické hladiny vorikona-

zolu po standardní denní dávce 400 mg byly při perorálním podávání 0,2-7,46 μ g/ml (medián 1,35 μ g/ml) a při intravenózním podávání 0,2-13,41 μ g/ml (medián 1,47 μ g/ml). U 257 vyšetřovaných vzorků (46%) při standardní dávce 400 mg denně byla naměřená plazmatická hladina \leq 1 μ g/ml, tedy pod hranici spojované s lepší odpovědí na léčbu invazivní aspergilózy. Navýšení denní dávky z 400 na 600 mg vedlo v 12 případech k vzestupu plazmatické koncentrace vorikonazolu nad 1 μ g/ml a u 10 pacientů došlo k poklesu anebo byla koncentrace stejná. Koncentrace vorikonazolu \geq 5 μ g/ml byla naměřena ve 12 vzorcích (2%) od 12 pacientů při standardním denním dávkování 400mg. Projevy toxicity vztahované k léčbě vorikonazolem byli ale pozorovány pouze u 3 pacientů-1x neurotoxicita a 2x hepatotoxicita. Závěr: Měření a sledování plazmatických koncentrací v průběhu léčby vorikonazolem umožňuje úpravu dávky pro jednotlivého pacienta, co vede k dosažení účinné efektivní koncentrace a zlepšení odpovědi na léčbu u vysoce rizikových hematologických pacientů. Stanovení plazmatické koncentrace může pomáhat v rozpoznání nežádoucích účinků a toxicity souvisejících s léčbou vorikonazolem. Podpořeno IGA MZ ČR NS/10441-3/2009

(35) 1732.

Sledování virové nálože EBV a adenovirů u pacientů po alogenní transplantaci krvetvorných buněk

Volfová Pavlína, Winterová Jana, Lengerová Martina, Ráčil Zdeněk, Paloušová Dita, Hrnčířová Kristýna, Tošková Martina, Weinbergerová Barbora, Mayer Jiří
(*Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika LF MU a FN, Brno; Interní hematologická klinika LF MU a FN, Brno*)

Úvod: Infekce způsobené EBV a adenoviry (AD) představují léčebné komplikace pacientů po alogenní transplantaci (aloTx) krvetvorných buněk. Metody: U pacientů léčených na IHOK od 8/07-5/09 byla retrospektivně stanovena virová nálož EBV a AD dvěma real-time PCR metodami ve vzorcích DNA z periferní krve (PB) a analyzovány další klinické parametry. Výsledky: Celkem bylo na EBV vyšetřeno 728 vzorků 37 pacientů (3-43 PB/pacient, max. doba sledování 324 dní po Tx). Virová nálož se pohybovala mezi 0-6894 kopií/ μ g DNA (medián 3). U 33 vzorků (4,5%) od 6 pacientů (16%) dosáhla \geq 1000 kopií/ μ g DNA. U 3 pacientů se jednalo o ojedinělou pozitivitu a všichni byli bez klinické symptomatologie. 1 pacientka byla léčena pro toxoplasmózu CNS a v době aktivní infekce došlo i k vzestupu kopií EBV, který po terapii toxoplasmózy spontánně klesl. Další pacient byl v době vzestupu nálože EBV léčen pro opakovanou CMV reaktivaci a chronické GVHD. Po zvládnutí komplikací spontánně klesla i nálož EBV, pacient byl stále bez neurologické či jiné symptomatologie. Ve sledovaném období se pouze u jediné pacientky rozvinula neurologická symptomatologie a současně byla detekována vysoká nálož EBV v PB i likvoru (56025 kopií/ml) a u pacientky

byla diagnostikována potransplantační EBV-asociovaná encefalopatie. Po léčbě rituximabem došlo k poklesu EBV a mírnému zlepšení klinického stavu, později však umírá na progresi základního onemocnění. Na základě předchozích výsledků se od 5/09-3/10 prováděla detekce EBV pouze při klinickém podezření na infekci. Bylo vyšetřeno 104 PB 47 pacientů (1-15 PB/pacient) s virovou náloží 0-856169 kopií/ μ g DNA (medián 20). V tomto období bylo pouze u 1 pacientky diagnostikováno „probable“ potransplantační EBV lymfoproliferativní onemocnění (lymfadenopatie, febrilie, neurologická symptomatologie, 856169 kopií/ μ g DNA EBV v PB). I přes léčbu rituximabem a pokles EBV nálože došlo k progresi neurologických symptomů a úmrtí. V období 8/07-5/09 byla retrospektivně provedena detekce AD v 685 vzorcích 36 pacientů stejného souboru s počtem 0-4 kopií/ μ g DNA, tedy u všech s negativním výsledkem. Závěr: Prokázali jsme malou incidenci významného vzestupu EBV u nemocných po aloTx krvetvorné tkáně. Pouze u 2 pacientů byla spojena s klinickou korelací, ale u 1 pacienta měla EBV PTLD fatální průběh. Výskyt AD jsme u sledovaných pacientů neprokázali. Rutinní monitoring EBV/AD nemocných po aloTx krvetvorných buněk není nezbytný a vyšetření lze provést až při rozvoji klinických projevů.

(36) 1737.

Analýza subpopulací B lymfocytů v periferní krvi zdravých osob

Zarbochová Pavla, Kovářová Lucie, Suská Renata, Penka Miroslav, Hájek Roman
(*Ústav Experimentální Biologie, PřF MU, Brno; Oddělení klinické hematologie - Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, FN, Brno; Oddělení klinické hematologie, FN, Brno; Babákův výzkumný institut, Univerzitní výzkumné centrum - Česká myelomová skupina, LF MU, Brno*)

Úvod: B lymfocyty jsou základní buňky protilátkové imunity. Během svého pozdního vývoje, závislého na antigenu, procházejí řadou vývojových stádií, které jsou fenotypově odlišitelné. Cílem práce bylo zjistit normální zastoupení jednotlivých subpopulací B lymfocytů a dále ověřit, zda gradientová separace, využitá k jejich obohacení, nezpůsobuje výrazné změny v jejich zastoupení. Soubor analyzovaných osob a metody: Celkem byla zhodnocena periferní krev (PK) 20 zdravých osob, analýza byla provedena v plné PK (pPK), na separovaných mononukleárních buňkách (MNB) a dále v rámci CD19+ lymfocytů separovaných metodou RosetteSep (R). Pomocí průtokové cytometrie pak byly B lymfocyty identifikovány jako CD19+ buňky, přičemž jednotlivé subpopulace byly rozlišeny dle rozdílné exprese znaků IgD, CD27 a CD38 na naivní B lymfocyty (IgD+CD38-), aktivované B lymfocyty (IgD+CD38+), pre-GC buňky (IgD+CD38++), plazmablasty (IgD-CD38++), rané paměťové B lymfocyty (IgD-CD38+) a pozdní paměťové B lymfocyty (IgD-CD38-). Pa-

Tab. č. 1: Zastoupení jednotlivých subpopulací B lymfocytů [medián (min-max)]

B subpopulace (n=20)	pPK (%)	MNB (%)	R (%)	pPK vs. MNB	pPK vs. R	MNB vs. R
naivní B	8,5 (2,8 - 24,8)	7,0 (3,5 - 19,2)	7,1 (3,8 - 19,3)	p<0,01	p<0,05	n.s.
aktivované B	61,0 (26,4 - 85,5)	55,3 (18,1 - 73,1)	56,3 (20,8 - 75,9)	p<0,001	p=0,001	p<0,01
preGC	2,8 (0,3 - 12,2)	1,6 (0,2 - 8,7)	1,8 (0,3 - 12,0)	p=0,01	n.s.	n.s.
časné paměťové B	11,1 (4,7 - 30,7)	15,6 (8,6 - 29,2)	14,0 (8,0 - 26,9)	p<0,001	p<0,001	p<0,05
pozdní paměťové B	11,2 (1,6 - 30,2)	14,1 (4,7 - 35,7)	10,5 (3,4 - 30,7)	p<0,001	n.s.	p<0,001
nepřesmyknuté pam. B	4,7 (1,7 - 22,1)	4,7 (1,4 - 17,5)	4,0 (1,3 - 18,0)	n.s.	p<0,02	p=0,02
přesmyknuté pam. B	17,6 (2,2 - 44,5)	24,6 (8,2 - 53,6)	19,2 (5,3 - 49,4)	p<0,001	n.s.	p<0,001
plazmablasty	2,0 (0,5 - 12,8)	3,3 (0,9 - 19,4)	4,5 (0,9 - 16,8)	p<0,001	p<0,001	n.s.

měťové CD19+CD27+ buňky byly dále rozděleny na buňky IgD+ bez izotypového přesmyku anebo IgD- s izotypovým přesmykem. Výsledky: Gradientová separace MNB překvapivě významně snížila zastoupení CD19+ B lymfocytů ve vzorku oproti analýze v plné PK [medián 4,3% (rozsah 1,8-8,5) vs. 6,7% (2,1-13,6); p<0,001]. Dle očekávání pak RosetteSep metoda (gradientová centrifugace s deplecí CD19- buněk) významně zvýšila (p<0,001) zastoupení CD19+ B lymfocytů [74,3% (62,7-91,6)] ve srovnání s předchozími přístupy. Zastoupení jednotlivých subpopulací se různou mírou lišilo při porovnání jednotlivých metod, přičemž nejvyšší počet významných rozdílů byl nalezen při porovnání vzorků plné PK a MNB (viz tab. č. 1). Je zřejmé, že separace mění zastoupení subpopulací B lymfocytů, a proto není vhodným přístupem pro analýzy, nicméně metoda RosetteSep může být s výhodou využita pro obohacení velmi nízké zastoupené populace B lymfocytů např. u pacientů po prodělané léčbě. Závěr: Analýza nemaniipulované PK poskytuje relativně nezkrácené výsledky zastoupení jednotlivých subpopulací B lymfocytů, a je proto nejvhodnější pro jejich kvantifikaci. Získané výsledky budou použity jako kontrolní hodnoty pro srovnávací analýzy subpopulací B lymfocytů u pacientů s monoklonálními gamapatiemi. Podpořeno projekty GAČR 301/09/P457, MŠMT LC06027, MSM0021622434, IGA 10408-3, IGA 10406-3 a GAČR P304/10/1395.

(37) 1738.**Srovnání metod hodnocení přežití a proliferace lymfocytů v autologní smíšené lymfocytární reakci s dendritickými buňkami: inkorporace 3H-thymidinu a diferenciálního gatingu.**

Veselá Romana, Doležalová Ludmila, Rychtrmocová Hana, Kideryová Linda, Pytlík Robert, Trněný Marek (Laborať exp. buněčné terapie, 1. interní klinika - klinika hematologie 1. LF UK a VFN, Praha; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; 1. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha)

Dendritic cells (DCs) are generally considered to be the most potent antigen-presenting cells which play the key role in T-lymphocyte proliferation and induction of antitumour response. The mixed lymphocyte reaction of T-lymphocytes and DCs is one of essential instruments for immunological mechanisms studies. Conventionally used method for determination of T-lymphocytes proliferation, incorporation of 3H-thymidine, provides only general information on survival and proliferation of T-lymphocytes. The method of flow cytometry and differential gating seems to be more suitable for quantitative and also qualitative analysis of T-lymphocyte proliferation. It is based on time limited acquisition of events and on its distribution according to forward and side

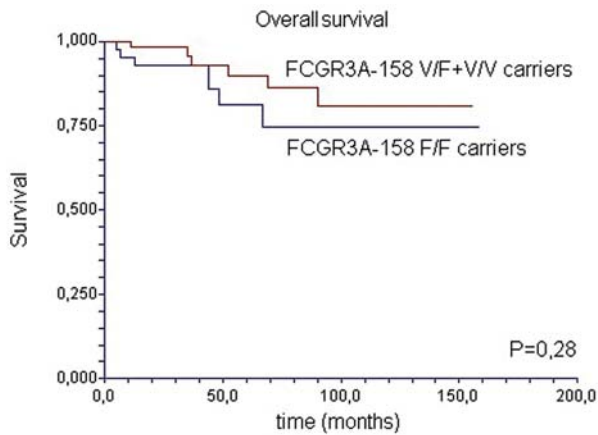
scatter values. We decided to compare these two methods and determine mutual correlation and compatibility. Nine untreated patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL), one patient with relapsed CLL and one untreated patient with B-cell non-Hodgkin lymphoma were studied. In all cases DCs promoted the survival and proliferation of both CD4 and CD8 lymphocytes but the response was much more higher in CD4 subset. Both methods retain consistent tendency of survival and proliferation of CD4/CD8 lymphocytes. However, the correlation of these methods was not convincing. Therefore, both these methods might be used for evaluation of MLR, but each of them gives specific and complementary information. Supported by: VZ 0021620808

LYMFOMY**(38) 1803.****Vliv genotypu FCGR3A receptoru na léčebnou odpověď pacientů s folikulárním lymfomem léčených imunochemoterapií podle individuálního rizika**

Gazdová Jana, Procházka Vít, Papajík Tomáš, Raida Luděk, Kubová Zuzana, Faber Edgar, Šedová Zuzana, Kučerová Ladislava, Divoká Martina, Jarošová Marie, Indrák Karel

(Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc)

Rituximabem vyvolaná buněčná toxicita (ADCC) vede k cílené eliminaci CD20+ buněk a je proto využívána v léčbě pacientů s ne-hodgkinovými B-lymfomy. Vazbu efektorové buňky imunitního systému na protilátku zprostředkuje FCGR3A receptor, jehož afinita k ligandu je ovlivněna genovým dimorfismem FCGR3A-158 V/F. Některé studie popisují lepší léčebnou odpověď pacientů s vysokoafinní formou receptoru (V/V nebo V/F genotyp), tento efekt však dosud nebyl studován u pacientů s folikulárním lymfomem (FL) léčených imunochemoterapií podle individuálního rizika. Cíl: Zhodno-



tit zdali genotyp FCGR3A ovlivňuje u takto léčených pacientů celkové přežití nebo interval do události (progrese). Metoda: Analyzovali jsme soubor 102 nemocných s nově diagnostikovaným FL. Medián věku souboru dosáhl 52 let (31-84). 92 % pacientů mělo pokročilé stádium choroby (III/IV), bulky chorobu mělo 56 % pacientů. Zastoupení FLIPI skóre bylo následující: nízké (0-1) 18,9 %, střední (2) 33,7 % a vysoké (≥ 3) 47,4 %. U nemocných s FLIPI 0-1 byl léčbou první linie R-CHOP, pacienti mladší 65 let se středním rizikem (FLIPI 2) byli léčeni intenzivním protokolem (ProMACE-CytaBOM nebo sekvenční protokol) a pacienti do 65 let s vysokým rizikem (FLIPI ≥ 3) byli léčeni intenzivní chemoterapií (BEAM) s autologní transplantací krvetvorných buněk. V první linii byl Rituximab aplikován u 59 % nemocných. Pro genotypizaci FCGR3A genu byla použita nested-PCR amplifikace následovaná restrikční analýzou cílové sekvence enzymem Nla-III. Výsledky: Na konci období sledování (medián 52 měsíců) bylo 57 % pacientů v 1. remisi, u 30 % pacientů došlo k progresi nebo relapsu lymfomu a 13 % nemocných zemřelo. 5-leté celkové přežití (OS) dosáhlo 84 % a 5-leté přežití bez události (EFS) dosáhlo 58 %. Frekvence FCGR3A genotypů: V/V 8 %, V/F 50 % a F/F 42 %. Zastoupení hodnot FLIPI skóre v rámci jednotlivých genotypů bylo proporcionální ($P=0,7$), podobně nebyl rozdíl v distribuci jednotlivých léčebných ramen a aplikaci rituximabu ($P=0,38$ a $P=0,52$). Procento nemocných, kteří dosáhli molekulární remise se ve skupině V/V+V/F vs F/F nelišilo ($P=0,92$). OS ani EFS není mezi skupinou V/V+V/F a F/F pacientů signifikantně rozdílné ($P=0,28$ resp. $P=0,57$). Subanalýza nemocných léčených a neléčených rituximabem neprokázala statisticky významný rozdíl v přežití dle FCGR3A genotypu. Závěr: Genotyp FCGR3A receptoru nemá prognostický význam u pacientů s FL léčených imunochemoterapií podle individuálního rizika. Podpořeno MSM619895205.

(39) 1793.**Sledování minimální reziduální nemoci u mantle cell lymfomu a preemptivní léčba rituximabem v případě molekulárního relapsu**

Šálek David, Marečková Andrea, Tichý Boris, Vášová Ingrid, Michalka Jozef, Janíková Andrea, Mayer Jiří (Interní hematologická klinika, FN a LF Masarykovy univerzity, Brno; Centrum molekulární biologie a genové terapie, IHOK FN, Brno)

Úvod: Dosažení molekulární remise po indukční terapii u nemocných s mantle cell lymfomem (MCL) má dle některých prací pozitivní prognostický význam. Případný molekulární relaps je pak možno preemptivně léčit rituximabem a dosáhnout tak prodloužení doby trvání klinické remise (Andersen, JCO 2009). Záměr: Monitorace minimální reziduální nemoci (MRD) u MCL pomocí PCR metod a léčebná intervence imunoterapií v případě prokázaného molekulárního relapsu s cílem prodloužit přežití bez nemoci. Metody: Vstupní vzorky (periferní krev, kostní dřeň, tkáň) jsou vyšetřeny kvalitativně na přítomnost PCR zachytitelné translokace t(11;14), v případě negativního výsledku následuje PCR detekce klonálních přestaveb imunoglobulinových genů. Po detekci vhodného molekulárního cíle následuje pravidelné sledování MRD kvalitativně metodou nested PCR a kvantitativně metodou real-time PCR. Kvantifikace využívá metody kalibračních křivek, které jsou zkonstruovány sériovým ředěním plazmidů nesoucích sekvence kontrolního genu (albumin) a sledovaného cíle. Výsledek je vyjádřen jako počet kopií sledovaného cíle na 1 mil. buněk. Každý vzorek je vyšetřen nejméně ve třech paralelních PCR reakcích. Odběry periferní krve jsou prováděny každé 3-4 měsíce, při objevení se první PCR pozitivitě následuje kontrola s odstupem 4-6 týdnů. Zároveň se provádí CT či PET/CT k vyloučení klinického relapsu. Vzorky kostní dřeně jsou odebírány při podezření na klinický relaps či při prvozáchytu pozitivitě MRD v periferní krvi. Preemptivní léčba spočívá v podání rituximabu 375 mg/m² 1x týdně, celkem 4x. Výsledky: MRD je sledována celkem u 35 pacientů s dg. MCL (27x přes bcl-1/IgH, 8x přes klonalitu Ig). Molekulární relaps je prakticky pravidelně po určité době následován relapsem klinickým. Medián doby od objevení se 1. pozitivitě MRD do klinického relapsu je 3 měsíce (rozmezí 1,5-22). Kompartment kostní dřeně se přitom jeví senzitivnější pro detekci MRD. Preemptivní léčba molekulárního relapsu rituximabem proběhla zatím u 5 pacientů, přičemž všichni dosáhli opětovné molekulární remise, která u 4 nemocných trvá (v délce 5-8 měsíců), 1 pac. po 7 měsících remise klinicky zrelaboval včetně objevení se opětovné pozitivitě PCR. Závěr: Sledování MRD u MCL představuje důležitou pomůcku umožňující u části nemocných předpovědět nastupující klinický relaps a dává nám tak možnost včasné terapeuticky zasáhnout ještě v době limitovaného rozsahu tumoru.

(40) 1768.**Subklasifikace ne-Hodgkinských lymfomů pomocí cílených DNA čipů**

Tichý Boris, Šupíková Jana, Staňo Kozubík Kateřina, Šálek David, Janíková Andrea, Vášová Ingrid, Malinová Karla, Mayer Jiří, Pospíšilová Šárka

(Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, FN LF MU, Brno; Interní hematologická klinika, FN a LF MU, Brno)

Ne-Hodgkinské lymfomy představují heterogenní skupinu lymfoproliferativních onemocnění s variabilním klinickým průběhem. Současné diagnostické metody založené především na histologii a imunohistochemii jsou někdy pro správnou klasifikaci onemocnění nedostatečné. Novou metodou pro klasifikaci nádorů je profilování genové exprese pomocí DNA čipů. Navrhli jsme oligonukleotidový DNA čip zaměřený na molekulární diagnostiku a prognostifikaci lymfoproliferativních onemocnění. Čip na bázi in-situ syntézy dlouhých oligonukleotidů nese více než 15 tisíc prób, které reprezentují téměř 4 tisíce genů vybraných na základě jejich role u lymfoproliferativních onemocnění nebo v důležitých buněčných procesech jako je apoptóza. Většina vybraných genů je na čipu reprezentována více různými próbami. K otestování schopnosti tohoto čipu klasifikovat NHL jsme použili supervizovaný klasifikační algoritmus Nearest Shrunken Centroids (NSC). Metodu NSC jsme použili na sadu expresních profilů 78 vzorků tří subtypů NHL – folikulární lymfom (FL), $n = 42$, zahrnuje i vzorky DLBCL transformovaných z FL, difúzní velkobuněčný lymfom (DLBCL), $n = 21$ a lymfom z pláštěvých buněk (MCL), $n = 15$. Datová sada byla náhodně rozdělena na dvě části – tréninkovou (60% vzorků každého subtypu NHL) a ověřovací. Pro zjištění vlivu výběru vzorků bylo rozdělení zopakováno celkem dvacetkrát. Nejlepších výsledků jsme dosáhli při použití asi 200 prób (medián 189, odpovídá asi 100 genům). Podíl nesprávně klasifikovaných vzorků v ověřovací sadě se pak pohyboval mezi 10 a 30 % (medián 17 %). Většina těchto chyb spočívala v nesprávném zařazení vzorků FL a DLBCL, pouze 2 vzorky MCL byly špatně klasifikovány jako DLBCL (v 50 % a 15 % opakování), oba cyklin D1 negativní/slabě pozitivní. Prokázali jsme vhodnost cílených DNA čipů pro klasifikaci ne-Hodgkinských lymfomů. K úspěšnému použití této metody je však zapotřebí poměrně rozsáhlý soubor vyšetřených vzorků. Její schopnost správně vzorky zařadit do jednotlivých skupin je významně ovlivněna skladbou tréninkového souboru. Nevhodná skladba zvyšuje podíl nesprávně klasifikovaných vzorků FL a DLBCL, zejména kvůli zařazení transformovaných FL do skupiny folikulárních lymfomů. I přes nevýhodu malého počtu vzorků jsme byli schopni správně zařadit MCL vzorky s vysokou spolehlivostí a to i v případech s aberantním fenotypem. Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR NR10439-3/2009, MUNI/A/1012/2009 a výzkumným záměrem MŠMT MSM0021622430.

(41) 1767.**Multiplex long-range PCR pro detekci t(11;14) u lymfomu z pláštěvých buněk**

Tichý Boris, Šupíková Jana, Marečková Andrea, Skuhrová-Francová Hana, Šálek David, Vášová Ingrid, Mayer Jiří, Pospíšilová Šárka

(Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, FN a LF MU, Brno; Interní hematologická klinika, FN a LF MU, Brno)

Translokace t(11;14)(q13;q32) je charakteristickou chromozomální aberací lymfomu z pláštěvých buněk (MCL, Mantle Cell Lymphoma). Tato aberace je běžně detekována metodou FISH, s pozitivním nálezem u více než 90 % případů MCL. Běžně používaná PCR metoda potřebná pro detekci MRD detekuje pouze ty případy, kdy dochází ke zlomu na chromozómu 11 v tzv. MTC (Major Translocation Cluster) oblasti, které představují pouze asi 40 % z FISH pozitivních vzorků. Vypracovali a otestovali jsme metodu multiplexní long-range PCR, která umožňuje PCR detekci t(11;14)(q13;q32) i u vzorků s místem zlomu ležícím mimo MTC. Primery pro tuto metodu rovnoměrně pokrývají úsek o délce 400 kb na chromozómu 11 centromericky od genu CCND1 a oblast J subgenů genu IGH na chromozómu 14. Metoda je navržena tak, aby umožnila ve dvou nezávislých kolech PCR (celkem 17 reakcí) získání amplifikačního produktu vhodného pro sekvenování. Pro testování jsme použili vzorky DNA získané z 16 biopsií mízních uzlin pacientů s MCL. Tyto vzorky byly t(11;14) negativní při běžném PCR vyšetření. Z 16 vzorků byl metodou multiplexní long-range PCR získán amplifikační produkt u 11 z nich (69 %). Zlomky na chromozómu 11 byly u těchto vzorků rozptýleny na úseku dlouhém 200 kb, centromericky i telomericky od MTC. Místa zlomu na chromozómu 14 ležela především v genech IGHJ6, IGHJ5 a IGHJ4 genech. Při vyšetření vzorků s dříve PCR detekovanou translokací byla translokace u všech detekována i touto novou metodou. Sériovým řaděním pozitivních vzorků jsme stanovili citlivost metody minimálně 10-2 (tj. 1 aberantní buňka ze 100). Nová metoda detekce t(11;14)(q13;q32) u MCL zlepšuje možnost PCR záchytu než 75 %. Tato metoda může být nápomocna jak v diagnostice lymfomu z pláštěvých buněk jako komplementární metoda k FISH a imunohistochemickému vyšetření cyklinu D1, ale především umožňuje charakterizaci zlomové oblasti translokace a její následné využití jako vysoce specifického markeru nádorových buněk ke sledování minimální zbytkové nemoci. Výhodou této metody je i její citlivost, která dovoluje její použití i u vzorků s nižším podílem nádorových buněk jako jsou aspiráty kostní dřeně nebo periferní krev. Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR NR10439-3/2009, MUNI/A/1012/2009 a výzkumným záměrem MŠMT MSM0021622430.

(42) 1716.

Laserová mikrodisekce v molekulární diagnostice nádorové duplicity lymfomu z buněk pláště (MCL) a malobuněčného B lymfomu typu CLL (B-CLL/SLL)
Břízová Helena, Kalinová Markéta, Hilská Irena, Augustiňáková Alena, Campr Vít, Kodet Roman
(Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol, Praha)

U 64letého pacienta s retroperitoneální lymfadenopatií morfoloogické a imunofenotypové (imunohistochemie a průtoková cytometrie) vyšetření prokázalo přítomnost dvou klonálních subpopulací B lymfocytů. Difúzní populace menších lymfocytů vykazovala charakter malobuněčného B lymfomu typu chronické lymfatické leukémie (B-CLL/SLL), nodulární komponenta svědčila pro diagnózu lymfomu z buněk pláště (MCL). Jednalo se o nádorovou duplicitu. U pacienta následovalo molekulární vyšetření klonální přestavby těžkých a kappa lehkých řetězců imunoglobulinů (IgH, IgK) s cílem prokázat přítomnost dvou klonálních populací v témže vzorku a získat molekulární cíl pro sledování minimální residuální choroby. Pomocí mezinárodního protokolu Biomed-2 jsme detekovali biklonální přestavbu IgH, klonální přestavbu IgK (VK-JK) a biklonální přestavbu IgK (VK-KDE). Nález je v souladu s diagnózou nádorové duplicity, neboť přítomnost dvou klonálních přestaveb může svědčit pro výskyt dvou klonálních populací v nádoru. Vyšetření však neumožnilo rozlišit klonální přestavby jednotlivých nádorových populací. Proto jsme jednotlivé produkty amplifikace klonální přestavby sekvenovali a sekvenci jsme využili pro návrh pacient-specifické sady primerů detekující jednotlivé klonální produkty odděleně. Pomocí laserové mikrodisekce jsme separovali CD23+ populaci nádorových buněk, která odpovídala komponentě B-CLL/SLL, a CD23- populaci nádorových buněk odpovídající MCL. Získali jsme tak možnost separátně analyzovat genetické přestavby B-CLL/SLL a MCL populace. Pro analýzu klonálních přestaveb v obou populacích jsme využili pacient-specifické primery získané na základě sekvence celé kompozitní populace. Zjistili jsme, že CD23+ populace MCL nese IgH klonální přestavbu VH1, zatímco CD23- populace B-CLL/SLL nese přestavbu VH4. V případě analýzy IgK (VK-KDE) jsme prokázali, že CD23- populace nese přestavbu intron/KDE. CD23+ populace nese přestavbu Vκ2f/KDE. Analýza klonální přestavby IgK (VK-JK) je komplikována složitostí sekvence a následnou specifitou primerů. Pomocí laserové mikrodisekce jsme oddělili nádorové populace kompozitního lymfomu. Tím jsme získali možnost separátně analyzovat obě lymfomové populace a našli jsme specifickou monoklonální přestavbu pro obě populace. Pro obě nádorové složky jsme tak získali specifický molekulární cíl sledování minimální residuální choroby izolovaně. Výsledkem je „pacient-lymfom“ specifický přístup sledování onemocnění s vysokou citlivostí. Podpořeno MZOFNM 2005/6704.

(43) 1692.

Thorakoskopie v diagnostice mediastinální lymfadenopatie - spolupráce s hrudním chirurgem a přínos pro hematologii
Navrátil Milan, Hanke Ivo, Vášová Ingrid, Šálek David, Michálka Josef, Janíková Andrea, Ivičič Jaroslav
(Interní hematologická klinika, FN, PMDV Bohunice, Brno; Chirurgická klinika, FN, PMDV Bohunice, Brno)

Úvod: Diagnostika mediastinální lymfadenopatie může být při absenci periferní lymfadenopatie obtížnější. Nicméně důležitou roli hraje v takovémto případě diagnostická thorakoskopie. Pacienti a metody: Ve spolupráci s chirurgy jsme retrospektivně vyhodnotili soubor pacientů, kteří v období od 1.1.2006 do 31.12.2009 podstoupili thorakoskopii z důvodu diagnostiky nitrohruďního patologického procesu. Celkem se jednalo o 100 pacientů, 37 žen a 63 mužů. Průměrný věk byl 46 let (věkový rozsah 20-88 let). Medián věku 45let. Záměr před operací byl 93x biopsie mediastinálních uzlin, 2x biopsie uzlin a plíce, 1x biopsie pleury s následnou talkází. Výsledky: U 98 pacientů byl odebrán materiál na histologii z toho v 93 případech byl patologem materiál hodnocen jako dostatečný pro diagnostiku. V 5 případech bylo nutné thorakoskopii opakovat pro nový odběr materiálu. Ve dvou případech nebyla shledána pooperačně patologie v mediastinu a nebyl tedy odebrán ani materiál k diagnostice. 5 pacientů z 98 podstoupilo již před thorakoskopií na jiném pracovišti odběr materiálu buď mediastinoskopicky nebo punkcí pod CT s insuficientním výsledkem. 6x bylo nutné konvertovat výkon na mini-/torakotomii z důvodu masivních srůstů nebo pro nutnost provedení exstirpace tumoru s případnou parciální resekci infiltrované plíce. Diagnózy stanovené z odebraného materiálu hematologické – 39 pacientů (Hodgkinův lymfom 22, mediastinální velkobb. lymfom 9, DLBCL 2, SCLL 1, lymfom marginální zóny 1, lymfoblastický lymfom 2, folikulární lymfom 2). Nehematologické diagnózy – 59 pacientů (sarkoidóza 25, malobb. bronchogenní ca 6, nemalobb. bronchogenní ca 5, thymom 4, metastáza solidního tu 9, mezoteliom 1, benigní tu 2, TBC 1, absces 1, reaktivní zánětlivá uzlina 5). 1x byly nutná revize po operaci pro hemothorax a krvácení z kanálu po zavedeném portu. Závěr: Thorakoskopie představuje velmi dobrou a bezpečnou metodu s vysokou spolehlivostí odběru suficientního vzorku na histologické zpracování u pacientů s patologickým procesem v mediastinu, kterou může v hojně míře využít i hematologické pracoviště s dobrou návazností na pracoviště hrudní chirurgie.

(44) 1674.**Anaplastický velkobuněčný lymfom ALK+: molekulární diagnostika a sledování minimální reziduální nemoci**

Kalinová Markéta, Břízová Helena, Augustiňáková Alena, Hilská Irena, Mrhalová Marcela, Kodet Roman
(Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK Praha a FN Motol, Praha)

Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) patří do skupiny lymfomů vznikajících transformací lymfoidních elementů T řady s expresí cytokinového receptoru CD30. V případě ALK+ ALCL dochází k patologické aktivaci onkogenu ALK, která je způsobena chromozomální translokací, kdy vznikají fúzní geny s různými translokačními partnery. Přibližně u 75% dětských ALCL pacientů nacházíme translokaci t(2;5) se vznikem fúzního genu NPM/ALK. Cílem práce byla detekce fúzního genu NPM/ALK. U pacientů bez prokázané fúze NPM/ALK se současnou imunohistochemickou ALK+ bylo provedeno následné hledání translokačního partnera genu ALK pomocí metody 5q RACE. Výsledky jsme porovnávali s výsledky imunohistochemického průkazu exprese ALK proteinu a s výsledky fluorescenční in situ hybridizace na interfazických jádrech (I-FISH). U pacientů s NPM/ALK+ ALCL byla následně sledována minimální reziduální nemoc (MRN) pomocí kvantitativní detekce (RQ-RT-PCR) exprese fúzního genu NPM/ALK. Abychom mohli kvantitativně sledovat MRN i u ALK+, NPM/ALK- ALCL, zavedli jsme RQ-RT-PCR exprese mRNA translokované části genu ALK. Celkem jsme vyšetřili 35 pacientů (4-66let; medián 15 let) s ALK+ ALCL (imunohistochemicky ALK+). U 30 pacientů bylo provedeno vyšetření zlomu chromozomu 2, oblasti 2p23, pomocí I-FISH a ve všech případech byl detekován zlom 2p23. Ve 27/35 případech jsme detekovali fúzní gen NPM/ALK (77%), ve 2 případech fúzní gen CLTC/ALK resp. ATIC/ALK, 1x jsme detekovali fúzní gen TPM4/ALK a v jednom případě jsme detekovali kombinaci fúzních genů TPM3/ALK a CLTC/ALK. U 2 pacientů NPM/ALK- jsme neměli dostatek materiálu pro následné vyšetření metodou 5' RACE. U 9 pacientů s NPM/ALK+ ALCL jsme sledovali MRN pomocí RQ-RT-PCR exprese fúzního genu NPM/ALK a porovnávali s RQ-RT-PCR mRNA translokované části genu ALK. Nalezli jsme korelaci mezi hladinami MRN sledovanými pomocí exprese fúzního genu NPM/ALK a translokované části genu ALK (Spearmanův korelační koeficient 0,8244) u NPM/ALK+ ALCL. Molekulární diagnostika umožňuje na našem pracovišti detekovat translokační partnery genu ALK u ALK+ ALCL. RQ-RT-PCR fúzního genu NPM/ALK a nově zavedená RQ-RT-PCR translokované části genu ALK umožňuje sledovat dynamiku a tím hladinu infiltrace kostní dřeně a periferní krve během léčby všech pacientů s ALK+ ALCL. Podporováno projekty: MSM 0021620813 a MZO FNM 2005/6704.

(45) 1616.**Dlouhodobé léčebné výsledky nemocných s periferním T-lymfomem léčených intenzivní chemoterapií a autologní transplantací krvetvorných buněk**

Procházka Vít, Faber Edgar, Raida Luděk, Papajík Tomáš, Rusiňáková Zuzana, Šedová Zuzana, Kubová Zuzana, Kučerová Ladislava, Mysliveček Miroslav, Indrák Karel
(Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; PET/CT centrum, Klinika nukleární medicíny, FN, Olomouc)

Periferní T-lymfomy (PTL) představují heterogenní skupinu ne Hodgkinových lymfomů s agresivním klinickým průběhem, častou rezistencí na terapii a neuspokojivou prognózou. Přínos aplikace intenzivních protokolů chemoterapie a vysocedávkované léčby s autologní transplantací krvetvorných buněk (TKB) je stále nejasný. Cíl: Zhodnotit dlouhodobé léčebné výsledky neselektovaného souboru nemocných s PTL léčených intenzivním protokolem chemoterapie. Soubor: Analyzovali jsme data 29 nemocných s PTL. Histologické subtypy PTL byly následující: periferní T-lymfom blíže nespecifikovaný n=13; anaplastický velkobuněčný T-lymfom (ALCL) ALK-negativní n=5; ALCL ALK-pozitivní n=3; ALCL s neznámou expresí ALK n=3; angioimunoblastický lymfom n=1; hepatosplenický lymfom n=1; Sézaryho syndrom n=1; s enteropatií asociovaný T-lymfom n=2. Medián věku při diagnóze dosáhl 48 let (29-64), 77 % nemocných mělo pokročilé stádium nemoci dle Ann Arbor. Téměř polovina nemocných (45 %) měla IPI skóre ≥ 3 ; PIT skóre ≥ 2 bylo zastíženo v 59 % případů. 27/29 nemocných bylo léčeno sekvenčním protokolem chemoterapie, 2 pacienti režimem ProMACE-CytaBOM. 18/29 nemocných bylo v první linii léčby konsolidováno vysocedávkovanou chemoterapií (BEAM 200) s autologní TKB; 2 nemocní byli konsolidováni alogenní TKB. Léčebná odpověď byla hodnocena pomocí PET/CT u 12 nemocných s FGD-avidním lymfomem. Výsledky: Kompletní remise byla dosažena u 19/29 (66 %) nemocných, parciální remise u 3 (10 %) nemocných a 7 (24 %) pacientů nedosáhlo léčebné odpovědi. Kompletní metabolická odpověď (PET negativita) byla dosažena u 8/12 (75 %) pacientů. Během sledování souboru (medián 55,1 měsíců) došlo k relapsu nebo progresi lymfomu u 14 (48,3 %) nemocných (medián doby do progresu 16,1 měsíců). Devět nemocných zemřelo. 11/29 nemocných (50 % z chemosenzitivních pacientů) přežilo déle než 50 měsíců, tři z nich byli léčeni alogenní TKB. Procento přežití bez progresu dosáhlo ve 2 letech 52 % (95% CI, 0,33-0,71); procento celkového přežití ve 2 letech dosáhlo 65 % (95% CI, 0,47-0,84). PET negativita byla spojena s nižší pravděpodobností relapsu lymfomu (chi-square p=0,09). Závěr: Intenzivní léčba s etoposidovými režimy a následnou autologní TKB může vést k dlouhodobé kontrole lymfomu u poloviny chemosenzitivních nemocných. Pacienti v parciální remisi mohou být úspěšně léčeni alogenní TKB. Dosažení PET negativity je pravděpodobně předpokladem dlouhodobé remise PTL. Podpořeno granty: MSM 6198959205 a IGA NR/9502-3.

(46) 1810.**Změny B lymfocytů v krvi a ve dřeni u myelodysplastického syndromu (MDS) a pokus o interpretaci těchto změn**

Neuwirtová Radana, Cukrová Věra, Karban Josef, Siebertová Katarína, Jonášová Anna, Šišková Magda, Cmunt Eduard, Šauerová Renata

(1. interní klinika VFN, Praha; Centrální hematologické laboratoře, VFN, Praha)

Úvod. Častá převaha lymfocytů v diferenciálním rozpočtu leukocytů (často relativní při neutropenii) nás vedla k vyšetření subpopulací lymfocytů u MDS. Výsledky zpracoval Karban a spol. 2000. Jediným statisticky významným nálezem bylo snížení B lymfocytů proti kontrolám. K problému jsme se vrátili na další skupině MDS nemocných a aktuálně jsme se zaměřili na nálezy B buněk ve dřeni. Materiál a metoda. B lymfocyty v periferní krvi byly vyšetřeny v nové sestavě 40 MDS nemocných a u 21 kontrol; ve dřeni u 70 pacientů a u 13 kontrol. Hodnotili jsme nálezy u jednotlivých podskupin MDS. Nehodnotili jsme MDS/AML, MDS/MPS a proliferativní CMML. Jako kontroly sloužili zdraví jedinci převážně vyššího věku. B buňky byly vyšetřeny na průtokovém cytometru značením antigenu CD19 a to v krvi v lymfocytárním gatě, ve dřeni bez gatě. Pro statistické hodnocení bylo použito neparametrického testu Mann-Whitneyova a Kruskal-Wallisova. Výsledky. B lymfocyty byly vyšetřeny u 21 RCMD (včetně RA), u 10 RCMD-RS (včetně RARS) a u 9 RAEB 1 a RAEB 2. Statisticky významné snížení bylo nalezeno u RCMD ($p < 0,01$) a u RCMD-RS ($p < 0,01$). Proti kontrole nebyl rozdíl u RAEB 1 a RAEB 2. Ve dřeni šlo o 8 RA, 20 RCMD, 9 5q-syndromů, 13 RAEB 1 a 10 RAEB 2. 10 sideroplastických anemií jsme hodnotili najednou vzhledem k malým počtům jednotlivých podskupin. Ve dřeni jsme našli statisticky významné rozdíly proti kontrolám ($p = 0,14$). Hodnoty nápadně kolísaly, a to i u konsistentní skupiny 5q-syndromu. Jen částečně jsou výsledky v hodnocení B lymfocytů bez gatě ovlivněny nestejnou celularitou dřene a procentem krvetvorných řad. Vyšetření B buněk odhalilo u pěti MDS nemocných monoklonální B populace, svědčící pro současnou B-CLL nebo monoklonální B lymfocytozu. Závěr. Vyšetřením nové skupiny MDS nemocných jsme potvrdili původní nález významného snížení B lymfocytů v krvi u RCMD a RCMD-RS. Tohoto nálezu lze využít pro potvrzení diagnózy MDS o nízkém riziku. Snížení B lymfocytů v krvi není provázáno snížením B buněk ve dřeni, což lze vysvětlit tím, že ve dřeni nesou antigen CD19 nejen zralé B lymfocyty, ale i jejich prekurzory. Nález budí podezření, že rovněž i u B buněk může jít o předčasnou apoptozu, podobně jako je tomu u krvetvorných buněk. Zatím chybí práce, které by hodnotily podíl nízkých B lymfocytů na celkovém imunologickém pozadí u MDS. Ve sdě-

lení upřesníme problémy metodické i uvedeme korelaci s řadou klinických i laboratorních parametrů.

(47) 1707.**Krevní obraz jako základní diagnostický a prognostický ukazatel u pacientů s myelodysplastickým syndromem**

Vondráková Jana, Zapletalová Jana, Indráková Jarmila, Indrák Karel

(Hemato-onkologická klinika FN a LF Univerzity Palackého, Olomouc; Ústav lékařské biofyziky, LF Univerzity Palackého, Olomouc)

Myelodysplastický syndrom (MDS) se projevuje mono-, bi- nebo pancytopenií v periferní krvi. Důležitým základním vyšetřením nezbytným pro diagnostiku MDS je krevní obraz (KO), na jehož podkladě jsou posléze indikována další speciální vyšetření. Pečlivé zhodnocení všech parametrů KO však může přispět i k rychlému odhadu prognózy nemocného s následně potvrzeným MDS. Cílem retrospektivní analýzy souboru MDS nemocných léčených v letech 2000 – 2008 bylo posouzení přínosu vstupních parametrů KO k odhadu rizika přechodu MDS v AL a jejich vlivu na celkové přežití (OS). Celkem bylo hodnoceno 100 nemocných, 51 mužů a 49 žen (1:1), ve věku 28 – 90 let s Me 65 let. Dle FAB klasifikace bylo OS (průměr a Me) pro RA 68,7 měsíců (Me nedosaženo), pro RARS 39,2 a 52,7 měsíců, pro RAEB 22,9 a 13,6 měsíců ($p = 0,0003$). Doba do vzniku AML byla průměrně pro RA 77,6, pro RARS 50,5 měsíců (Me nedosaženo) a pro RAEB 17,4 (resp. Me 10,3) měsíců ($p < 0,0001$). K vývoji AML došlo u 41% nemocných. Podle WHO 2001 klasifikace do AML transformovalo: 1 nemocný z 8 RARS, 1 z 8 5q- syndromu, 5 z 30 RCMD, 3 z 8 RCMD-RS, 13 z 20 RAEB-I, 18 z 23 RAEB-II. Zemřelo 58 nemocných – z nich 25 (tj 43%) na AML, 6 nemocných (10%) na infekci, 1x na krvácení do CNS, 1x na infarkt myokardu, v 25 případech (43%) byla příčina neznámá. Vstupní hodnoty KO byly: Hb 44 – 149 g/l (Me 93), leukocyty 1 – 30.10⁹/l (Me 3,5), neutrofilie 0,1 – 17.10⁹/l (Me 1,7), lymfocyty 0 – 5.10⁹/l (Me 1,3), monocyty 0 – 6.10⁹/l (Me 0,3), MCV 77 – 125 fl (Me 96), trombocyty 3 – 702.10⁹/l (Me 113), plt mass (součin MPV a počtu trombocytů) 0 – 6,8 ml/l (Me 1,6), blasty 0 – 12 % (Me 0), RDW 13 – 29 % (Me 17), retikulocyty 0 – 0,035 (Me 0,015). Statisticky významným nepříznivým ukazatelem pro OS byla trombopenie, neutropenie, vyplavování blastů, počet blastů v periférii ≥ 5 %, nižší celkový objem trombocytární hmoty. Prognosticky příznivá naopak byla makrocytóza a lymfopenie. (vše $p < 0,01$). Hodnoty hemoglobinu (Hb), střední objem trombocytů (MPV) a distribuční šíře erytrocytů (RDW) nebyly prognosticky statisticky významné. Rizikem pro vývoj AL byla trombopenie, nízký nebo normální objem trombocytární hmoty, normální MCV či mikrocytóza, vyplavování blastů, neutropenie, lymfocytóza. Ostatní parametry (Hb, RDW, MPV) neměly statisticky významný vliv na riziko vzni-

ku AL. Naše výsledky ukazujú význam KO nejen jako základního diagnostického laboratorního vyšetření, ale i jako prognostického ukazatele u nemocných s MDS.

(48) 1693.

Myelodysplastický syndrom a hepcidin

Nosál Miloš, Jančinová Viera, Mistrík Martin (*FNsP-Nemocnica Staré Mesto, Bratislava, SK; Ústav experimentálnej farmakológie SAV, Bratislava, SK;*

(KHaT-FNsP, LFUK, SZU, Antolská, FNsP - Nemocnica Staré mesto, Bratislava, SK)

Úvod: Heparin (hep.) je hormón produkovaný v pečeni, považuje sa za centrálny regulátor metabolizmu železa v organizme. Produkcia hep. je kontrolovaná hlavne erythropoetickou aktivitou kostnej drene, množstvom cirkulujúceho železa a celkovými zásobami železa v organizme, ale aj zápalovým procesom. I keď bol hep. najskôr objavený v ľudskom sére a moči, najviac znalostí o jeho regulácii a činnosti pochádza z in vitro a in vivo štúdií na myšiach. Metodika: Na meranie hladín hep. sa môžu použiť ELISA metodiky, chemiluminiscenčná detekcia, ktorá používa v prvom kroku králičie anti-humánne protilátky a v druhom kroku kombinované kozie-králičie protilátky s konžskou peroxidázou. Alebo zložitejšie spektrometrické metodiky. Vyšetřili sme 13 pacientov s nízkym stupňom MDS (RA, RARS), 5 pacientov dostalo r-Epo, žiadny pacient nedostal chelatačnú liečbu. Iba 3 pacienti dostali transfúzie krvi do 4 TU za tri mesiace. Kontrolný súbor tvorili pacienti s rôznymi ochoreniami bez MDS. Výsledky: U všetkých 13 pacientov median hep. v moči bol 6.11 Mint/mmol s rozsahom (0.63- 35.6), u 6 pacientov bola hladina hep. < 4 Mint/mmmol. Zaznamenali sme štatisticky významnú koreláciu medzi hep. v moči a sérovou hladinou Fe (rs 0.577, p< 0.05). V skupine pacientov MDS-RA hep. v moči koreloval so sérovým Fe (p< 0.01) a saturáciou transferinu (p< 0.01). Silná korelácia sa našla medzi sérovými hladinami Fe a hladinou LDH pre všetkých pacientov s MDS (p< 0.01), pre skupinu s RA (p< 0.01) a skupinu s RARS (p< 0.02) a u pacientov, ktorí dostávali r-Epo (p< 0.02) a u pacientov, ktorí nedostávali r-Epo (p< 0.02). Záver: Výsledky poukazujú na inefektívnu erytropoézu pri MDS, upozorňujú na prognózu ochorenia, nezávisle od iných dostupných, ale zložitejších vyšetření. Nové štúdie u ľudí môžu poskytnúť viac informácií o etiológii chorôb metabolizmu železa, zdokonaľiť diferenciálnu diagnostiku a poskytnúť nové liečebné možnosti.

(49) 1694.

Metabolizmus železa, nový pohľad

Nosál Miloš, Mistrík Martin (*KHaT-FNsP, LFUK, SZU, FNsP Bratislava, SK*)

Metabolizmus železa, nový pohľad. M.Nosál, M.Mistrík, KHaT – FNsP, Nem.Sv.Cyrila Metoda BA, FNsP –

Nem.Staré mesto BA Obsah: Aj keď je železo nevyhnutné pre žijúce organizmy na ich prežitie, jeho reaktívne vlastnosti vyžadujú prísnu reguláciu, aby sa zabránilo toxickým účinkom. Heparin (Hep) je pečenoú produkovaný peptický hormón. Považuje sa za nový biomarker, centrálny regulátor telového metabolizmu železa. Jeho produkcia je kontrolovaná hlavne erythropoetickou aktivitou kostnej drene, množstvom cirkulujúceho a uloženého telového železa a zápalom. Nedávne správy poskytli nové hypotézy, ako môže hepcidin vykonávať regulačnú funkciu. I keď bol hepcidin najskôr objavený v ľudskom moči a sére, najviac znalostí o činnosti a regulácii hepcidinu pochádza z experimentov in vitro a štúdií na myšiach, ktoré využívajú expresiu hepcidínovej mRNA. Obtiaže v prevedení štúdií u ľudí sú spôsobené potrebou vhodného hepcidínového testu. Nedávno sa vyvinulo viacero testov na meranie hepcidínu v sére a moči u ľudí, čo poskytlo nové možnosti na štúdium jeho regulácie u ľudí. Súčasne, len malý počet laboratórií je schopných vykonať tieto testy. Cieľom práce je podať prehľad o regulácii hepcidinu, získaný z klinických štúdií vo svetle ukazovateľov z in vitro a štúdií na myšiach. Štúdie u ľudí poskytnú viac informácií o etiológii chorôb metabolizmu železa, zdokonaľí sa diferenciálna diagnóza týchto chorôb a postupne sa vytvoria nové liečebné možnosti. Úvod: Telový metabolizmus železa je založený na vysoko výkonnom systéme udržiavania železa a recyklácii len tej časti, ktorá je denne potrebná a nahradená absorpciou v duodéne. Udržiavanie homeostázy telového železa vyžaduje mechanizmy na kontrolu vychytenia a mobilizáciu zásob s erythropoetickými potrebami a odstrání skôr použité železo. Preto transport železa medzi bunkami, ktoré potrebujú železo a bunkami, ktoré získavajú železo a ktoré ho ukládajú musí byť prísne regulovaný. Závery. Regulácia telového železa je podstatná, ale môže byť tiež toxickým dôsledkom, prísne je kontrolovaná malým peptidickým hormónom hepcidinom. Tento hlavný pečenoú – produkovaný peptid je charakterizovaný svojou jedinečnou antimikrobiálnou štruktúrou a funkčnými vlastnosťami, ktoré hrajú rozcestia medzi prirodzenou imunitou, obranou hostiteľa a metabolizmom železa. Heparin je tak centrálnym regulátorom železa.

AKUTNÍ LEUKÉMIE

(50) 1833.

Hladiny p53 a Bax mRNA štatisticky významne korelujú s citlivosťou leukemických myeloblastov na cytostatiká in vitro

Hatok Jozef, Chudý Peter, Fabianová Eva, Chudej Juraj, Jurečeková Jana, Plameňová Ivana, Peter Račay (*Ústav lekárskej biochémie JLF UK, Martin, SK; Klinika hematologie a transfuziologie JLF UK a MFN, Martin, SK*)

Účinnosť chemoterapie akútnej leukémie je výrazne ovplyvnená rôznymi faktormi, ktoré zohrávajú vý-

znamnú úlohu v liečebnej stratégii a spolurozhodujú o výsledku liečby. Medzi najvýznamnejšie limitujúce faktory patrí predovšetkým nízka citlivosť leukemických buniek na chemoterapiu, čo je podmienené profilom exprese určitých génov. Úroveň exprese ochranných antiapoptotických (napr. bielkovín Bcl2 rodiny) a efektorových tumor-supresorových a proapoptotických bielkovín (napr. p53 a Bax) predstavuje jeden zo základných molekulových faktorov podmieňujúcich citlivosť malígnych buniek na cytostatiká. V našich experimentoch sme pozorovali štatisticky významne zvýšene hladiny mRNA proapoptotických bielkovín p53 a Bax a antiapoptotických bielkovín Bcl-xl a Bcl2 v leukemických myeloblastoch izolovaných z krvi pacientov s potvrdenou diagnózou akútnej myeloblastovej leukémie oproti ich hladinám v mononukleárných bunkách izolovaných z krvi zdravých jedincov. Cieľom našej práce bolo zistiť či má hladina mRNA uvedených bielkovín vplyv na chemosenzitivitu leukemických myeloblastov stanovenú in vitro. Po vykonaní MTT testu a stanovení citlivosti myeloblastov na vybrané cytostatiká sme korelovali získané hodnoty LC50 s hladinou mRNA pre sledované bielkoviny stanovenou pomocou RT-PCR. Korelačná analýza ukázala, že: • medzi hladinou p53 mRNA a citlivosťou leukemických myeloblastov na cytozín-arabinozid, daunorubicín, etopozid a idarubicín existuje štatisticky významný pozitívny vzťah • medzi hladinou Bax mRNA a citlivosťou leukemických myeloblastov na daunorubicín, etopozid a idarubicín existuje štatisticky významný pozitívny vzťah • hladiny Bcl-xl a Bcl-2 mRNA nekorelovali štatisticky významne s citlivosťou leukemických myeloblastov na cytozín-arabinozid, daunorubicín, etopozid, vinkristín a idarubicín. Naše výsledky naznačujú, že v prípade akútnej myeloblastovej leukémie je citlivosť leukemických buniek na väčšinu sledovaných cytostatík významne podmienená hladinami mRNA pre proapoptotické bielkoviny p53 a Bax. Táto práca bola podporená projektom

(51) 1749.

Expresie genu WT1 v periférnej krvi detských pacientů s akutní myeloidní leukémií – prognostický význam a možné využití pro detekci minimální reziduální nemoci

Kramarzová Karolina, Boublíková Ludmila, Starý Jan, Trka Jan

(CLIP – Childhood Leukaemia Investigation Prague, Klinika dětské hematologie a onkologie UK, 2. lékařská fakulta, Praha)

Vysokou expresi WT1 nacházíme v buňkách většiny akutních leukémií a dalších hematologických malignit. WT1 je proto považován za potenciální univerzální marker pro detekci MRN, zejména u pacientů s AML. Většina studií zabývajících se tímto genem u detských AML je založena na analýze vzorků kostní dřeně pacientů. V sou-

časné době však již existují publikace, především v oblasti dospělých AML, které pro účely detekce WT1 upřednostňují periférní krev. Abychom zhodnotili možné využití tohoto materiálu pro analýzu exprese WT1 u detských pacientů, vyšetřili jsme diagnostické vzorky KD a PK 99 dětí s AML. Stanovili jsme korelaci hodnot nalezených v KD a PK a jejich prognostický význam. Pro určení fyziologických hladin WT1 jsme zpracovali také vzorky normální resp. regenerující KD a vzorky PK dárců. Celkovou expresi genu WT1 jsme analyzovali systémem RQ-PCR navrženým dle kritérií EAC (Europe Against Cancer Program). Expresi WT1 jsme detekovali v 92% vzorků KD a 91% vzorků PK. Medián fyziologických hladin WT1 byl 29 a 1,4 WT1/ABLx10e4 NCN pro KD resp. PK. Vysokou expresi WT1 (>1,5 násobek maxima fyziologických hodnot) jsme našli v 75% vzorků KD a 80% vzorků PK. Prokázali jsme excelentní korelaci hodnot naměřených v KD a PK (Rho=0,89 p<0,0001), přičemž medián WT1 v KD byl o 0,2 řádu vyšší než v PK (p=0,01). Neprokázali jsme jakoukoli souvislost detekovaných hladin WT1 s procentuálním zastoupením blastů. Rozdíl v expresi WT1 mezi patientskými a kontrolními vzorky byl 2,0 řádu pro KD a 3,1 řádu pro PK. Celkově lze říci, že u detských AML nacházíme signifikantně vyšší hladiny WT1 než u ALL (p<0,001 pro KD, p<0,0001 pro PK). Dle kritérií FAB klasifikace mají nejvyšší expresi WT1 AML M3 (p<0,0001 pro KD i PK) a nejnižší AML M5 (p<0,0001 pro KD i PK). Signifikantně vyšší expresi jsme detekovali u pacientů standardního rizika ve srovnání s vysokým rizikem (p<0,0001 pro KD i PK). Nenalezli jsme jakoukoli souvislost hladiny WT1 s věkem při diagnóze, pohlavím, časovou odpovědí na léčbu, či celkovým přežitím. Oproti většině doposud publikovaných dat neprokazujeme prognostický význam exprese WT1 u detských AML. Na základě našich výsledků usuzujeme, že periférní krev je vhodným materiálem pro detekci WT1. Výraznější rozdíl leukemických hladin WT1 oproti fyziologickým hodnotám spolu se snadnější dostupností materiálu navíc poukazují na možné výhody využití PK pro sledování MRN u detských pacientů s AML. Podpořeno granty MSM0021620813, GAUK 81709 a IGA NS10488-3/2009.

(52) 1747.

isochromosom 5p: ojediněle sa opakující nález u myeloidních leukémií

Izáková Silvia, Březinová Jana, Šárová Iveta, Zemanová Zuzana, Lízová Libuše, Gančarčíková Markéta, Malinová Eva, Čermák Jaroslav, Nováková Ludmila, Polívka Jindřich, Michalová Kyra

(ÚHKT, cytogenetická laboratoř, Praha; CNC ÚKBLD VFN a I.LF UK, Praha; FN Královské Vinohrady, Praha)

Přítomnost isochromosomu krátkých ramien chromosomu 5[i(5)(p)] patří medzi vzácné a ojediněle sa vyskytujúcu aberáciu u hematologických myeloidných malignit. Podstata vzniku isochromosomu 5p nie je presne známa, jeho prítomnosť sa vždy spájala so zlou prognózou a extrémne

krátkým celkovým přežitím. U všech doposiaľ publikovaných pacientov bol tento nález doprevádzaný s trisomiou chromosomu 8 a ďalšími cytogenetickými zmenami. V priebehu rokov 2005–2009 sme detegovali isochromosom krátkych ramien chromosomu 5 u troch pacientov z vyšetreného súboru, ktorý tvoril približne 750 pacientov s ochorením myeloidnej rady. Jednalo sa o dvoch pacientov s primárnym ochorením MDS RAEB II a jednu pacientku s diagnózou sekundárna AML. Konvenčná cytogenetická analýza odhalila prítomnosť komplexných zmien v karyotype, ktoré zahŕňali prestavbu chromosomu 5. Prítomnosť isochromosomu i(5)(p) bola potvrdená pomocou viacfarebnej pruhovacej techniky s vysokou rozlišovacou schopnosťou pre chromosom 5 (mBAND), komplexné chromosomové aberácie boli spresnené metódou viacfarebnej FISH (mFISH) (MetaSystems, Altlußheim, Germany 24X/XCye color kits). Delecia dlhých ramien chromosomu 5, ktorú sprevádza prítomnosť i(5)(p), bola overená metódou FISH s využitím špecifickej sondy pre oblasť 5q31 (LSI EGR1(5q31) SpectrumOrange/D5S23,D5S721 SpectrumGreen probe set Vysis–Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA). U žiadneho z vyšetrených pacientov nebol prítomný i(5)(p) jedinou zmenou v karyotype. Klinické údaje a karyotypy našich pacientov budú uvedené v prezentácii. Incidencia nálezu i(5)(p) v literatúre je veľmi nízka, pravdepodobne preto, že pri použití klasickej cytogenetickej analýzy môže byť tato aberácia chybné interpretovaná ako delecia 5q, čo je najčastejšia štrukturálna aberácia u hematologických myeloidných malignít. S ohľadom na zlú prognózu chorých s i(5)(p) je preto dôležité k jeho detekcii vždy využiť kombináciu dostupných molekulárne cytogenetických techník. Táto práca bola podporená grantom: MZOUHKT2005, MZOVFN2005

(53) 1728.

Primoléčba arsentrioxidom v prípadoch komplikované APL - zkušenosti centra

Svoboda Tomáš, Karas Michal, Koza Vladimír, Vokurka Samuel, Jungová Alexandra
(Hematologicko-onkologické oddělení FN, Plzeň)

Akutní promyelocytární leukémie (APL) je charakterizována chromozomální translokací t(15;17) a tomu odpovídající detekcí fúzního genu PML-RAR alfa. Díky nedávnému zavedení moderní léčby, která indukuje rychlou diferenciaci a následnou apoptózu maligních buněk, došlo k výraznému zlepšení celkového přežívání nemocných s touto diagnózou i pravděpodobnosti dosažení kompletní remise, včetně molekulárně genetické. Indukční fáze léčby APL dnes rutinně zahrnuje zejména kombinaci kyseliny all-trans retinové (ATRA) a antracyklinových cytostatik. Další léky, jako např. oxid arsenitý (As₂O₃) byly v našich podmínkách dosud většinou užívány pouze při léčbě relapsu nebo u refrakterní APL, a to jak v monoterapii, tak i v kombinaci s ATRA nebo chemoterapií. V případech primoléčby APL arsentrioxidem jsou však zkušenosti prozatím omezené. Součástí naší práce jsou kazuistiky 3 nemocných, kteří byli léčeni pomocí As₂O₃ v roce 2009

na Hematologicko-onkologickém oddělení FN Plzeň, a to pacientů se vstupně komplikovaným průběhem a nutností intenzivní péče včetně umělé plicní ventilace. Prognosticky nepříznivou variantu APL pak dokládá rovněž leukocytóza při záchytu onemocnění nebo průkaz pozitivivity FLT3/ITD. Všichni pacienti dosáhli při monoterapii As₂O₃ brzké kompletní remise APL a při následné konsolidaci rovněž i molekulárně genetické remise s vymizením PML-RAR alfa fúzního genu. I přes malý soubor nemocných ukazují tyto výsledky na slibný efekt arsentrioxidu v primoléčbě komplikovaných případů APL.

(54) 1659.

Sekundární maligní nádory po úspěšné léčbě akutní myeloidní leukemie – zkušenosti jednoho centra

Szotkowski Tomáš, Hubáček Jaromír, Indrák Karel
(Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc)

S narůstající účinností protinádorové léčby a prodlužujícím se přežitím nemocných narůstá i riziko sekundárních malignit. U akutních leukemií se tento problém týká především nemocných s nejdelším přežitím a s nejvyšší frekvencí vyléčení - nemocných s akutní promyelocytární leukemií (APL). Jde o závažnou, i když zatím vzácnou komplikaci léčby, jejíž význam však v budoucnosti může narůstat. U 8 nemocných, 3 mužů a 5 žen, s mediánem věku při diagnóze AML 48 let, kteří tvořili 2,1% ze všech kurativně léčených AML v našem souboru, bylo v odstupu 10 – 87 (medián 27) měsíců od diagnózy AML po úspěšné léčbě a v trvající kompletní remisi základní choroby diagnostikováno další maligní onemocnění. Jednalo se o 1 nemocnou se sekundární AML, 2 nemocné s T-lymfoblastickým lymfomem (T-LBL), 1 nemocného s primárním B-nehodgkinským lymfomem CNS, 1 nemocnou s myelodysplastickým syndromem typu MDS-RAEB II, 1 nemocného s karcinomem pankreatu a 2 nemocné s melanomem in situ. Nejčastějším subtypem primárního onemocnění byla APL – po její léčbě jsme pozorovali 3 sekundární malignity – karcinom pankreatu, prekursorový T-lymfoblastický lymfom a MDS typu RAEB II. U prvního zmíněného nemocného byla sekundární malignita příčinou smrti. Další 2 nemocné žijí v remisi obou malignit – první po autologní transplantaci, druhá po alogenní transplantaci krvetvorných buněk. Oba nemocní s melanomem byli v době vzniku tohoto nádoru po alogenní transplantaci PKB provedené v rámci léčby prognosticky nepříznivé AML (s odstupem 10 a 30 měsíců), byli léčeni chirurgicky, bez imunoterapie. Celkem 5 nemocných žije v remisi obou nádorových onemocnění (se sekundární AML, T-LBL, MDS-RAEB II a oba nemocní s melanomem), 1 zemřela na komplikace léčby T-LBL a 2 zemřeli na progresi sekundární malignity (CNS lymfom, karcinom pankreatu). Pro většinu nemocných s AML zatím není k dispozici jiná léčba než vysoce myelotoxická chemoterapie, která má řadu nežádoucích účinků, včetně účinků potenciálně kancerogenních a le-

ukemogenních. Významný podíl nemocných se sekundární malignitou v našem souboru tvoří nemocní s APL. Alespoň část z nich by mohla být v nedaleké budoucnosti léčena výhradně léky necytostatické povahy. Podpořeno grantem IGA MZ ČR NR 9481-3 a výzkumným záměrem VZ MŠMT ČR 6198959205.

TRANSFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ

(55) 1843.

Analýza nejčastějších příčin nežádoucích událostí a reakcí u příjemců krví ve Fakultní nemocnici Olomouc v letech 2008 –2009

Galuszková Dana (*Transfuzní oddělení FN, Olomouc*)

Úvod: Přínos krevních transfuzí k léčbě a záchraně lidských životů je nezpochybnitelný již více než sto let a zůstává nadále nepostradatelnou součástí moderní medicíny. Modernizace řady postupů při výrobě transfuzních přípravků (TP), ale i v klinické části, neustále zvyšuje bezpečnost transfundovaných pacientů. Cíl: Zhodnocení a kazuistická prezentace závažných neshod ve Fakultní nemocnici Olomouc za období 2008 - 2009. Metoda: Kauzální rozbor neshod zjištěných na zdravotnických pracovištích v souvislosti s hemoterapií. Výsledky: Ve sledovaném období bylo do nemocnice expedováno 44 680 TU transfuzních přípravků. Počet zjištěných závažných neshod byl 8 (prezentace formou kazuistik). Závěr: Přestože je zdravotnický personál odpovědný za respektování všech zásad bezpečné hemoterapie, došlo ve sledovaném období k 8 záměnám pacientů při odběru vzorků. V sedmi případech měli pacienti rozdílnou krevní skupinu v ABO systému a aplikace těchto transfuzních přípravků by vedla k intravaskulární hemolýze. V jednom případě se rozdíl týkal RhD antigenu. Záměny byly odhaleny buď na transfuzním oddělení (v informačním systému byla uvedena jiná krevní skupina) a nebo při kontrole krevní skupiny u lůžka pacienta. Sledování a vyhodnocování všech rizik souvisejících s hemoterapií je základním principem hemovigilance, přispívající k maximálnímu léčebnému efektu při minimalizaci rizik.

(56) 1802.

Výskyt antierytrocytární aloprotilátek zachycených v rámci prenatálního screeningu na TO FNOL v letech 2000-2009 v jednotlivých testech

Holusková Iva, Sláviková Margita, Lubušský Marek, Galuszková Dana

(*Transfuzní oddělení FN, Olomouc; Gynekologicko-porodnická klinika, Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny LF UP a FN, Olomouc*)

Úvod: Erytrocytární aloimunizace v těhotenství představuje i v dnešní době mnohdy závažný interdisciplinární problém. Antierytrocytární aloprotilátky vznikají jako

reakce mateřského imunitního systému na kontakt s antigeny erytrocytů plodu. Po prostupu placentou do fetálního krevního řečiště následuje destrukce fetálních erytrocytů v retikulo-endoteliálním systému plodu se závažnými klinickými důsledky pro plod. Metodika: V letech 2000-2009 jsme na našem transfuzním oddělení vyšetřili 37983 těhotných žen a sledovali výskyt jednotlivých antierytrocytárních aloprotilátek. U všech těhotných žen byl většinou v prvním trimestru gravidity proveden screening nepravidelných tepelných antierytrocytárních protilátek v nepřímém antiglobulinovém (LISS/NAT) a enzymovém (papain) testu s jejich následnou identifikací pomocí panelu typových erytrocytů metodou sloupcové aglutinace fy Dia-Med. Výsledky: Během posledních 10 let jsme detekovali celkem 561 klinicky významných aloprotilátek. Nejčastější příčinou erytrocytární aloimunizace v graviditě byl antigen E (208/33818), antigen D (150/33818). V období 2000-2009 jsme se zaměřili na záchyt aloprotilátek v jednotlivých testech. V enzymovém (papain) testu bylo detekováno 261 specifických antierytrocytárních aloprotilátek, v LISS/NAT 58 specifických antierytrocytárních aloprotilátek a současně v obou prostředích 272 antierytrocytárních aloprotilátek. V rámci prenatálního screeningu bylo detekováno 872 nespecifických antierytrocytárních protilátek reagujících v enzymovém (papain) testu, 19 protilátek reagovalo v LISS/NAT a 27 reagovalo v LISS/NAT i enzymu. Závěr: V současné době je dle doporučení STL pro prenatální vyšetření doporučeno vyšetřovat pouze v LISS/NAT. Z naší studie vyplývá, že přechodem na vyšetřování těhotných žen pouze v nepřímém antiglobulinovém testu by se výrazně snížil počet námi zachycených nespecifických antierytrocytárních protilátek v enzymovém (papain) testu, které jsou z hlediska HON nevýznamné, a jejichž opakované přešetřování laboratoř často zatěžuje jak z časového tak i ekonomického hlediska.

(57) 1624.

Využívání registru dárců krve

Dudíková Marie, Neničková Marie

(*Transfuzní oddělení a krevní banka FN, Brno*)

Cíl: Transfuzní oddělení a krevní banka Fakultní nemocnice Brno patří k největším zařízením transfuzní služby v České republice. Každoročně je zde realizováno více než 30 000 odběrů plné krve a krevních složek. Cílem práce byla analýza zastoupení jednotlivých krevních skupin v registru aktivních dárců krve v Transfuzním oddělení a krevní bance Fakultní nemocnice Brno se zaměřením na jeho efektivní využívání v průběhu jednoho roku. Metody: V registru aktivních dárců krve, který k 31.12.2009 čítal 15 590 dárců, byla provedena analýza zastoupení jednotlivých krevních skupin. V období 1.1.–31.12.2009 bylo na tomto pracovišti provedeno 24 336 odběrů plné krve. Poměrné zastoupení krevních skupin v realizovaných odběrech plné krve ve sledovaném období bylo konfrontováno s relativní četností jednotlivých

krevních skupin v populaci České republiky. Analýze byl rovněž podroben průměrný počet odběrů plné krve připadajících na jednoho dárce ve sledovaném období. Výsledky: Relativní četnosti krevních skupin v % Krevní skupina 0+ 0- A+ A- B+ B- AB+ AB- Σ Registr dárců k 31.12.2009 24,6 6,0 33,6 7,3 15,7 3,6 7,6 1,6 100 % 30,6 40,9 19,3 9,2 Odběry PK 1.1. – 31.12.2009 26,1 7,4 31,2 8,0 14,7 3,8 6,9 1,9 100 % 33,5 39,2 18,5 8,8 Zastoupení KS v populaci ČR* 26,3 4,7 37,4 6,6 14,4 2,6 6,8 1,2 100 % 31,0 44,0 17,0 8,0 *Hrubiško M. a kol.: Hematologie a transfuziologie, Osveta 1981 Průměrný počet odběrů PK na 1 dárce v r. 2009 Krevní skupina 0+ 0- A+ A- B+ B- AB+ AB- Průměr Počet odběrů 1,7 1,9 1,4 1,7 1,5 1,7 1,4 1,8 1,6 Závěr: I. Zastoupení jednotlivých krevních skupin v registru aktivních dárců krve vykazuje jen malý rozdíl od poměrného zastoupení těchto skupin v populaci České republiky. V rámci každé krevní skupiny je však patrný vyšší podíl Rh D negativních dárců. II. Podíl Rh D negativních krevních skupin v odběrech plné krve realizovaných ve sledovaném období je vyšší, než je jejich zastoupení v registru aktivních dárců krve i v populaci České republiky. III. Využívání registru aktivních dárců krve je výrazně vyšší u Rh D negativních krevních skupin: ve sledovaném období připadá na jednoho dárce Rh D negativní krevní skupiny v průměru 1,8 odběrů plné krve, průměrný počet odběrů u dárců Rh D pozitivních je 1,5.

MNOHOČETNÝ MYELOM

(58) 1778.

Sledovanie pacientov s monoklonálnou gamapatiou nejasného významu pomocou medzinárodného registra RMG (Register of Monoclonal Gammopathy), spolupráca centier ČR a SR

Klincová Mária, Radocha Jakub, Straub Jan, Ščudla Vlastimil, Klásková Kateřina, Walterová Lenka, Štefániková Zdena, Obernauerová Jarmila, Šilerová Věra, Novosadová Libuše, Tóthová Elena, Wróbel Marek, Plonková Hanna, Adamová Dagmar, Schützová Miroslava, Maisnar Vladimír, Hájek Roman, Gregora Evžen

(Interní hematologická klinika, FN, Brno; II. interní klinika - Oddělení klinické hematologie, FN a LF UK, Hradec Králové; I. interní klinika - klinika hematologie I.LF-UK a VFN, Praha; III. interní klinika, FN, Olomouc; Oddělení klinické hematologie, FN Královské Vinohrady, Praha; Krajská nemocnice, Liberec, a.s., Oddělení klinické hematologie, Liberec; Klinika hematologie a transfuziologie FN sP sv. Cyrila a Metoda, Bratislava, SK; Hematologicko-transfúzní oddělení, Mladá Boleslav; Oddělení hematologie a transfuziologie, Pelhřimov; Oddělení klinické hematologie, Havířov; Hematologická klinika FNLP, FN sP a UPJŠ, Košice, SK; Okologické centrum J.G. Mendedla, Nový Jičín; Ústav klinické hematologie FN, Ostrava; Hematologicko-transfúzní oddělení při Slezské nemocnici, Opava; Hematologické oddělení, Plzeň; Interní hematologická klinika, FN, Brno)

Úvod: Termín monoklonálne gamapatie nejasného významu (MGUS) je definovaný prítomnosťou monoklonálneho proteínu (M-proteín), ktorý je možné detekovať v sére a/lebo v moči a nie sú splnené diagnostické kritéria mnohopočetného myelómu, Waldenströmovej makroglobulinémie, AL-amyloidózy či iného lymfoproliferatívneho ochorenia. Záchyt monoklonálneho proteínu býva často náhodným nálezom, kedy nie je nutná špecifická liečba, je to však dôvod k trvalému sledovaniu pacienta, pretože je známe, že MGUS sú prekancerózou mnohopočetného myelómu, do ktorého môžu v priebehu sledovania progredovať. Podľa rizika progresie sa MGUS rozdeľujú do skupín s vysokým rizikom, stredne vysokým, stredne nízkym a nízkym rizikom progresie MGUS do mnohopočetného myelómu. Pre sledovanie klinických dát nemocných s mnohopočetným myelómom a osôb s MGUS bol v roku 2007 vytvorený medzinárodný register monoklonálnych gamapatií (RMG). Súbor a metódy: Počet sledovaných osôb s MGUS v RMG k 31.3.2010 predstavuje 981, 427 mužov a 553 žien, priemerný vek 61,4 (19-93). Pacienti sú sledovaní pomocou kontinuálneho dopĺňovania jednotlivých dát o vývoji zdravotného stavu pacientov prostredníctvom registra z 18 kooperujúcich centier Českej (13 centier) a Slovenskej republiky (5 centier). Čas sledovania je priemere 13,2 roku (menej ako 1 mesiac-32 rokov) Výsledky: Analyzovali sme 411 údajov pacientov zadaných v registri, kde 34,06% (n=140) zaraďujeme do nízkeho rizika, 40,15% (n=165) patrí do stredne nízkeho rizika, 22,84% (n=94) patrí do stredne vysokého rizika a vysoké riziko progresie bolo u 2,92% (n=12) pacientov. Podrobné výsledky našej analýzy budú predmetom prednášky. Záver: Počas 3 rokov svojej existencie sú v RMG k dispozícii dáta od tisícky osôb s MGUS, čo je i v rámci EU veľký register. V prvej analýze sme rozdelili osoby do skupín podľa rizika progresie. V súvisiacich výskumných projektoch sú priebežne analyzované nové prognostické faktory z oblasti flowcytometrie a molekulárnej biológie. Cieľom je určiť vysoko rizikové osoby s MGUS s vysokou pravdepodobnosťou prechodu do mnohopočetného myelómu počas 3 rokov. Takáto skupina s vysokým rizikom progresie môže byť následne zaťažená šetrou experimentálnou liečbou s cieľom nedovoliť vznik nádoru. Kľúčové slová: register monoklonálnych gamapatií, MGUS, prognostické faktory, riziko progresie. Grantová podpora: Článok vznikol za grantovej podpory IGA NS10387 a NS10406.

(59) 1750.

Užití systému HevyLite™ u monoklonálních gamapatií – první zkušenosti

Pika Tomáš, Heřmanová Zuzana, Hobbs Josie, Lochman Pavel, Minařík Jiří, Bačovský Jaroslav, Ščudla Vlastimil (III. interní klinika, LF UP a FN, Olomouc; Ústav imunologie, LF UP a FN, Olomouc; The Binding Site, Birmingham, UK; Oddělení klinické biochemie, FN, Olomouc)

Úvod: Pro monoklonální gamapatie (MG) je typická přítomnost molekul monoklonálního imunoglobulinu (MIG)

nebo jejich fragmentů v séru a/nebo v moči. Nejnovějším testem rozšiřujícím spektrum možností vyšetření MIG je systém HevyLite™, principiálně založený na užití dvojice specifických protilátek proti junkčním epitopům mezi doménami těžkého a lehkého řetězce imunoglobulinu. Cíl: Cílem práce bylo zavedení systému HevyLite™ a provedení pilotní analýzy ve skupině nemocných s MG typu IgA. Metody: Vyšetřený soubor tvořilo 25 nemocných s mnohočetným myelomem (MM) (4 nemocní v době diagnózy nemoci, 3 nemocní v remisi onemocnění a 18 v průběhu onemocnění) a dále 2 jedinci s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS) (1x low-risk, 1x high-risk). Pro stanovení sérových hladin IgA κ , IgA λ byl použit systém HevyLite™ (The Binding Site, UK) a analyzátor BN II (Siemens Healthcare Diagnostics). Výpočtem byl určen poměr IgA κ /IgA λ . Výsledky: Ve skupině nemocných s MM byla u většiny jedinců zjištěna dobrá korelace mezi poměrem IgA κ /IgA λ a typem paraproteinu při elektroforetickém vyšetření, navíc pak nemocní vyšetření v době diagnózy a v průběhu onemocnění vykazovali rovněž i výrazně nižší hladiny alternativní molekuly IgA v důsledku imunitní suprese. U 2 ze 3 nemocných vyšetřených v době remise onemocnění byly zjištěny normální hladiny i poměr IgA κ /IgA λ v souladu s negativním výsledkem elektroforetického a imunofixačního vyšetření. 1 nemocný vykazoval supresi obou IgA párů, zřejmě z důvodu krátkého odstupu od předchozí chemoterapie. U 2 jedinců s MGUS byly zjištěny abnormální hladiny i poměr IgA κ /IgA λ , u jedince s high-risk typem byla i výrazná suprese alternativního imunoglobulinu IgA. Závěr: Předběžně pozorování potvrzuje, že systém HevyLite™ nadějně doplňuje soubor vyšetření, běžně používaných při sledování MG, zejména pak v případech velmi nízkých koncentrací MIG či jen pouhé positivity imunofixační analýzy. Pro definitivní zhodnocení přínosu vyšetření pro klinickou praxi je nutné získání dalších zkušeností. S podporou VVZ MSM 619895205.

(60) 1733.

Korelace flowcytometrických a cytogenetických nálezů u nově diagnostikovaných pacientů s mnohočetným myelomem

Kovářová Lucie, Suská Renata, Burešová Ivana, Franková Nikola, Zarbochová Pavla, Muthu Raja Karthick Raja, Grešlíková Henrieta, Němec Pavel, Smetana Jan, Kupská Renata, Penka Miroslav, Kuglík Petr, Hájek Roman (Oddělení Klinické hematologie - Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, FN Brno, Brno; Babákův výzkumný institut, Univerzitní výzkumné centrum - Česká myelomová skupina, LF MU, Brno; Ústav Experimentální Biologie, PřF MU, Brno)

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je charakterizován přítomností maligních plazmocytů (PC) v kostní dřeni. PC jsou fenotypově velmi různorodé, čemuž odpovídá též přítomnost různých cytogenetických změn. Genetické abnormality jsou významnými ukazateli prognózy, lze tedy předpokládat, že povrchová exprese vybraných markerů by mo-

hla mít obdobnou výpovědní hodnotu. Cíl: Nalezení vztahu mezi antigenním profilem a cytogenetickými aberacemi u pacientů s MM. Pacienti a metody: Bylo analyzováno 110 nově diagnostikovaných neléčených pacientů s MM s mediánem věku 67 let (rozsah 40-88 let). PC kostní dřene byly imunofenotypizací identifikovány jako CD38+CD138+ buňky a na těchto byla dále studována exprese znaků CD19, CD20, CD27, CD28, CD56 a CD117. PC byly pozitivní na daný marker při expresi vyšší než 30%. Separované PC byly dále analyzovány pomocí interfázní fluorescenční in situ hybridizace (FISH) za použití sond pro del(13)(q14), del(17)(p13), t(4;14)(p16.3;q32), 1q21 a hyperdiploidii. Výsledky: Plazmocyty byly detekovány u všech analyzovaných pacientů s mediánem 8.4% (rozsah 0,1-75,3). Klonální CD19+ PC byly nalezeny u jediného 1 pacienta s del(13)(q14). U dalších 4 pacientů s nálezem CD19+ PC představovaly tyto reziduální polyklonální PC bez chromozomálních abnormalit. Exprese znaku CD20 byla nalezena u 8,2% (9/110) pacientů, avšak nekorelovala s žádnými cytogenetickými změnami, ačkoliv del(13)(q14) byla zjištěna u 42,6% (43/101) CD20- PC. Znaky CD27 a CD28 byly exprimovány u 31,8% (35/110) a 20,9% (23/110) pacientů a nekorelovaly s cytogenetickými nálezy. CD56- PC byly detekovány u 20,0% (22/110) pacientů, přičemž bylo nalezeno obdobné rozložení cytogenetických změn u CD56+ a CD56- PC. Exprese znaku CD117 byla zjištěna u 31,8% (35/110) pacientů a významně korelovala s hyperdiploidii [51,4% vs. 26,7%; p<0,05], naopak negativita pro CD117 odpovídala del(13)(q14) [50,7% vs. 20,0%; p<0,01]. Dále bylo zjištěno, že del(17)(p13) a t(4;14)(p16.3;q32) patří mezi méně časté aberace u MM a nepojí se se specifickým fenotypem, navíc t(4;14) nebyla nalezena u žádného z CD20+, CD117+ či CD56- případů. Závěr: Analýzy fenotypového a cytogenetického profilu potvrdily znak CD117 (jeho pozitivitu či negativitu) jako jediný marker korelující s chromozomálními změnami. Studium pacientů v delším časovém horizontu přinese též informace o jejich prognóze. Podpořeno projekty GAČR 301/09/P457, MŠMT LC06027, MSM0021622434, IGA 10408-3, IGA 10406-3, IGA 10207-3 a GAČR P304/10/1395.

(61) 1652.

Proteomická analýza proteinů krevní plazmy u mnohočetného myelomu s využitím dvourozměrné elektroforézy polyakrylamidovém gelu a hmotnostní spektrometrie

Čumová Jana, Potáčková Anna, Jedličková Lenka, Šedo Ondřej, Zdráhal Zbyněk, Hájek Roman (Univerzitní výzkumné centrum - Česká myelomová skupina, Babákův výzkumný institut, LF MU, Brno; Oddělení funkční genomiky a proteomiky, Ústav experimentální biologie, PřF MU, Brno; Interní hematologická klinika, FN Brno a LF, Brno)

Úvod: Hledání nových prediktivních faktorů je jedním z hlavních cílů všech významných onkologických praco-

višř. Cílem této experimentální práce je vyhledávání proteinů rozdílně zastoupených v krevní plazmě pacientů nemocných mnohočetným myelomem po léčbě novými léky, u kterých je známa léčebná odpověď. Materiál a metody: Celkem u 16ti vzorků krevní plazmy jsme provedli optimalizační postupy pro výběr vhodné metody pro odstranění majoritních proteinů krevní plazmy (albumin, imunoglobuliny aj.) potřebné pro následnou 2-DE či LC-MS/MS analýzu proteinů. Byly vyzkoušeny 3 metody (ProteoPrep, MARS, ProteoMiner) a 3 techniky pro odsolení frakce minoritních proteinů. U 10ti vybraných pacientů nemocných MM, kteří podstoupili léčbu bortezomibem byla provedena srovnávací 2-DE analýza nízkoabundantních proteinů krevní plazmy získaných paralelně metodami MARS a ProteoMiner. Vzorky krve byly odebrány před plánovanou léčbou do zkumavek SARSEDT obsahujících K3EDTA, plazma byla uložena při teplotě -80°C pro následnou analýzu. Výsledky: Metoda ProteoPrep umožnila rozdělit na 12ti 2-DE mapách v průměru 436 protein. spotů (473-524). Na 9ti 2-DE mapách bylo separováno celkem s využitím MARS-6Hu+dialýza: 344 protein. spotů (387-323), MARS-6Hu+srážení plazmy: 204 (rozmezí: 238-169), MARS-6Hu+kolonka 5kDa: 258 (230-298) protein. spotů. Srovnání metod ProteoMiner a MARS-14Hu+mRP-C18 umožnilo pomocí LC-MS/MS identifikovat celkem 49 % (36/74) proteinů, unikátně metodou ProteoMiner bylo identifikováno 32 % proteinů. Po depleci metodou MARS-14Hu bylo identifikováno celkem 36 % (27/74), 27 % proteinů bylo identifikováno jako unikátních. Byly identifikovány proteiny ceruloplasmin, apolipoprotein C, D, E3, komplement faktory B, H, vitronectin, kininogen aj. Optimální metodami pro odstranění vysokoabundantních proteinů byly vybrány metody MARS-6Hu a ProteoMiner. Výsledky 2-DE z aktuálně probíhající image analýzy obrazu budou zveřejněny. Závěr: V naší práci jsme analyzovaly možnost využití různých technik pro odstranění majoritních proteinů krevní plazmy pro následné dělení proteinů metodou 2-DE. Proteomická analýza krevní plazmy potřebuje čas na vyřešení mnoha svých potíží. Vhodnou metodou pro její analýzu je hmotnostní spektrometrie. Práce vznikla za podpory grantů: MŠMT LC06027, MSM0021622434 a MSM0021622415.

(62) 1647.

Association of CD44s and their isoforms with prognostic features of multiple myeloma

Muthu Raja Karthick Raja, Buresova Ivana, Kovarova Lucie, Stossova Jana, Hajek Roman
(Babak Research Institute, Pavilon A3, ILBIT, Masaryk Univeristy, Brno, Czech Republic)

Background: Plasma cell (PC) adhesion molecules such as CD56 and CD138 append indispensable diagnostic and prognostic values in PC disorders. Well CD44 standard (CD44s) and their variant (CD44v) iso-

Table I: Frequency of CD44s, v4 and v6 expression in BMPCs

Patient Group	PCs CD44s+ median (range)	PCs CD44v4+ median (range)	PCs CD44v6+ median (range)
MGUS	96.38(81.7-98.8)	5.58(1.33-11.76)	13.18 (2.13-22.25)
MM	92.7(17.5-99.3)	6.03(0.2-29.45)	9.4(1.64-53.57)
Relapse	93.15(5.3-99.9)	5.12(0.04-29.47)	9.52(0.46-41.05)

forms also extends the adhesion property of PCs; few studies screened its prognostic features in multiple myeloma (MM) but to date only contrasting results exists. So, we prompted to assess CD44s and CD44v influence in myeloma patients (pts) and their association with clinical features of MM. Objective: Quantification of CD44s and CD44v4, v6 for differential expression in various clinical representations including MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance), MM and relapsed MM. Addressing the clinical relevance of CD44s and CD44v expression in myeloma cells. Patients and Methods: In this preliminary study a total of 43 pts including MGUS -9(21%), MM-14(33%) and relapse-20(46%) have been evaluated for CD44s and CD44v4, v6 expression in bone marrow PCs (BMPCs) by simple 5-color flow cytometry. Mann-Whitney U/Kruskal-Wallis test were used to estimate the statistical significant difference between groups and correlation analysis was performed by Spearman rank order correlation. Results: This study revealed a decrease paradigm for CD44s and CD44v6 expression in BMPCs of MM compared to MGUS, unfortunately difference didn't reach statistical significance. In term of CD44v4 a similar pattern of expression was observed between MGUS vs. MM vs. relapse (Table I: summarizes the frequency of BMPCs CD44s, v4 and v6 expression). For up regulated CD44v4 expression in BMPCs, univariate analysis selected <10% of BMPCs ($P=0.003$), <30g/L of M-protein ($P=0.005$) and >5% of normal BMPCs ($P=0.032$). Moreover <50% of BMPCs CD44s expression was associated with increased level of BMPCs ($P=0.013$) and M-protein ($P=0.002$) and low frequency of normal BMPCs ($P=0.009$). A positive correlation was observed between CD44v4 vs. CD44v6 ($r=0.53$; $P<0.001$) and both of these molecules inversely associated with BMPCs. Conclusions: Disclosing statement from this preliminary study is CD44v4 associate with good prognostic features rather CD44s associate with adverse prognostication of MM. This profound result should be confirmed in large patient cohort. This study has been supported by GACR P304/10/1395, LC06027 and MSM 0021622434.

(63) 1632.**B-cells with centrosome amplification as a possible myeloma cell precursors**

Kryukov Fedor, Dementyeva Elena, Nemeč Pavel, Buresova Ivana, Smetana Jan, Greslikova Henrieta, Kupská Renata, Kuglik Petr, Hajek Roman

(University Research Centre, Czech Myeloma Group, Babak Research Institute, Masaryk University, Brno, Czech Republic; University Research Centre, Czech Myeloma Group, Babak Research Institute, Masaryk University, Department of Internal Medicine and Hematooncology, The Faculty Hospital Brno, Brno, Czech Republic)

Background. Multiple myeloma (MM) is a lymphoproliferative disease characterized by the clonal expansion of neoplastic plasma cells within the bone marrow. Although PCs are recognized as fully malignant cells, the exact developmental stage at which malignant transformation occurs is still unknown. In our study, centrosome amplification (CA) was chosen as potential precursor marker, reflecting mitotic disruption in carcinogenesis. **Aims.** The objective of our study was to evaluate the presence of CA in B-cells and PCs – from MM patients and to assess whether it is associated with the most common chromosomal abnormalities in malignant PCs. **Methods.** Immunofluorescent labeling was used for the evaluation of centrosome amplification (CA) in B-cells (CD19+) and PCs (CD138+) of MM patients. Samples with $\geq 11\%$ of B-cells or $\geq 10\%$ of PCs with >4 fluorescence signals of centrin (centrosome protein) were considered CA positive. A total of 101 patients were evaluated for CA in PCs and/or B-cells, including 31 patients where both cell types were analyzed. The patient population characteristics were as follows: males/females 50/51, median age of 66 years (range, 40-92 years). Most patients had advanced stage of MM (DS II/III n = 69; ISS II/III n = 61). cIg FISH was performed on plasma cells by well-known methods. **Results.** The frequency of MM cases positive for CA was 34% (26/77) and 34% (18/53) based the analysis of PC samples and B-cell samples, respectively. Overall, 19% (6/31) of MM patients were double-positive. After splitting patients based on CA threshold, significant correlation was identified only in double-positive group ($r = -0,986$, $p < 0,05$). Significant correlation of centrosome amplification in PCs with del(13)(q14), del(17)(p13), gain(1)(q21), or hyperdiploidy wasn't shown. But association of CA in B-cells with PCs hyperdiploidy using phi 4-point correlation was proven ($\phi = 0,45$, $p < 0,05$). **Conclusion.** In our study, we showed association of CA in B-cells with PCs hyperdiploidy. This fact relates to role of mitotic disruption in MM aneuploidy and cell carcinogenesis. In association with correlation between B-cells and PCs with CA, we suppose that B-cells with CA are part of myeloma genesis. **Acknowledgments.** This study was supported by grants MSM 0021622434 and IGA 10207-3 from the Departments of Education and Health of the Czech Republic.

(64) 1630.**Jednonukleotidové polymorfizmy spojené se zvýšenou rizikovostí k trombóze u pacientů s mnohočetným myelomem**

Almáši Martina, Ševčíková Sabina, Šváchová Hana, Pour Luděk, Sábliková Barbora, Kyjovská Drahomíra, Vidláková Petra, Hájek Roman

(Babákův výzkumný institut, lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno)

Úvod: Žilní tromboembolie (VTE) a pozdější možný rozvoj plicní embolie je častým vedlejším účinkem léčby thalidomidem u pacientů s mnohočetným myelomem (MM). Kandidátní jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs) byly vybrány na základě výsledků projektu BOAC („Bank On A Cure“). Cílem bylo zjistit prevalenci polymorfizmů, spojených s výskytem trombózy u pacientů s MM v české populaci. **Metody:** Genomová DNA byla testována u 65 pacientů s diagnostikovaným MM (32 žen / 33 mužů); průměrný věk při zahájení terapie 59,3 let. K výskytu trombózy došlo u 25 % pacientů (16/65) léčených thalidomidem, z nichž 94 % (61/65) bylo bez antitrombotické profylaxe a 6 % (4/65) s profylaxí. Pro SNPs analýzy byla použita metoda real-time PCR na přístroji Step-One. Hardy-Weinbergerova rovnováha, byla testována u každého polymorfizmu pomocí testu χ^2 . Pro statistické analýzy byl použit model logistické regrese k vyjádření poměru šancí (ORs, odds ratio) a 95% intervalu spolehlivosti (CI). Všechny testy byly provedeny na 5% hladině významnosti. Homozygot nejčetnější alely byl zvolen jako referenční skupina, ke které se vztahoval poměr šancí. **Výsledky:** Polymorfizmus genu ALDH-1A1 (rs168351) nespĺňoval podmínky H.-W. rovnováhy a byl dále vyřazen z analýzy. Ostatní polymorfizmy tyto podmínky spĺňovaly; gen C1NP (rs7011) pacienti s trombózou ($\chi^2 = 1,778$; $P = 0,411$) a pacienti bez trombózy ($\chi^2 = 0,108$; $P = 0,947$), gen CETP (rs289747) ($\chi^2 = 0,236$; $P = 0,888$) a ($\chi^2 = 0,218$; $P = 0,897$), gen ALDH1A1 (rs610529) ($\chi^2 = 1,985$; $P = 0,371$) a ($\chi^2 = 0,208$; $P = 0,901$), gen CDKN1A (rs3829963) ($\chi^2 = 0,852$; $P = 0,653$) a ($\chi^2 = 0,783$; $P = 0,676$), gen GAN (rs2608555) ($\chi^2 = 0,000$; $P = 1,000$) a ($\chi^2 = 0,109$; $P = 0,947$), gen VEGF (rs699947) ($\chi^2 = 0,000$; $P = 1,000$) a ($\chi^2 = 0,980$; $P = 0,613$). U několika genotypů jsou výsledky blízké statistické významnosti: u pacientů s trombózou byla pozorována zvýšená frekvence genotypu CC genu ALDH-1A1 (rs610529) (43,8 % vs. 20,4 %, ORs=3,03 ve srovnání s ostatními genotypy; $p = 0,072$) a snížená frekvence genotypu CC genu VEGF (rs699947) (6,3 % vs. 26,5 %, ORs=0,13 ve srovnání s genotypem AA; $p = 0,066$). Pro ověření naznačených vztahů bude nutné vyšetření rozsáhlejšího souboru pacientů, který doplňujeme o další MM pacienty s trombózou. **Závěr:** Zjištěné údaje o frekvenci variantních polymorfizmů spojených s výskytem trombózy mohou napomoci k efektivnějším a racionálnějším profylaktickým opatřením této komplikace léčby u pacientů s MM. Podporováno: LC06027, MSMT0021622434

(65) 1628.**Heterogenní exprese markeru neuronálních kmenových buněk nestinu u pacientů s monoklonální gamapatií**Šváchová Hana, Pour Luděk, Kovářová Lucie, Burešová Iva, Muthu Raja Karthick Raja, Hájek Roman
(*Babákův výzkumný institut, LF, Masarykova univerzita, Brno; Interní hemato-onkologická klinika, FN, Brno*)

Úvod Nestin, protein intermediárních filament, je považován za charakteristický marker multipotentních prekursorových buněk s proliferačním, migračním a diferenciacním potenciálem. Během diferenciacce je exprese nestinu downregulována, ale může být reaktivována po úrazech či za jiných patologických podmínek. Nestin je také detekován v mnoha solidních nádorech, kde hraje kritickou roli v agresivním chování, migraci a proliferaci buněk a zdá se být vhodným diagnostickým a prediktivním indikátorem stupně malignity nádorů. Cílem této pilotní studie bylo potvrdit expresi proteinu nestinu v plazmatických buňkách (PC) u pacientů s monoklonální gamapatií (MG). Metody Do naší pilotní studie bylo zahrnuto celkem 34 MG pacientů (21M/13Ž; median věku 68 let) v zastoupení: 91 % (31/34) mnohočetný myelom (MM), 3 % (1/34) monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS), 3 % (1/34) nesekreční MM a 3 % (1/34) plazmocelulární leukemie (PCL). 5 pacientů bez MG bylo použito jako kontrolní skupina. Mononukleární buňky kostní dřene byly analyzovány pomocí 3-barevné průtokové cytometrie. Intracelulární protein nestin byl detekován přímým značením CD38+CD138+ PC. Expresce nestinu byla hodnocena jako procento nestin-pozitivních PC (Nes+PC) a pomocí medianu fluorescenční intenzity (MFI) exprese nestinu v PC. Expresce nestinu v PC byla validována metodou nepřímé imunofluorescence na 3 reprezentativních vzorcích a metodou western blot na 7 reprezentativních vzorcích. Výsledky Flowcytometrická analýza potvrdila heterogenní expresi nestinu mezi 34 MG pacienty. Median procenta Nes+PC: 21,2 % (rozsah, 0%-95,4%). V kontrolní skupině median Nes+PC nepřesáhl 1,5% (rozsah, 0,3%-2,7%). Median MFI exprese nestinu: 442 (rozsah, 0-6764). Metodou nepřímé imunofluorescence byla exprese nestinu potvrzena u všech 3 analyzovaných vzorků jako síť nestinových vláken či jako difúzní signál v cytoplazmě PC. Metoda western blot kvalitativně potvrdila expresi nestinu v PC ve všech 7 MG případech. Závěr V naší studii jsme jako první na souboru 34 pacientů s MG potvrdili heterogenní expresi nestinu na proteinové úrovni v CD138+CD38+ PC a kvantifikovali pomocí průtokové cytometrie. Expresce proteinu nestinu v maligních PC, které jsou považovány za proliferačně utišené a terminálně diferencované, je zcela nový fenomén vyžadující pozornost a další studium, které by objasnilo roli tohoto proteinu v patogenezi monoklonálních gamapatií. Práce vznikla za podpory: VC MŠMT ČR LC06027 a P304/10/1395.

(66) 1759.**Vakcína na bázi dendritických buněk u nemocných s mnohočetným myelomem může přispět ke stabilizaci onemocnění – výsledky klinické studie fáze II**Zahradová Lenka, Mollová Klára, Očadlíková Darina, Kovářová Lucie, Büchler Tomáš, Krejčí Marta, Adam Zdeněk, Pour Luděk, Křivanová Andrea, Hájek Roman, Michálek Jaroslav
(*Interní hemato-onkologická klinika, FN, Brno; Babákův výzkumný institut, Masarykova univerzita, Brno; LEHABI, Oddělení klinické hematologie, FN, Brno; Pediatrická klinika, FN, Brno*)

Imunoterapie je perspektivní možností ovlivnění onkologických onemocnění. Na našem pracovišti proběhla v letech 2006-2009 klinická studie fáze II, kdy byla nemocným s mnohočetným myelomem podána autologní protinádorová vakcína. Vakcína obsahovala dendritické buňky naložené autologním monoklonálním imunoglobulinem - Id-proteinem. Každému z 11 nemocných zařazeným do studie bylo podáno intradermálně celkem 6 vakcín v měsíčních intervalech. Po dobu vakcinace a dalších 6 měsíců byla sledována klinická a imunologická odpověď na vakcínu. Výsledky byly porovnávány se skupinou 13 nemocných, kteří prošli prescreeningem a do studie nebyli zařazeni. Vakcína obsahovala dendritické buňky kultivované z mononukleárních buněk periferní krve a naložené autologním Id-proteinem dle podmínek GCP. Vakcína splňující testy bezpečnosti a jakosti byla aplikována. Vedle léčebné odpovědi byla hodnocena funkční charakteristika dendritických buněk pomocí imunofenotypizace, imunologická odpověď metodou ELISpot a kožním DTH testem a hodnocením změn imunitního systému průtokovou cytometrií. V průběhu 12-ti měsíčního sledování přetrvávalo u 73% (8/11) nemocných stabilní onemocnění a u 27% (3/11) došlo k progresi. V průběhu celkové doby sledování s mediánem 33 měsíců (11 - 43 měsíců) zůstává dosud onemocnění stabilní bez nutnosti protinádorové léčby u 64% (7/11) nemocných. Medián zahájení následné protinádorové léčby u ostatních 4 nemocných byl 19,25 (13-23,5) měsíců od zahájení vakcinací. U kontrolní skupiny bylo nutné zahájení léčby u 62% (8/13) nemocných, celková doba sledování byla 13 měsíců. Vakcína byla dobře snášena bez závažných vedlejších účinků. Imunitní odpověď metodou ELISpot byla zaznamenána u 91% (10/11) nemocných, z toho u 36% (4/11) byla imunitní odpověď na Id-protein přítomná již před podáním vakcíny a udržela se i v průběhu 12 měsíců od zahájení vakcinace. Kožní DTH test Id proteinem byl pozitivní u 73% (8/11) nemocných, z toho 46% (5/11) mělo vytvořenou DTH imunitní odpověď již před zahájením vakcinace, u 27% (3/11) došlo k navození imunitní odpovědi vakcinací. Vakcína na bázi dendritických buněk naložených Id-proteinem je bezpečná a vyvolává nebo udržuje specifickou imunitní odpověď u nemocných s mnohočetným myelomem. Její klinický přínos je sice sporný, u žádného z nemocných nedošlo k navození remise, vakcína

však mohla přispět ke stabilizaci onemocnění zaznamenaného u dvou třetin nemocných. Podpořeno VZ LC06027 a NPVII 2B06058.

(67) 1752.

Polyneuropatie při léčbě lenalidomidem

Machálková Kateřina, Maisnar Vladimír, Špička Ivan, Minařík Jiří, Pour Zdeněk, Pavlíček Petr, Kaisarová Petra, Ščudla Vlastimil, Straub Jan, Gregora Evžen, Schützová Miroslava, Hájek Roman, Radocha Jakub

(II.interní klinika - oddělení klinické hematologie LFUK a FN, Hradec Králové; I. interní klinika hematoneurologie VFN a 1.LF UK, Praha; III.interní klinika FN a LFUP, Olomouc; Interní hematoneurologická klinika FN a LFMU, Brno; Oddělení klinické hematologie FNKV a 3.LF UK, Praha; Hemato-onkologické oddělení FN a LFUK, Plzeň; Interní hematoneurologická klinika FN a LFMU, Brno)

U pacientů s monoklonálními gamapatiemi je výskyt periferní polyneuropatie relativně častý. Může být způsobena primárně v souvislosti s přítomností paraproteinu, kdy dochází k poškození axonů i demyelinizaci nervových vláken v důsledku ukládání depozit patologického imunoglobulinu či amyloidu. Častěji jde o sekundární postižení v důsledku léčby některými „novými léky“, v současnosti se jedná především o thalidomid a inhibitor proteazomu bortezomib. Nově používaný analog thalidomidu – lenalidomid, vznik periferní polyneuropatie, podle dosavadních zkušeností, způsobuje pouze u cca 5% nemocných a významně nezhoršuje ani polyneuropatii způsobenou předchozí léčbou. Cílem naší analýzy bylo ověřit tato data na souboru nemocných léčených lenalidomidem v České republice. Do konce roku 2009 byla v České republice zahájena léčba Lenalidomidem celkem u 205 nemocných, z toho u 160 (78%) z nich byla dostupná data o polyneuropatii před i po léčbě lenalidomidem. U 63,1% (101/160) pacientů byly přítomny v době zahájení léčby známky periferní polyneuropatie (grade 1 u 15,6%, grade 2 u 16,2%, grade 3 u 3,7%, grade 4 u 0,6%), nejčastěji související s předchozí léčbou. V průběhu léčby lenalidomidem došlo u 3,8% (6/160) nemocných k jejímu dalšímu zhoršení, u stejného počtu, tj. 3,8% pacientů (6/160) se stupeň neuropatie naopak snížil. Celkem u 5,6% nemocných analyzovaného souboru se objevila neuropatie nově (9/160 – z toho u 7 pacientů grade 1, u dvou grade 2). Naopak u 36,3% nemocných (58/160) došlo v průběhu léčby Lenalidomidem k úplnému ústupu známek neuropatie. U 13,8% pacientů (22/160) zůstala neuropatie na stejném stupni jako při zahájení léčby. Celkem se tedy neuropatie zhoršila u 9,4% pacientů (15/160), z nichž u 9 pacientů se objevila nově. Celkem se neuropatie zlepšila u 64 pacientů (40%), z nich u 58 pacientů došlo k úplnému vymizení známek neuropatie. Byl prokázán statisticky významný rozdíl ve výskytu periferní neuropatie před a po léčbě lenalidomidem. Zatímco k vymizení neuropatie došlo u 58 pacientů, nově se

neuropatie objevila pouze u 9 pacientů ($p < 0.001$). Lze tedy shrnout, že ani v našem souboru pacientů nedošlo v průběhu léčby Lenalidomidem k výraznému nárůstu či zhoršování neuropatie, která jinak významně zhoršuje kvalitu života nemocných. Z tohoto důvodu je dnes lenalidomid lékem volby u pacientů se závažnou neuropatií, ať už je její příčina jakákoliv, a zatím nejvhodnějším kandidátem pro dlouhodobou udržovací léčbu.

(68) 1734.

Účinnost lenalidomidu u pacientů s mnohočetným myelomem rezistentních na předchozí podávanou léčbu

Pour Luděk, Špička Ivan, Gregora Evžen, Maisnar Vladimír, Schützová Miroslava, Kaisarová Petra, Minařík Jiří, Pavlíček Petr, Straub Jan, Radocha Jakub, Adam Zdeněk, Hájek Roman

(HOK FN Brno, Masarykova univerzita, Brno; I. interní klinika, VFN, Praha; III. interní klinika, FN, Olomouc; Oddělení klinické hematologie, FN Královské Vinohrady, Praha; Oddělení klinické hematologie, FN, Hradec Králové; Hemato-onkologické oddělení FN, Plzeň; Babákův výzkumný institut, LF MU, Brno; IHOK FN, Brno)

Úvod: Lenalidomid patří mezi imunomodulační látky známé jako IMIDy, látky strukturou příbuzné thalidomidu. U nemocných s mnohočetným myelomem (MM) byla v klinických studiích prokázána vysoká účinnost tohoto léku v primoléčbě i u relabovaných nemocných. Limitující toxicitou při léčbě lenalidomidem je myelosuprese, avšak lék nezpůsobuje nepříjemnou neuropatii na rozdíl od thalidomidu a bortezomibu. V České republice je lenalidomid používán u relabovaných nemocných mimo klinické studie od roku 2008. Tato práce přináší analýzu léčebné účinnosti lenalidomidu u nemocných s MM refrakterních na předchozí podávanou léčbu v šesti referenčních centrech CMG v České republice. Metodika a soubor pacientů Do analýzy bylo zahrnuto 41,8% (69/174) pacientů léčených lenalidomidem v ČR v letech 2008-2009. Tyto byli rezistentní na poslední podávanou léčebnou linii předcházející léčbě lenalidomidem. Celkem 6% (4/69) pacientů rezistentních na předchozí podávanou léčbu bylo lenalidomidem léčeno ve 2. linii, 26% pacientů (18/69) ve 3. linii léčby, 36% (25/69) ve 4. linii a u 32% (22/6) pacientů rezistentních na předchozí léčbu byl Revlimid použit ještě v pozdějších stadiích choroby. Jako pacienti rezistentní na předchozí léčbu byli označeni pacienti, kteří v poslední linii léčby před léčbou Lenalidomidem dosáhli léčebné odpovědi progresu (PG) nebo Výsledky: Vzhledem k nezralým datům z použitého registru a době používání lenalidomidu pro léčbu MM v ČR bylo možno hodnotit léčebnou odpověď při použití lenalidomidu pouze u 44% (30/69) nemocných rezistentních na předchozí podávanou léčbu. Léčebná odpověď byla zaznamenána u 13% (4/30) nemocných (1x kompletní remise, 1x velmi dobrá parciální remise, 1x parciální remise) u dalších 7% (2/30) byla zaznamenána minimální remise, a u 13% (4/30) by-

lo onemocnění hodnoceno jako stabilní. Závěr: I přes nezralá data a malý počet nemocných byla prokázána účinnost lenalidomidu u pětiny nemocných rezistentních na předchozí podávanou léčbu. Vzhledem k rezistenci a skutečnosti, že v našem souboru byli sledováni velice předlčení nemocní (1/3 třetí relaps, 1/3 čtvrtý a další relaps) jedná se nepochybně o jednu z nejhůře léčebně ovlivnitelných skupin pacientů s MM. Společně s velmi dobrou tolerancí lenalidomidu, s předvídatelnou toxicitou hematologickou je u takto prognosticky nepříznivé skupiny nemocných léčba lenalidomidem nepochybně dobrou volbou a představuje další významný pokrok v léčbě MM.

(69) 1719.

Lenalidomid v terapii relapsu mnohočetného myelomu – porovnání účinnosti při časnějším použití

Radocha Jakub, Špička Ivan, Minařík Jiří, Pour Luděk, Pavlíček Petr, Kaisarová Petra, Machálková Kateřina, Ščudla Vlastimil, Straub Jan, Gregora Evžen, Schützová Miroslava, Maisnar Vladimír, Hájek Roman

(II. interní klinika - oddělení klinické hematologie LFUK a FN, Hradec Králové; I. interní klinika hematologické VFN a 1.LF UK, Praha; III. interní klinika FN a LFUP, Olomouc; Interní hematologická klinika FN a LFMU, Brno; Oddělení klinické hematologie FNKV a 3.LF UK, Praha; Hematologicko-onkologické oddělení FN a LFUK, Plzeň; Interní hematologická klinika FN a LFMU pro CMG, Brno)

Úvod: Lenalidomid je derivát thalidomidu požívaný k léčbě mnohočetného myelomu, obvykle v kombinaci s kortikoidy a dalšími konvenčními cytostatiky. Jeho účinnost je podle dostupných studií vysoká, obvykle nejvyšší při použití v primoterapii. Naším cílem bylo porovnat účinnost léčby lenalidomidem v jednotlivých liniích léčby. V ČR není lék registrován pro primoterapii. Pacienti a metody: Celkem 174 nemocných z 6 center v České republice bylo léčeno režimem na bázi lenalidomidu od druhé poloviny roku 2008 do konce roku 2009. Základní statistické vyhodnocení bylo provedeno na celém souboru. Byly analyzovány léčebné odpovědi a celkové přežití u pacientů léčených v jednotlivých léčebných liniích. Pouze 31 % pacientů bylo léčeno lenalidomidem v 1. až 3. relapsu onemocnění, 69 % pacientů bylo léčeno v dalších relapsech onemocnění. Medián doby sledování je 5,4 měsíců. Výsledky: Celkové přežití pacientů v 1.-3. relapsu ve 12 měsících bylo 61,5 %, u pacientů léčených ve vyšších relapsech 51,5 % ($p=0,785$). Stejně tak celková léčebná odpověď byla 26,8 % oproti 13 % ($p=0,345$). Závěr: Doba sledování je velmi krátká a bude potřeba delší čas sledování k definitivnímu zhodnocení rozdílu mezi účinností v časnější a pozdní fázi onemocnění. Na druhou stranu i u pokročilého onemocnění je lék účinný, neboť více než polovina nemocných přežívá více než 1 rok od zahájení léčby lenalidomidem.

(70) 1708.

Vliv indukčního režimu s thalidomidem na výtěžek separace periferních kmenových buněk u nemocných s mnohočetným myelomem

Lánská Miriam, Maisnar Vladimír, Radocha Jakub, Žák Pavel, Zavřelová Alžběta, Bláha Milan, Horáček Jan, Doskočilová Karolína, Malý Jaroslav

(II. interní klinika - Oddělení klinické hematologie FN a LF, Hradec Králové)

Úvod: V posledních letech se v léčbě mnohočetného myelomu stále více uplatňuje použití tzv. „nových léků“. Řada klinických studií prokázala zlepšení odpovědi na léčbu i celkového přežití u nově diagnostikovaných nemocných při použití thalidomidu v indukčních režimech. Od počátku roku 2008 se thalidomid stal součástí primoterapie nemocných s mnohočetným myelomem i v České republice. Úspěšnost následné autologní transplantace periferních kmenových buněk (PKB) je podmíněna dostatečným výtěžkem PKB při separaci. Cílem tohoto sdělení bylo srovnání vlivu dvou různých indukčních režimů na výtěžek PKB: režimu CTD (cyklofosfamid, dexametason, thalidomid) a standardního VAD resp. AD režimu. Pacienti a metody: Retrospektivně jsme vyhodnotili data 42 nemocných s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem. 21 nemocných (medián 59 let, rozmezí 33-68let) bylo léčeno režimem CTD a 21 nemocných (medián 58 let, rozmezí 48-65 let) režimem VAD nebo AD. Jako mobilizační režim byl použit cyklofosfamid v dávce 2,5 g/m² spolu s G-CSF v dávce 5-10 ug/kg. U všech nemocných jsme hodnotili celkový výtěžek CD 34+ buněk/kg, počet aferéz, dosažení cílové hodnoty 5x 10⁶ CD 34 + buněk/kg. Výsledky: Celkem bylo analyzováno 23 mobilizačních cyklů u nemocných léčených CTD (2 nemocní museli být mobilizováni dvakrát v důsledku insuficientního štěpu po první mobilizaci) a 21 cyklů ve skupině VAD. Průměrný počet aferéz byl 3,82 (rozmezí 2-5) a 2,1 (rozmezí 1-5). Průměrný celkový počet CD 34+buněk/kg byl v CTD skupině 5,74 x 10⁶ (0,99-15,9) a 9,24 x 10⁶ (0,26-29,12) ve VAD skupině, průměrný výtěžek jedné separace byl 1,5 resp. 4,21 x 10⁶ CD 34+buněk/kg. V CTD skupině bylo k dosažení cílové hodnoty výtěžku nutných více dnů separací – 82% nemocných bylo separováno 3 a vícekrát na rozdíl od VAD skupiny – 28%. Cílového výtěžku jsme dosáhli pouze u 61% nemocných léčených CTD ve srovnání s 90% u VAD skupiny. U 6 nemocných s CTD a 1 nemocného s VAD jsme získali insuficientní štěp (<2x 10⁶). 3 nemocní v CTD skupině byli následně úspěšně mobilizováni stejným režimem s přidáním Plerixaforu. Závěr: Prokázali jsme statisticky významné snížení výtěžku PKB u nemocných, u nichž byl v rámci indukce použit thalidomidový režim. Současně u nemocných léčených thalidomidem byl k dosažení dostatečného štěpu nutný větší počet separací PKB. Recentní informace o vlivu thalidomidu na výtěžek PKB jsou rozporuplné, nicméně vhodnějším lékem pro použití v rámci indukčních režimů se zdá být bortezomib.

(71) 1698.

Schnitzlerův syndrom a naše zkušenosti s léčbou Anakinrou u dvou pacientů

Szturcz Petr, Adam Zdeněk, Čorbová Drahomíra, Neubauer Jiří, Prášek Jiří, Koukalová Renata, Řehák Zdeněk, Mayer Jiří

(Interní hematologická klinika LF MU a FN, Brno; Dermatovenerologická klinika LF MU a FN, Brno; Radiologická klinika Lékařské fakulty MU a FN, Brno; Klinika nukleární medicíny LF MU a FN, Brno; Oddělení nukleární medicíny, PET Centrum Masarykova onkologického Ústavu, Brno)

Schnitzlerův syndrom je vzácné idiopatické onemocnění charakterizované chronickou kopřivkou, přítomností monoklonálního imunoglobulinu třídy IgM a dalšími znaky. V této kazuistice popisujeme úspěšnou léčbu preparátem anakinra u dvou pacientů sledovaných na naší klinice. U prvního pacienta, muže narozeného 1944, začaly obtíže v 45 letech, kdy se objevily kožní projevy ve formě intenzivně svědící kopřivky, pro níž byl muž několik let sledován na různých dermatologických ambulancích s diagnostickým závěrem: urtika nejasného původu. Dále trpěl bolestmi v oblasti bederní páteře a pánve. Výsev kopřivkových morf byl doprovázen intermitentními febriliemi. V roce 1995 byl pro nález monoklonálního IgM odeslán na naše pracoviště s podezřením na Waldenströmovu makroglobulinemii. Na CT vyšetření pánve byly popsány osteosklerotické-osteolytické změny, které se na scintigramu zobrazily jako ložiska se zvýšenou akumulací radiofarmaka. Potíže u druhého pacienta, muže narozeného v roce 1963, začaly ve 44 letech, tedy přibližně ve stejném věku jako u prvního pacienta a jednalo se rovněž o kopřivku, která byla zcela asymptomatická, nesvědívá. Později se však přidaly prudké záchvaty zimni-

ce a třesavky s bolestmi kostí a kloubů, při kterých docházelo k výsevu nových kopřivkovitých morf. Nejprve byl pacient bez větších léčebných výsledků sledován na kožní klinice, poté byl však díky bystré diagnostické úvaze sledujícího internisty odeslán na naše pracoviště pro nález monoklonálního IgM s podezřením na mnohočetný myelom. Na CT vyšetření se zobrazila hyperostoza klavikul a pánevních kostí. U obou pacientů byla po vyloučení jiných diferenciatně diagnostických příčin stanovena diagnóza Schnitzlerova syndromu. Terapeuticky jsme využili několik preparátů (kortikoidy, 2-chlordeoxyadenosin, interferon alfa, cyklosporin, thalidomid, bortezomib) i metodu PUVA, avšak žádný režim nevedl onemocnění do kompletní remise a léčbu jsme vždy byli po určité době nuceni přerušit buď pro nedostatečný efekt léčby nebo pro její nežádoucí účinky. Jediný lék, který při velmi dobré toleranci minimalizoval příznaky Schnitzlerova syndromu u obou pacientů, byl anakinra (receptorový antagonist interleukinu 1). Za několik hodin od podání první dávky léku urtikariální vyrážka zcela vymizela, ostatní obtíže, jako bolesti kostí a teploty, odezněly v řádu dnů spolu s normalizací zánětlivých markerů v krevních odběrech. Léčba anakinrou je však trvalá s nutností každodenní podkožní aplikace injekcí.

HEMOSTÁZA

(72) 1822.

Léčba chronické hepatitidy C u pacientů s hemofilií. Vlastní zkušenosti.Hluší Antonín, Aiglová Květoslava, Krčová Věra
(HOK FN, Olomouc; II. interní klinika FN, Olomouc)

Úvod: Chronická hepatitida C (cHCV) a její komplikace představují závažný medicínský problém u pacientů s hemofilií, kteří byli v minulosti léčeni protivirově neošetřenými krevními deriváty. Významná část těchto pacientů vyžaduje léčbu cHCV. V současnosti představuje kombinovaná léčba interferonem (INF) a ribavirinem standardní přístup. Metodika: Z 30 pacientů s těžkou a středně těžkou hemofilií léčených na naší klinice v on demand nebo profylaktickém domácím režimu byla velká část v minulosti léčena nedostatečně ošetřenými virovými koagulačními deriváty či plazmou. Většina z těchto hemofiliků trpí chronickou hepatitidou C. V práci analyzujeme zkušenosti s léčbou cHCV, kterou podstoupilo 8 hemofiliků v letech 1999-2009. Terapie byla indikována u pacientů s PCR-HCV pozitivitou, verifikovanou progresí hepatálních funkcí (ALT, AST) a souhlasících s navrhovaným léčebným postupem. Primární infekce u všech probíhala asymptomaticky a mnoho let nebyla zřejmě rozpoznána. Ve třech případech šlo o 1a genotyp, u zbylých 5 nemocných se jednalo o genotyp 1b. Koinfekce s HBV nebo HIV se u léčených pacientů nevyskytla. Výsledky: Z celkem 10 hodnocených léčebných kúr byla u 4 dříve neléčených pacientů použita kombinace INF-alfa a ribavirin, u dalších 4 dříve neléčených a u dvou pacientů s re-



lapsem HCV byl ribavirin kombinován s pegylovanou formou INF-alfa (peg-INF). V první skupině léčených bylo u dvou pacientů dosaženo setrvalé virologické odpovědi (SVR), u dvou z nich došlo ale k relapsu HCV. Ze skupiny léčených peg-INF bylo u 3 pacientů dosaženo SVR, dva další dosáhli časné virologické odpovědi (EVR), ale došlo k relapsu, v jednom případě nebyla virologická odpověď pozorována, došlo pouze k poklesu viremie. U jednoho pacienta s dosaženou EVR bylo nutno léčbu pro těžkou krvácivou komplikaci přerušit. Následně během substituční terapie došlo k rozvoji vysokého titru inhibitoru proti FVIII. V tomto případě nelze vyloučit konsekvenci s imunomodulačním efektem léčby HCV a vznikem inhibitoru. Závěr: Léčba chronické HCV infekce s použitím kombinace INF a ribavirinu vykazuje obdobnou efektivitu jako u nehemo-filických pacientů. Naše zkušenost tento závěr potvrzuje. U našich nemocných byla uvedená léčba dobře tolerována, použití peg-INF se zdá být pro pacienty komfortnější a zlepšuje jejich životní kvalitu.

(73) 1667.

Stanovení generace trombinu u těhotných s fyziologickou graviditou

Lattová Veronika, Slavík Luděk, Úlehlová Jana, Procházková Jana, Pilka Radovan, Procházka Martin
(*Porodnicko-gynekologická klinika, FN, Olomouc; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc*)

Generace trombinu je klíčovým momentem krevního srážení. Na základě studií in vitro bylo zjištěno, že probíhá ve dvou fázích. Nejprve vzniká po aktivaci FX komplexem TF/FVIIa malé množství trombinu, takto vzniklý trombin potom potencuje koagulaci aktivací destiček, F V a F VIII. Komplex TF/FVIIa aktivuje rovněž F VIII a FIX. F VIIIa a F IXa se váže na povrch trombocytů, což dále aktivuje F X. Tento krok vede ke vzniku velkého množství trombinu, formaci fibrinu a nakonec tvorbě krevního koagula. Cíl práce: Analýza změn generace trombinu u zdravých těhotných. Metodika: Trombin generační test Žilní krev je odebrána do 3.6% citrátu sodného v poměru 9:1, centrifugována 20 minut při 2000g a uchovávána při -80°C do analýzy. Generace trombinu bude stanovována plně automaticky pomocí kitu (Technothrombin TGA, Technoclone, Vienna, Austria) a analyzátoru Ceveron Alpha (Technoclone, Vienna, Austria) s plně automatickým vyhodnocovacím softwarem. Při samotném stanovení je generace trombinu v plasmě iniciována 71.6 pM rekombinantního lidského tkáňového faktoru s 3.2 μM fosfolipidových micell (phosphatidylcholine [2.56 μM] a phosphatidylserine [0.64 μM]). Jako hlavní parametr bude vyhodnocováno maximum generace trombinu, současně však bude detekováno také celkové množství trombinu a doba do počátku tvorby trombinu. Softwarově zpracovaným výsledkem vyšetření z fluorescenčního readeru je křivka s hlavními parametry - Lag fáze, max. koncentrace trombinu (Cmax) a endogenní potenciál trombinu (ETP). Vyšetřeny byly rovněž standardní trombofilní markery. V sou-

boru 40 zdravých těhotných hodnotili uvedené parametry ve vztahu ke klinickým projevům a standardním trombofilním markerům. Referenční skupinou byl soubor zdravých dárců krve. Výsledky: U skupiny těhotných byly parametry Cmax, ETP a Lag fáze vyšší v porovnání s kontrolní skupinou. Signifikantní byly i rozdíly mezi jednotlivými trimestry. Závěr: TGT je novou nadějnou možností při laboratorním stanovení trombofilie, kde dosud užívané testy narážejí na své metodické možnosti. Limitací pro rutinní použití je nedostatečná standardizace a technická i ekonomická náročnost testu. Podpořeno grantem IGA NR 9282-3/2007 a NS10319-3/2009

(74) 1666.

Markery aktivace endotelu během fyziologické gravidity a těhotenství s rozvojem preeklampsie

Procházková Jana, Dhaifallah Ishraq, Šimetka Ondřej, Měchurová Alena, Pilka Radovan, Lubušský Marek, Slavík Luděk, Úlehlová Jana, Lattová Veronika, Procházka Martin
(*Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc; Ústav lékařské genetiky, FN, Olomouc; Porodnicko-gynekologická klinika, FN, Ostrava; ÚPMD, Praha*)

Cíl studie: Stanovit markery aktivace endotelu k odhalení endotelálního poškození během fyziologické gravidity a preeklampsie. Vyšetřili jsme 403 zdravých těhotných žen. Ženám byla odebrána krev na začátku gravidity a v období 24.- 28. týdne. U 39 žen se vyvinul lehčí až středně těžký stupeň preeklampsie, u 8 rodiček HELLP syndrom s různou tíží klinické manifestace. Výsledky: Hladina antigenu vWf stoupala během celého těhotenství (v I. trimestru průměrná hladina 152,32 %, ve II., resp. III. trimestru 173,34, resp. 216,20 %). Současně stoupala aktivita vWf v I. trimestru průměrná hladina 130,20 %, ve II., resp. III. trimestru 150,09, resp. 181,91 %). Hladina trombomodulinu významně stoupala během gravidity (v I. trimestru průměrná hladina 19,05 ng/ml, ve II. resp. III. trimestru 28,47 ng/ml, resp. 39,86 ng/ml). Hladina solubilní formy EPCR stoupala během gravidity (v I. trimestru průměrná hladina 201,76 ng/ml, ve II., resp. III. trimestru 274,68, resp. 324,07 ng/ml). Hladina PAI-1 stoupala během celého těhotenství (v I. trimestru průměrná hladina 36,14 ng/ml, ve II., resp. III. trimestru 50,07, resp. 60,12 ng/ml). Hladina t-PA se během gravidity významněji neměnila. Hladiny MMP-2, MMP-9, TIMP-2 ani endotelových mikroparticulí se neměnily významně v jednotlivých trimestrech. Prokázali jsme statisticky významný rozdíl v hladinách trombomodulinu při srovnání skupiny žen, u nichž se v průběhu těhotenství vyvinula preeklampsie, a to ve všech trimestrech (průměrné hladiny 23,41 v I. trimestru, 34,33 ve II. trimestru a 53,56 ng/ml ve III. trimestru) oproti hladinám trombomodulinu ve skupině zdravých těhotných (průměrné hladiny 19,05 v I. trimestru, 28,47 ve II. trimestru a 39,86 ng/ml ve III. trimestru). Dále jsme prokázali statisticky signifikantní rozdíl v hladinách inhibitoru aktivátoru plaz-

minogenu 1 při srovnání skupiny žen, u nichž se v průběhu těhotenství vyvinula preeklampsie, a to ve II. a III. trimestru, v I. trimestru jsme rozdíl hladin nepozorovali oproti hladinám inhibitoru aktivátoru plazminogenu 1 ve skupině zdravých těhotných. Naproti tomu jsme neprokázali statisticky významný rozdíl hodnot vWF, t-PA, EPCR, endotelových mikropartikulí, MMP 2 a 9 ani TIMP2 při porovnání jejich hladin v jednotlivých trimestrech u skupiny žen, u nichž se v průběhu těhotenství vyvinula preeklampsie a skupiny žen s fyziologicky probíhající graviditou. Podpořeno grantem IGA NR 9282-3/2007 a NS10319-3/2009

(75) 1660.

Vliv modifikovaného fibrinogenu na adhezi krevních destiček

Štikarová Jana, Suttnar Jiří, Májek Pavel, Reicheltová Zuzana, Riedel Tomáš, Dyr Jan E.

(*Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha; Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha*)

Fibrinogen je plasmatický glykoprotein o molekulové hmotnosti 340 kDa. Skládá se ze tří neidentických párů řetězců alfa, beta a gama spojených 29 disulfidovými můstky v dimer. Na N-konci řetězců alfa a beta se nacházejí fibrinopeptidy A a B. Ty jsou odštěpeny trombinem při přeměně fibrinogenu na fibrinmonomer, který následně polymeruje, čímž dochází k tvorbě fibrinové sítě. Fibrinogen je důležitý také v primární hemostáze, kde se aktivované krevní destičky váží přes povrchový receptor GPIIb-IIIa na fibrinogen. Oxidačním stresem rozumíme stav organismu, při kterém dochází k nekontrolované tvorbě volných radikálů. Ty mohou reagovat s biomolekulami a tím pozměnit jejich chemické a fyzikální vlastnosti. Důsledkem může být narušení jejich biologické funkce. V této práci byl sledován vliv oxidačně modifikovaného fibrinogenu na adhezi krevních destiček. Oxidační modifikace byly vyvolány působením tří různých činidel – malondialdehydu (MDA), chlornanu sodného (NaOCl) a 3-morpholinonydnoniminu (SIN-1). Tato modifikační činidla byla vybrána tak, aby simulovala možné reakce probíhající v organismu (MDA je jedním z produktů lipoperoxidace; NaOCl simuluje působení chlornanových aniontů uvolňovaných například při aktivaci buněk imunitního systému; rozkladem SIN-1 vzniká peroxynitrit schopný nitrovat okolní molekuly proteinů). Pro posouzení míry modifikace byla využita metoda stanovení karbonylových skupin a SDS-PAGE s následnou imunochemickou detekcí. Vliv vzniklých modifikací na interakci krevních destiček s modifikovaným fibrinogenem byl sledován během statických i dynamických podmínek. K dynamické adhezi byl použit přístroj „Cone and Plate“, který dokáže simulovat fyziologické podmínky průtoku krve. Bylo zjištěno, že krevní destičky v přítomnosti fibrinogenu modifikovaného NaOCl adherovaly při dynamické adhezi ochotněji než v přítomnosti kontrolního, na rozdíl od krevních destiček v přítomnosti fibrinogenu modifikovaného MDA. Zjištěná data ukazu-

jí na možnost modifikovaného fibrinogenu ovlivňovat adhezi krevních destiček. Tato práce vznikla za podpory grantů VZ ÚHKT MZ 00002373601 a AV ČR KAN200670701.

(76) 1644.

Biomimetické tenké fibrinové sítě jako skelet pro podporu endothelializace umělých cévních protéz

Riedel Tomáš, Brynda Eduard, Chlupáč Jaroslav, Filová Elena, Bačáková Lucie, Dyr E. Jan

(*Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha; Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd ČR, v.v.i., Praha; Fyziologický ústav, Akademie věd ČR, v.v.i., Praha*)

Pletené polymerní cévní protézy jsou běžně používány jako náhrada poškozených cév. Jejich použití je limitované, protože protézy s malým průsvitem vykazují vysokou míru selhání z důvodu formace trombů a perianastomické hyperplazii. Fibrinová síť, která se tvoří okamžitě po poranění cév z fibrinogenu, slouží později jako dočasný skelet pro růst buněk zúčastněných na hojení poraněné tkáně. V této studii byly využity mechanismy uplatňující se při koagulaci krve k řízení přípravě umělých fibrinových sítí na povrchu pevných položek. Tenké fibrinové sítě byly vytvářeny u povrchu katalytickým působením povrchově vázaného trombinu na okolní roztok fibrinogenu. Morfologie a tloušťka fibrinových sítí na povrchu mohla být měněna v nanometrové škále od 10 do 100 nm použitím specifických inhibitorů koagulace a změnou reakčních podmínek. Povrchy umělých pletených cévních protéz z polyetylénu tereftalátu impregnovaných kopolymerem poly(L-laktid-glykolidem) nebo terpolymerem poly(L-laktid-glykolid-kaprolaktonem) byly povléknuty tenkou fibrinovou sítí následně modifikovanou proteiny extracelulární matrix a osazeny vaskulárními endoteliálními buňkami. Povléknutí polymerních materiálů fibrinovými sítěmi výrazně podporovalo adhezi, růst vaskulárních endoteliálních buněk na jejich povrchu a v mnohých případech docházelo ke vzniku konfluentní vrstvy buněk. Tato vyvinutá metoda pokrývání povrchů tenkou fibrinovou sítí je vhodná k povzbuzení endothelializace umělých cévních protéz. Obecně umožňuje tato vyvinutá technologie povlékat vnitřní povrch porézních skeletů navržených pro tkáňové inženýrství fibrinovými sítěmi, přičemž se zachovává volný prostor k migraci buněk do pórů nebo k vaskularizaci skeletu. Klíčová slova: fibrin, fibrinopeptidy, nanostruktury, kultivace buněk, cévní protézy

(77) 1623.

Mutácia protrombínového génu 20210A v zdravej populácii a u trombofilných stavov.

Chudej Juraj, Hollý Pavol, Kotuličová Daniela, Hrnčár Matej, Staško Ján, Kubisz Peter

(*Klinika hematológie a transfuziológie MFN a JLFUK v MT, Martin, SK*)

V posledných 20 rokoch bolo odhalené celé množstvo príčin vedúcich k obrazu porúch hemostázy, označovaných

ako protrombotické, resp. trombofilné stavy. Mnohé z nich sú geneticky podmienené s typickým vznikom idiopatických trombóz v mladom veku s familiárnym výskytom, iné sú výsledkom aktivácie hemostázy v prítomnosti známeho protrombotického ochorenia. Mutácia protrombínu (FII G20210A) je vrodenný defekt, ktorý sa častejšie vyskytuje v skupine osôb s venóznou trombózou. Porucha sa zisťuje v 2 % belošskej populácie, u 6 % chorých s prvou venóznou trombózou a až u 18 % chorých v selektovaných súboroch s recidivujúcou a familiárnou formou trombotického venózneho postihnutia. Riziko trombózy je nezávislé od veku a pohlavia. FII 20210A zvyšuje trombotické riziko najmä v kombinácii s inými genetickými faktormi. Môže viesť k závažnej morbidite a svojimi následkami môže významne ovplyvniť kvalitu života postihnutého jedinca. Hlavným cieľom tejto práce bola identifikácia genetickej abnormality protrombínového génu 20210A v zdravej populácii a u pacientov s pozitívnou osobnou anamnézou na prítomnosť trombotického postihnutia. Vyšetrenie mutácie protrombínu 20210A je možné PCR analýzou (arteficiálnym namnožením špecifického úseku príslušného génu) chromozómovej DNA, ktorá sa izoluje z leukocytov, získaných z periférnej krvi pacienta. Štatistickou analýzou sme zistili pomerne významný výskyt mutácie FII 20210A, a to ako v populácii pacientov s pozitívnou osobnou anamnézou na výskyt trombózy, tak aj v kontrolnej skupine.

(78) 1673.

Splenektomie v terapii ITP

Konířová Eva, Trněný Marek, Ulrych Jan, Cieslar Petr, Karban Josef

(1. interní klinika - klinika hematologie 1. LF UK a VFN, Praha; 1. chirurgická klinika 1. LF UK a VFN, Praha)

Úvod: Slezina hraje v patogenezi ITP zásadní roli, je hlavním místem produkce protilátek a destrukce opsonizovaných destiček. Splenektomie byla donedávna metodou

volby ve 2. linii terapie, v současné době je se zavedením nových medikamentozních přístupů do terapie ITP odklon od tohoto trendu a snaha přesunout splenektomii do pozdějších linií léčby. Metodika: V naší práci jsme zpracovali retrospektivní analýzu pacientů s ITP léčených v letech 1995-2010 na I. IK VFN. Výsledky: Z celkového počtu 196 pacientů bylo v letech 1995-2010 indikováno ke splenektomii 33 pacientů. Poměr žen k mužům byl 79% / 21%, u dvou pacientů byla diagnóza Evansova syndromu. Medián věku v době splenektomie byl 51 let. Nejvíce splenektomií bylo indikováno ve 3. linii terapie (12 pacientů), indikace se objevovala od 2. do 6. linie léčby. Medián od diagnózy do splenektomie byl 18 měsíců. Prakticky shodný byl počet splenektomií provedených laparotomicky a laparoskopicky. Z 31 hodnocených pacientů (u dvou chybí follow up) byla odpověď u 29 pacientů (94%) z čehož kompletní remisi dosáhlo 26 pacientů (84%), 2 pacienti (6%) na splenektomii neodpověděli. K hodnocení odpovědi byla použita nová doporučení Rodeghiero F et al. Blood 2009. U pacientů, kteří dosáhli odpovědi, tato trvá u 21 (67,5%) pacientů s mediánem follow up 6.3 let, 8 pacientů (26,5%) zrelabovalo s mediánem do relapsu 15 týdnů. Perioperační mortalita byla 0, vyskytly se dvě závažnější perioperační komplikace, absces v jizvě s komplikovaným hojením a hematoma v lůžku po splenektomii s reaktivním pleurálním výpotkem, z dlouhodobých komplikací jsme u jedné pacientky zaznamenali závažnější recidivující infekční komplikace. U všech pacientů byla splenektomie zajištěna standardní profylaktickou imunizací. Závěr: Literárně udávaná úspěšnost splenektomie je 80% iniciálních odpovědí na léčbu z čehož u 2/3 přetrvává déle než 5-10 let. Tyto velmi dobré výsledky byly potvrzeny i na našem souboru pacientů. Hlavní výhodou splenektomie je dosažení vysokého procenta dlouhodobých remisí, nevýhodou riziko perioperačních a dlouhodobých zejména infekčních komplikací. Současným trendem je snaha odložit splenektomii minimálně o 6-12 měsíců a přesunout ji do pozdější linie terapie a vždy přísně zvážit její indikaci, má však stále své jasné místo v terapii ITP.

Pouze k publikaci

1724.

Infiltrace CNS u pacienta s chronickou lymfocytární leukémií. Popis případu

Brejcha Martin, Klodová Drahomíra, Wróbel Marek, Moricová Hana, Bogoczová Elen, Laváková Veronika
(*Hematologické oddělení, Onkologické centrum JGM, Nový Jičín*)

Úvod: Chronická lymfocytární leukémie (CLL) může být provázena řadou komplikací. Řadíme mezi ně zejména rekurentní infekce, projevy autoimunity, sekundární nádory a přechod do vyššího stupně malignity. Infiltrace centrálního nervového systému (CNS) patří mezi vzácné komplikace CLL. Popis případu: Pacient (muž, 1935) s CLL, Rai I s B příznaky, byl v 10/06 - 3/07 léčen 6 cykly fludarabinu s dosažením kompletní remise onemocnění. V 4/08 byl diagnostikován relaps, vzhledem k bezpříznakovému průběhu a nízkému klinickému stádiu byl pacient pouze observován. V 1/09 byl hospitalizován pro progredující vertigo, neschopnost chůze, zvracení, paresu n. VII, dysartrii, při trvajícím nízkém klinickém stádiu (Rai 0, leukocytóza $45,9 \times 10^9/l$). Pro podezření na cévní mozkovou příhodu provedeno CT mozku, které neprokázalo čerstvé ložiskové změny ani intrakraniální hemorhagii. Následně provedena lumbální punkce. Při cytologickém vyšetření likvoru byla nalezena lymfocytární celulóza, průtokovou cytometrií pak byla v likvoru prokázána přítomnost klonální populace CD5+/19+ lymfocytů. Léčba: Byla zahájena i.t. aplikace liposomálního cytarabinu (Depocyte®) v jednotlivé dávce 50 mg. Jako indukční terapie podány dvě dávky (1. a 3. týden), následně podány 4 dávky v rámci konsolidační terapie (5., 7. 9. a 13. týden). Již v průběhu léčby bylo patrné postupné zlepšení klinického stavu. Kontrolní cytologické a imunofenotypizační vyšetření likvoru po ukončení léčby bylo bez nálezu maligních buněk. Došlo k úplné úpravě neurologického nálezu, pacient byl schopen samostatné chůze, vymizela dysartrie i pareza n. VII. Krevní obraz byl stabilní až do 1/10, kdy došlo k progresi do stadia Rai III. Vzhledem k diagnostikované duplicitní malignitě (generalizovaný karcinom rectosigmatu) byl zvolen paliativní přístup s chlorambucilem. Při posledním klinickém vyšetření v 3/10 nebyly známky neurologického postižení. Závěr: Intratekální podání liposomálního cytarabinu u pacienta s infiltrační CNS vedlo k úpravě neurologického nálezu.

1798.

Successful chemotherapy Hodgkin's lymphoma during pregnancy complicated with fulminant clostridium difficile colitis

Matuska Milan, Ligova Alexandra, Mrazkova Pavla, Feltl David, Czerny Daniel, Simetka Ondrej, Gumulec Jaromir
(*Department of Hematology, Faculty Hospital, Ostrava; Oncology Clinic, Faculty Hospital, Ostrava; Radiology Department, Faculty Hospital, Ostrava; Obstetrics and Gynecology Clinic, Faculty Hospital, Ostrava*)

SUMMARY We report a case in which 32-year-old woman was diagnosed with HL at 20 weeks of gestation. MR scan showed enlarged right cervical node masses and mediastinum enlarging measuring 17x 9x 8cm. After the use of vinblastine sulfate and steroids was mediastinal mass in partial remission and she delivered a normal baby at 32 weeks of gestation by elective caesarean section. After premature delivery we started treatment with BEACOPP escalated. In the nadir phase, after seven courses of chemotherapy, she developed severe clostridium difficile colitis (CDAD) with intestinal obstruction but without diarrhoea. After stopping all systemic antibiotics the therapy was continued with oral application of metronidazole, vancomycin and probiotics. After completion of the therapy CDAD, no new course of chemotherapy was prescribed for her. CT of the patient showed a very small mass in the mediastinum and the patient had received mediastinal involved-field radiotherapy. About two months later a whole-body 18FDG-PET/CT scan was done and showed a complete disappearance of the tumors. Three years later the patient is in remission and the infant has been growing normally.

1838.

Deficience thiopurinmetyltrasferasy (TPMT) jako příčina neobvyklé myelotoxicity chemoterapie u dítěte s akutní lymfoblastickou leukémií

Suková Martina, Šrámková Lucie, Valík Dalibor, Froňková Eva, Zemanová Zuzana, Vodičková Elena, Starý Jan
(*Klinika dětské hematologie a onkologie, 2.LF UK a FN Motol, Praha; Oddělení laboratorní medicíny, Masarykův onkologický ústav, Brno; CLIP – laboratoř molekulární genetiky, 2.lékařská fakulta, UK, Praha; Centrum nádorové cytogenetiky, 1.lékařská fakulta, UK, Praha; Oddělení klinické hematologie, FN Motol, Praha*)

Thiopurinmetyltrasferasa (TPMT) je enzym katalyzující metylaci thiopurinů včetně 6-merkaptopurinu (6-MP) a 6-thioguaninu (6-TG). Aktivita TPMT vykazuje genetický polymorfismus, recesivně dědičný deficit se vyskytuje s incidencí 1/300. Léčba TPMT deficitních pacientů standardními dávkami thiopurinů vede k excesivní akumulaci nukleo-

tidů thioguaninu v hematopoetických tkáních, jehož důsledkem je potenciálně fatální hematologická toxicita a riziko sekundárních malignit. 6-MP a 6-TG jsou základní součásti všech chemoterapeutických režimů používaných v léčbě Akutní lymfoblastické leukemie u dětí. V recentním protokolu Interim AIEOP-BFM 2000 je 6-MP podáván ve fázi intenzifikace, konsolidace i v udržovací léčbě, 6-TG v reindukci, myelotoxicita patří k běžným vedlejším účinkům. Vyšetření genotypu TPMT není standardem a v ČR bylo dosud dostupné jen na experimentální bázi. Prezентujeme případ 13ti-letého chlapce s intermediární T-ALL (s aberantní expresí CD13 a 33, bez chromozomálních přestaveb), který během iniciační fáze chemoterapie vyvinul extrémní myelotoxicitu s život ohrožujícími komplikacemi. Hluboká pancytopenie vznikla v postindukční fázi léčby během podávání 6-merkaptopurinu (60 mg/m²/den) v kombinaci s ara-c 75 mg/m². 55 dnů trvající aplázie byla provázena torpidním subdurálním krvácením s nutností drenáže při rezistenci na trombocytární koncentráty, těžkou mukozitidou a závažnými infekcemi. Vyšetřením kostní dřeně byla opakovaně potvrzena aplastická krvetvorba s nevýznamnou dyplázií, bez vývoje klonální aberace. Těžká deficeience TPMT (výrazně snížená aktivita enzymu v erytrocytech) byla potvrzena jako důsledek kauzálních mutací ve všech sledovaných lokusech genu TPMT. (TPMT*2 – G238C, TPMT*3B – G460A a TPMT*3C – A719G). Chemoterapie dle protokolu Interim AIEOP 2000 byla pro myelotoxicitu předčasně ukončena po 60 dnech, opakované pokusy o podání 6-MP v max. 15% dávce nebo MD-MTX byly provázeny recidivami symptomatické aplázie. MRN monitorovaná ve dřeni dle přestaveb Ig/TCR genů s citlivostí 10-4 není detekovatelná od týdne 12 po dobu 4 měsíce trvající regenerace krvetvorby. Přesto, vzhledem k dosavadní dávkové intenzitě plánovaná modifikovaná reindukce s vyloučením thiopurinů. Příklad neobvyklé myelotoxicity chemoterapie obsahující 6-merkaptopurin potvrzuje význam preemptivního vyšetření TPMT u pacientů s ALL a ukazuje na korelaci fenotyp-genotyp nejen u homozygotních ale i u compound heterozygotních nosičů. S podporou VZ-FNM MZ 00064203

1761.

Neobvyklá koincidence kongenitální akutní myeloidní leukemie a Laddova syndromu

Pindurová Ester, Zápotocký Michal, Mejstříková Ester, Pýcha Karel, Kalousová Jana, Vodičková Elena, Zemanová Zuzana, Marschalek Rolf, Meyer Claus, Zuna Jan, Starý Jan (Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, Praha; Klinika dětské chirurgie 2. LF UK a FN Motol, Praha; Oddělení klinické hematologie FN Motol, Praha; Centrum nádorové cytogenetiky 1. LF UK a VFN Praha; Institute of Pharmaceutical Biology, ZAFES, Diagnostic Center of Acute Leukemias (DCAL), Frankfurt am Main-Germany)

Akutní leukemie jsou nejčastější malignitou dětského věku. Vrozená akutní leukemie manifestující se během

prvních čtyř týdnů života je extrémně vzácné onemocnění s velmi špatnou prognosou. Publikovaná data ukazují, že mezi kongenitálními leukemiemi je častější AML než ALL, nejčastější nenáhodnou cytogenetickou změnou je přestavba MLL genu (11q23), která se u této skupiny pacientů vyskytuje asi ve 30% případů. Prezентujeme neobvyklou kasuistiku dosud nepopsané koincidence kongenitální akutní myeloidní leukemie a chronického volvulu na podkladě Laddova syndromu. Donošené dítě z fyziologického těhotenství se narodilo sekcí pro kefalopelvicový nepoměr s následnou normální poporodní adaptací, přiměřené váhy, bez stigmatizace. Od 2. dne života léčena různými kombinacemi antibiotik pro teploty, kolísající hodnoty CRP a leukocytosu. Adnátní infekce ani žádný jiný patogen nebyl prokázán. Hematologovi bylo dítě referováno ve 4 týdnech života pro nález neustupující leukocytosu s dominující monocytosou, bez trombocytopenie, bez organomegalie či kožních změn. V somatickém nálezu byla nápadnější dystrofie kojence při nižším perorálním příjmu, který byl přisuzován střevní dysmikrobii při antibiotické léčbě. V diferenciatní rozvaze byla zvažována předně AML versus myeloproliferace typu JMML, event. i rozvíjející se imunodeficit či sekundarita při jiném onemocnění. Morfologický a imunoflowmetrický nález v periferní krvi ani v kostní dřeni nebyl zcela charakteristický. Cytogenetické vyšetření kostní dřeně s nálezem klonální přestavby MLL genu umožnilo uzavřít diagnosu jako AML. Doplněné molekulárně genetické vyšetření prokázalo fusní gen MLL/PICALM. Plánovanou léčbu chemoterapií podle protokolu AML - BFM 2004 nebylo možno zahájit. Do popředí se dostaly záživací obtíže charakteru opakovaných subileozních stavů s rozvojem obrazu mechanického ileu. Při operační revizi byl nalezen chronický ileus s malrotací střeva na podkladě Laddova syndromu. Pooperační průběh byl komplikovaný, s nutností reoperací, resekcí střeva a vyvedení stomií. Od druhého pooperačního týdne došlo k postupnému vzestupu leukocytosu s vyplavováním blastů do periferie a nárůstu organomegalie. Pacientka zemřela ve věku 3 měsíců pro progresi AML a chirurgicky neřešitelné komplikace Laddova syndromu. Kasuistikou ukazujeme na neobvyklou koincenci dvou vrozených velmi závažných onemocnění a na obtížnost diagnostiky AML při netypickém, spíše subakutním průběhu. Podporováno VZ FNM - MZ0FNM2005

1697.

Infiltrácia centrálného nervového systému u pacienta s mnohopočetným myelómom

Roziaková Ľubica, Štefániková Zdenka, Demečková Eva, Mistrík Martin (Klinika hematológie a transfuziológie LF UK, SZU a FNsP, Bratislava-SK)

Infiltrácia centrálného nervového systému (CNS) pri mnohopočetnom myelóme (MM) je veľmi zriedkavá komplikácia s výskytom asi u 1% pacientov. Prognóza

je velmi zlá s mediánom celkového prežívania 2 mesiace. Prezintujeme priebeh a liečbu CNS relapsu u pacienta s MM po autológnej transplantácii kmeňových krvotvorných buniek (TKKB). Kazuistika: 42 – ročný pacient s diagnózou MM IgA lambda, štádium IIIA absolvoval 4 cykly indukčnej chemoterapie v kombinácii vinkristín, idarubicín a dexametazon. Po dosiahnutí takmer kompletnej remisie ochorenia podaná mobilizačná chemoterapia cyklofosfamidom v dávke 2,5g/m² s následnou separáciou periférnych kmeňových krvotvorných buniek. Po prípravnom režime s vysokodávkovaným melfalanom 200mg/m² pacient úspešne autológne transplantovaný. Po 15 mesiacoch od autológnej TKKB zaznamenaný dreňový a extramedulárny relaps ochorenia, pre neurologickú symptomatológiu v zmysle cefaleje a slabosti končatín realizované cytologické vyšetrenie likvoru s nálezom atypických plazmatických buniek. Magnetickou rezonanciou prítomná difúzna infiltrácia meningov v.s. meningeálna myelomatóza a difúzna infiltrácia kalvy. Pacientovi podaná systémová chemoterapia v kombinácii bortezomib, dexametazon a melfalan s dosiahnutím parciálnej remisie ochorenia. Súčasne zahájená rádioterapia na oblasť manubrium sterni a chrbtice s intratekálnym podaním lipozomálneho cytarabínu s vymiznutím atypických plazmatických buniek po 4. intratekálnom podaní. Aj napriek kombinovanej terapii dochádza k postupnej progresii neurologickej symptomatológie a po 11 mesiacoch od diagnostiky CNS relapsu pacient exitoval. Záver: Infiltrácia CNS u pacientov s MM je veľmi vzácna komplikácia, ktorá sa môže objaviť aj v čase systémovej kompletnej remisie ochorenia. Vzhľadom k nízkemu počtu pacientov s touto komplikáciou nie je známa najefektívnejšia liečba, ukazuje sa však, že pacienti, ktorých terapeutický režim zahŕňal rádioterapiu na oblasť CNS, mali dlhšie celkové prežívanie ako pacienti bez rádioterapie.

1695.

Lymfomu podobný prúbeh histiocytózy z Langerhansových buniek v dospelosti: popis prípadu

Szturz Petr, Adam Zdeněk, Řehák Zdeněk, Koukalová Renata, Nebeský Tomáš, Neubauer Jiří, Moulis Mojmir, Mayer Jiří

(Interní hematologická klinika LF MU a FN, Brno; Oddělení nukleární medicíny, PET Centrum Masarykova onkologického Ústavu, Brno; Radiologická klinika Lékařské fakulty MU a FN, Brno; Ústav patologie Lékařské fakulty MU a FN, Brno)

Tato kazuistika popisuje neobvyklý případ agresivní formy histiocytózy z Langerhansových buněk (LCH) u jinak zdravého 35-letého muže, která zpočátku probíhala pod obrazem lymfomu s vyjádřenými B-symptomy (noční poty, febrilie, hubnutí) a generalizovanou periferní lymfadenopatií. Přítomen byl rovněž produktivní kašel a svědění ků-

že v oblasti konečníku. Diagnóza byla stanovena z biopsie lymfatické uzliny a kůže perianální oblasti. Typickým nálezem na HRCT bylo dále potvrzeno plicní postižení, jehož postupný vývoj z počátečního floridního stádia charakterizovaného diseminovanými nodularitami až po konečnou fázi s poklesem aktivity a rozvojem cystických formací se nám sérií několika HRCT a PET/CT skenů podařilo zdokumentovat. Po sběru periferních kmenových buněk byla u pacienta zahájena plánovaná léčba, která sestávala celkem ze tří cyklů monoterapie s kladribinem následované třemi cykly kombinované chemoterapie (kladribin + cyklofosfamid + methylprednisolon) a doplněné o kurativní radioterapii perianální oblasti. Tato léčba uvedla onemocnění do kompletní remise. Za dva měsíce se však znovu objevily původní B-příznaky, plicní symptomatologie, perianální pruritus a nově i bolesti kyčlí. Suspiovaný relaps LCH byl histologicky ověřen biopsií lymfatické uzliny a potvrzen na restagingovém PET/CT vyšetření, které rovněž ukázalo diseminaci onemocnění do kyčelních kostí. Jednalo se tedy o agresivní, časně relabující onemocnění indikované k podání 4 cyklů záchranného režimu CHOEP, které byly v březnu 2010 zakončeny autologní transplantací periferních kmenových buněk po přípravě vysokodávkovou chemoterapií HD BEAM. Generalizované postižení uzlin tedy nemusí být vždy jen maligní lymfom či metastatický rozsev tumoru, ale může se jednat i o LCH. Pokud jsou přítomny B-symptomy, znamená to velmi pravděpodobně agresivní průběh. Léčba kladribinem (2-chlordeoxyadenosinem), která se osvědčuje u klasických forem LCH, však nemusí mít v případě vysoce agresivní formy LCH stejný účinek jako u LCH s nízkou proliferativní aktivitou, což je v souladu s dosavadními zkušenostmi s léčbou indolentních a vysoce agresivních lymfomů. Hybridní PET/CT zobrazení prokázalo v naší studii vysokou citlivost při hodnocení aktivity onemocnění včetně jejího časného relapsu. V této práci představujeme novou metodiku popisu a hodnocení difúzně zvýšené metabolické aktivity plicního parenchymu pomocí PET/CT vyšetření a využití této metodiky v rámci sledování léčebné odpovědi.

1816.

e6a2 BCR-ABL fúzní transkript u pacienta s bazofilii a se zvýšenou aktivací Src kinázy závislé na Bcr-Abl
Divoká Martina, Rohoň Peter, Calábková Lenka, Mojžíková Renáta, Novosadová Alena, Faber Edgar, Jarošová Marie, Holzerová Milena, Divoký Vladimír, Indrák Karel
(Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc; Ústav biologie LF UP, Olomouc)

Úvod. Vzácna transkripční varianta BCR-ABL e6a2 se zlomovým místem v intronu 6 BCR genu byla detekována pouze v několika případech chronické myeloidní leukemie (CML). Metody. Pomocí RT-PCR a sekvenční analýzy jsme detekovali BCR-ABL transkript a mutační status. In vitro testy senzitivity na tyrozin-kinázové inhibitory byly založeny na detekci inhibice fosforylace Crkl (P-Crkl) a Src kináz (P-SFK, Tyr416)

pomocí imunoblotu. Laboratorní výsledky. 51-letý pacient s výraznou splenomegalií a s Hb 73 g/L, WBC $150.3 \times 10^9/L$ (neutrofilů 18 %; lymfocyty 2 %; eozinofily 18 %; bazofily 45 %; metamyelocyty 4 %; myelocyty 5 %; promyelocyty 6 %; blasty 2 %) a s PLT $36 \times 10^9/L$. Těžká anemie a trombopenie byly klinicky bezpříznakové. Cytogenetická analýza prokázala 90 % Ph+ buněk v kostní dřeni (iFISH 278/308 BCR-ABL+ jader) bez přídatných chromozomových změn. Laboratorní výsledky potvrdily dg. CML v akcelерованé fázi. Riziko podle Sokala: střední. Sekvenační analýza PCR produktu potvrdila vzácnou transkripční variantu BCR-ABL (e6a2) bez přítomnosti mutace v BCR-ABL kinázové doméně. Western blot imunoanalýza ukázala u pacienta zvýšenou hladinu P-Crkl i P-SFK. In vitro test senzitivity leukemických buněk pacienta k imatinibu prokázal citlivost Bcr-Abl tyrozinové kinázy k imatinibu (zřejmě z P-Crkl monitorování) a eliminaci P-SFK naznačující, že aktivace SFK u tohoto nemocného je Bcr-Abl–dependentní. Výsledky léčby. K úvodní cytoredukci byla použita hydroxyurea. Dávka imatinibu byla nastavena na 400 mg denně, vzhledem k těžké neutropenii byla zahájena stimulace růstovými faktory (G-CSF). Následně byla redukována dávka imatinibu na 400 mg / 5 dnů v týdnu. Po 3 týdnech užívání imatinibu došlo ke zlepšení krevního obrazu (Hb 96 g/L, WBC $9.8 \times 10^9/L$ (eozinofily 1 %; bazofily 14 %), PLT $425 \times 10^9/L$) a ústupu splenomegalie. Vzhledem k akceleraci choroby v době dg. bylo zahájeno vyhledávání dárce kmenových krvetvorných buněk. Závěr. Představujeme kazuistiku pacienta s CML v akcelерованé fázi s e6a2 transkripční variantou, s výraznou splenomegalií, bazofilií, těžkou trombopenií a anemií, zvýšenou aktivací SFK závislou na Bcr-Abl a dobrou odpovědí na imatinib. Další sledování pacienta může přinést nový pohled na léčbu a prognózu pacientů se vzácným transkriptem e6a2 BCR-ABL kódující Bcr-Abl kinázu se zvýšeným onkogenním potenciálem. Podpořeno granty IGA MZ NS 9949-3, MSM 6198959205, LF_2010_004 a LF_2010_013.

1837.

Trombocytopenie s renálním selháním

Sulovská Lucie, Pospíšilová Dagmar (*Dětská klinika, Fakultní nemocnice, Olomouc*)

Úvod: Trombotická trombocytopenická purpura (TTP, sy Moschowitze) je vzácné onemocnění se závažným, často až život ohrožujícím průběhem. V důsledku snížené aktivity metaloproteázy ADAMTS13, která z cirkulace odstraňuje hyperpolymerizovaný von Willebrandův faktor, dochází k tvorbě trombů v mikrocirkulaci. Rozvíjí se mikroangiopatická hemolýza, konzumpční trombocytopenie a orgánová hypoperfúze. Postižen může být jakýkoliv orgánový systém, z čehož vyplývá i heterogenita příznaků. Diagnostická kritéria zahrnují: trombocytopenii, schistocyty v peri-

ferní krvi, renální postižení a neurologické symptomy. Popis případu: Osmnáctiletá dívka byla přijata pro recidivu trombocytopenie s hodnotou trombocytů $8 \times 10^9/l$. V minulosti byla již 2x hospitalizovaná pro ataku těžké trombocytopenie s odpovědí na léčbu vysokými dávkami imunoglobulinů a kortikoidů. Remise vždy trvala půl roku. Nyní během několika dnů při stejné léčbě došlo k výraznému poklesu hemoglobinu o 40 g/l. V nátěru periferní krve se objevily schistocyty a laboratorní vyšetření prokázala intravaskulární hemolýzu a renální insuficienci. Byla indikována výměnná plazmaferéza a léčba methylprednisolonem. Při vyšetření aktivity metaloproteázy ADAMTS 13 byla zjištěna hladina pod 1% a vysoký titr autoprotilátek (71%). Vzhledem k přetrvávající zvýšené hladině laktátdehydrogenázy a přítomnosti schistocytů byly do léčby zařazeny 4 aplikace vinkristinu a později 4 dávky rituximabu. Léčba byla komplikovaná opakovanými těžkými alergickými reakcemi na plazmu a na rituximab. Po třech měsících se podařilo dosáhnout remise onemocnění s vymizením autoprotilátek proti ADAMTS 13. Nadále přetrvává těžká porucha tubulární funkce ledvin. Závěr: Trombotická trombocytopenická purpura je onemocnění se závažným průběhem a prognóza pacientů zůstává nadále nejistá. U každé trombocytopenie provázené mírnou anémií je nutno uvažovat v diferenciální diagnostice o možnosti TTP i v pediatrii. Zavedení výměnných plazmaferéz do léčby významně zvýšilo přežití pacientů. Riziko relapsu je podle nejnovějších studií vyšší, pokud iniciální hladina ADAMTS 13 je snížena pod 10 procent. Dle zkušeností ze zahraničí použití rituximabu u dětí zvyšuje procento dosažených remisí a zdá se být slibnou perspektivou v léčbě tohoto onemocnění.

1780.

Vzácná příčina trombocytopenie v dětském věku

Votava Tomáš, Doležalová Lenka, Černá Zdeňka, Geierová Věra, Karas Michal

(*Oddělení dětské hematologie, Dětská klinika FN a LF UK, Plzeň; ÚHKT, Praha; Hematologicko-onkologické oddělení FN a LF UK, Plzeň*)

May-Hegglinova anomálie (MHA) je onemocnění s autosomálně dominantní dědičností, které je charakterizováno různě závažnou trombocytopenií, makrotrombocyty a přítomností velkých bazofilních inkluzí v granulocytech. MHA patří do skupiny familiárních makrotrombocytopenií s mutací v MYH9 genu pro nesvalový myosin. K zařazení do jednotlivých podskupin onemocnění je vhodné vyšetřit sluch, zrak a renální funkce, které bývají u dalších syndromů této skupiny defektní. Klinicky se MHA projevuje mírně zvýšenou tendencí ke krvácení (epistaxe, slizniční krvácení, hematomy apod.) v závislosti na závažnosti trombocytopenie. Diagnóza je postavena na anamnestických údajích, vyšetření krevního obrazu (včetně objemu trombocytů) a mikroskopickém vyšetření nátěru periferní krve, kde jsou patrné bazofilní cytoplasmatické inkluze v leukocytech, dále je možné doplnit imunocytochemické a molekulárně-genetické vyšetření. Pacienti mívají lehčí

stupeň trombocytopenie s normální funkcí trombocytů a z toho vyplývající nízkou tendencí k závažným krvácením, léčba většinou není nutná. Profylakticky lze použít antifibrinolytika. V ojedinělých případech lze podat trombocytární náplav event. desmopessin a u závažných krvácení lze zvážit i podání rekombinantního aktivovaného faktoru VIIa. Prognóza pacientů je dobrá. Stručná kazuistika: Přijali jsme 17-letého chlapce s několik let trvající lehkou trombocytopenií bez klinických známek krvácení. Zároveň z anamnézy vyplynulo, že matka i sestra probanda byly opakovaně vyšetřeny pro trombocytopenii (všichni vedeni pod diagnózou chronická ITP). V krevním obraze chlapce byla zachycena izolovaná trombocytopenie $56 \times 10^9/l$ s objemem trombocytů 14,2 fl. V kostní dřeni byl nález bazofilních inkluzí v granulocytech. Diagnózu jsme uzavřeli jako May-Hegglinova anomálie, molekulárně genetické vyšetření zatím nebylo provedeno.

1753.

Úspěšná léčba získané hemofilie A u pacienta se systémovým onemocněním pojiva

Palová Miroslava, Hluší Antonín

(Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc)

Úvod: Získaná hemofilie A je vzácné krvácivé onemocnění způsobené přítomností inhibitoru proti faktoru VIII. Roční incidence se pohybuje mezi 1-4 případy na 1 milion obyvatel. U 80% pacientů je provázána významnými krvácivými projevy s téměř 20% mortalitou. U 40-50% případů je prokázána sekundární příčina, kterou představuje v řadě případů autoimunitní onemocnění. Metodika: Předmětem sdělení je případ 64letého muže s anamnézou ANCA asociované vaskulitidy, který byl vyšetřován pro anémii, masivní hematomy na trupu a končetinách, hemarthros levého kolene. Laboratorní screening prokázal prodloužení a PTT (84,4s), podrobnějším vyšetřením byla zjištěna snížená hladina FVIII pod 1% a přítomnost inhibitoru FVIII (33,5 BU). Recidivující masivní kožní krvácivé projevy byly úspěšně léčeny rFVIIa v dávce 90-120 ug/kg. Bypassová léčba byla monitorována pomocí TGT (trombin generační test). V rámci eradikační terapie inhibitoru byla použita kombinace imunosupresiv zahrnující prednison (1mg/kg), HD-IVIG (2g/kg) a opakované pulsní dávky cyclophosphamidu ($750\text{mg}/\text{m}^2$ i.v. á 3 týdny). Při uvedené terapii došlo k rychlému snížení titru inhibitoru na 2 BU, vzestupu hladiny FVIII, k regresi krvácivých projevů. Šest týdnů po zahájení imunosupresivní terapie bylo dosaženo kompletní eradikace inhibitoru. Dalším efektem léčby bylo výrazné snížení symptomů spojených s vaskulitidou. Závěr: Naše zkušenost potvrzuje dobrou účinnost a bezpečnost rFVIIa v léčbě závažného krvácení při získané hemofilii A a užitečnost monitorace této bypassové léčby pomocí trombin generačního testu. Použitá kombinovaná imunosupresivní terapie s podáním vysokých dávek cyclophosphamidu prokázala dobrou efektivitu, pacientem byla dobře tolerována.

1638.

Monitorace funkcí krevních destiček u pacienta se subakutní trombózou koronárního stentu, rezistencí na clopidogrel a semiresponzivitou na ASA - kazuistika

Bultasová Lenka, Korelusová Ivana, Šlechtová Jitka

(Ústav klinické biochemie a hematologie FN, Plzeň)

Úvod: Subakutní trombóza stentu po perkutánní koronární intervenci je poměrně vzácnou komplikací, avšak se závažnými až život ohrožujícími důsledky pro pacienta. Standardizované podávání duální protideštičkové terapie minimalizuje výskyt této závažné komplikace, nicméně u části pacientů nevede její podání k dostatečnému potlačení destičkových funkcí. Metodika: 79letý pacient (kardiak, hypertonik a diabetik II. typu) po rozsáhlém infarktu přední stěny levé komory srdeční, se subakutní trombózou v DES (lékem potaženém) stentu 5 dnů po jeho implantaci do stenózy ramus interventricularis anterior. U tohoto pacienta byla sledována funkce krevních destiček při postupném nastavování účinné protideštičkové léčby (změna medikace, úprava dávkování). Vyšetření funkce trombocytů bylo prováděno paralelně z plazmy bohaté na destičky ($250 \times 10^9/l$) na optickém agregometru APACT 4 a z plné krve na impedančním agregometru Multiplate. K vyšetření byly použity tyto induktory agregace: kyselina arachidonová (Arachidonic Acid – APACT 4, ASPItest - Multiplate) a ADP (ADP Reagent – APACT 4, ADPtest HS – Multiplate). Výsledky: Navýšení standardní dávky ASA (kyselina acetylosalicylová) ze 100 mg na 200 mg denně vedlo k potlačení destičkových funkcí po stimulaci kyselinou arachidonovou na obou agregometrech. Postupné navyšování dávek clopidogrelu až na 300 mg nevedlo shodně na obou přístrojích k adekvátnímu poklesu agregace destiček po stimulaci ADP. Efektivní se ukázala terapie ticlopidinem, která minimalizovala destičkovou funkce po stimulaci ADP, opět shodně výsledky na obou agregometrech. Závěr: Obě použité metody sledování funkce destiček jsou srovnatelné. Pacient byl vyhodnocen jako semiresponder na ASA (postačilo navýšení dávek) a nonresponder na clopidogrel (bez efektu maximálních dávek a s nutností převedení nemocného na léčbu ticlopidinem).

1626.

Lymfoproliferace s atypickou expresí CD znaků - kazuistika z našeho pracoviště

Pikalová Zuzana, Novák Martin, Turcsányi Peter, Indrák Karel (Hemato onkologická klinika, FN, Olomouc)

Průtoková cytometrie je rychlou a efektivní metodou stanovení subtypu lymfoproliferativních onemocnění. Jednotlivé nozologické jednotky jsou charakterizovány vzorci exprese antigenů, které odpovídají změněnému genotypu maligní buňky. Vzorce exprese jsou ve většině případů specifické a umožňují vytvoření klasifikačních kritérií. V naší laboratoři se však setkáváme i s aberantními

imunofenotypy, které se tomuto pravidlu vymykají. Tyto aberace mohou ovlivňovat terapii daného onemocnění a mít vztah k prognóze pacienta. V našem sdělení prezentujeme několik případů aberantních imunofenotypů: CD8+ B-CLL, CD5+ HCL a doposud neuzavřenou CD5+lymfoproliferaci. Dedikace: Výzkum byl podpořen grantem MSM6198959205

1675.

Separace plazmatických buněk z transportovaných vzorků kostní dřeně

Burešová Ivana, Kyjovská Drahomíra, Štossová Jana, Kovářová Lucie, Moravcová Jana, Štouračová Marcela, Čumová Jana, Hájek Roman
(Univerzitní výzkumné centrum – Česká myelomová skupina, Babákův výzkumný institut, LF MU, Brno; Oddělení klinické hematologie, FN, Brno; Interní hemato-onkologická klinika, FN a LF MU Brno)

Úvod: Vedení snahou získat větší množství plazmatických buněk (PB) pro výzkum v oblasti mnohočetného myelomu (MM) jsme v loňském roce zahájili svoz nativních vzorků kostní dřeně (KD) z 8 center v ČR a v zahraničí (SR, Polsko). Materiál a metody: Vzorky byly před i po dobu transportu uchovávány při teplotě do 8°C a zpracovány s prodlevou 3 – 30 hodin našimi standardními postupy. V prvním kroku byla izolována mononukleární frakce metodou gradientové centrifugace, dále byla provedena buď magnetická separace nebo třídění na buněčném sorteru, event. kombinace obou. Byla vyhodnocena čistota separovaných buněk (% CD138+ buněk stanovených průtokovou cytometrií) a výtěžek (podíl skutečného a teoretického výtěžku, vyjádřený v %) pro jednotlivé typy separace. Bylo provedeno srovnání se vzorky KD odebíranými na IHOK FN Brno a zpracovanými bezprostředně po odběru. Výsledky: Ze 194 vzorků KD bylo přímo po izolaci mononukleární frakce pro nízkou celkovou buněčnost a/nebo nízké zastoupení PB zamraženo bez separace 51 vzorků (26,3 %). 37 (25,9%) vzorků doručených v den odběru (prodleva 3 – 6 hodin) mělo zastoupení PB \geq 5% a separace byla provedena na magnetickém separátoru. Medián čistoty separovaných PB byl 92% (42,2 – 99,0%) a medián výtěžku 38,9% (15,3 – 89,3%). 10⁶ (74,1%) vzorků doručených v den odběru mělo zastoupení PB < 5% nebo bylo doručeno s odstupem vyšším než 24 hodin. 83 z nich (58%) bylo separováno na buněčném sorteru s mediánem čistoty 97,5% (19,3 – 99,7%) a mediánem výtěžku 43,9% (19,4 – 59%). 23 vzorků mělo buněčnost vyšší než 30x10⁶ a bylo separováno kombinovaně oběma technikami. Tato skupina vzorků měla medián čistoty 98,7% (94,9 – 99,8%) a výtěžek 28,1% (2,3 – 85,2%). Ve srovnatelném období bylo při magnetické separaci vzorků KD z IHOK FN Brno dosaženo mediánu čistoty 89,3% (7,0 – 98,6%) a výtěžku 30,5% (2,3 – 97,7%) a při třídění buněk na buněčném sorteru mediánu čistoty 97,4% (77,8 – 99,9%) a mediánu výtěžku 35,5% (17,5 – 53,6%). Závěr: Během přípravy projektu transportu vzorků se jako největší rizikový faktor projevil pokles ex-

prese klíčového znaku CD138, v reálné praxi je ale v daném časovém rozmezí jen mírný a nekoliduje s kvalitou separace. Ta je srovnatelná s netransportovanými odběry realizovanými ve stejném období. Zvažovaná (nákladná a ne zcela spolehlivá) stabilizace transportovaného materiálu se ukázala jako zbytečná a transport nativní KD jako vyhovující. Práce byla podpořena granty: MŠMT LC06027, MSM0021622434, IGA NS10406.

1681.

Využití nested real-time PCR pro monitorování průběhu mykotické infekce u zvířecího modelu invazivní aspergilózy

Lengerová Martina, Kocmanová Iva, Hrnčířová Kristýna, Ráčil Zdeněk, Mayer Jiří, Najvar Laura K., Kirkpatrick William R., Wiederhold Nathan P., Patterson Thomas F.
(Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematoonkologická klinika LF MU a FN, Brno; Oddělení klinické mikrobiologie, FN, Brno; Interní hematoonkologická klinika LF MU a FN, Brno; The University of Texas, Health Science Center at San Antonio a South Texas Veteran's Health Care System, San Antonio, Texas-USA)

Úvod: Úloha real-time PCR metod v diagnostice invazivní aspergilózy (IA) je stále nejasná, doposud byl publikován pouze omezený počet dat týkajících se fungální nálože ve vzorcích získaných během probíhající infekce. V této práci byla pro kvantifikaci fungální nálože ve vzorcích plně krve, séra, bronchoalveolární laváže (BAL) a plicní tkáně z inhalačního modelu invazivní aspergilózy použita kvantitativní nested real-time PCR cílená do úseku ITS2 ribozomální DNA. Metody: Imunosuprimovaná morčata byla infikována v aerosolové komoře konidii Aspergillus fumigatus. Skupina 5 zvířat byla humánně usmrcena ihned po infekci (den 0) a další 3, 5, 7 a 11 dní po infekci. Aspergilová DNA v získaných vzorcích byla kvantifikována pomocí nested real-time PCR. Metoda využívá v prvním kole preamplifikaci houbové DNA ve vzorku pomocí panfungálních primerů, ve druhém kole jsou pak použity primery a Taqman MGB sonda specifické pro A. fumigatus. Výsledky PCR vzorků BAL a séra byly korelovány se sérologickými výsledky (galaktomanan (GM) a (1,3)-beta-D-glukan (BG)). Výsledky: Vysoká nálož DNA A. fumigatus byla u infikovaných zvířat detekována ve vzorcích tkáně a BAL. V plně krvi a séru byla nálož výrazně nižší. U některých vzorků plně krve a séra však byly výsledky PCR, GM i BG negativní, přestože se jednalo o pokročilou fázi infekce. GM a BG byly výrazně pozitivní ve vzorcích BAL a některých sér po dnech 3 a 7 po infekci. Závěr: Kvantitativní nested real-time PCR umožnila v rámci tohoto experimentálního modelu časnou detekci IA, přičemž výsledky PCR korelovaly s výsledky sérologických metod (GM, BG). Panfungální preamplifikace DNA ve vzorku zvýšila míru pozitivitu vzorku, avšak neovlivnila senzitivitu reakce. Nejlepší výsledky byly získány u vzorků BAL a tkání, které vykazovaly výraznou pozitivitu už

v časných stádiích infekce. Naopak některé vzorky plné krve a séra zůstaly negativní na všechny markery i v pokročilých stádiích infekce. Tyto inter-individuální rozdíly mohou být podobné i u imunokompromitovaných pacientů a mohou tak komplikovat časnou diagnostiku IA. Tato práce byla podpořena granty Ministerstva zdravotnictví České Republiky č. NS10442-3/2009 a NS10441-3/2009 a grantem NIH/NIAID č. N01-AI-30041.

1779.

Příprava mezenchymálních kmenových buněk podle pravidel správné laboratorní praxe pro aplikaci v léčbě nemoci štěpu proti hostiteli a autoimunitních chorob

Foltánková Veronika, Matějková Eva, Smejkalová Jana, Michálek Jaroslav
(UCBI, Babákův výzkumný institut, LF MU, Brno)

Mezenchymální kmenové buňky (MSC) jsou nehematopoetické multipotentní buňky vyskytující se v kostní dřeni. Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii (ISCT) (Dominici et al. *Cytotherapy* 2006) vydala minimální kritéria pro definici lidských MSC: musí být adherentní k plastru, nést imunofenotyp CD105+, CD73+, CD90+, CD45-, CD34-, CD14-, HLA-DR-, a mít schopnost diferencovat nejméně do tří buněčných linií: osteoblasty, adipocyty a chondrocyty. MSC mají schopnost podporovat angiogenezi a podílet se tak na reparaci poškozených a ischemických tkání, velké uplatnění mají také jejich imunomodulační a protizánětlivé vlastnosti. Cílem naší práce bylo zavést optimalizovaný protokol pro přípravu MSC v podmínkách správné výrobní praxe tak, aby splňovaly kritéria bezpečnosti a kvality a mezinárodně akceptovaná kritéria ISCT. Validovaný výrobní postup pak poslouží k přípravě klinicky aplikovatelných MSC uplatnitelných při léčbě nemoci štěpu proti hostiteli a autoimunitních chorob. V našich podmínkách se jeví jako optimální metoda izolace MSC pomocí gradientové centrifugace s nízkohustotním Ficoll Paque. Klíčovým bodem bylo optimalizovat podmínky kultivace bez přítomnosti živočišných sér a tak, aby byla zachována fenotypová i genotypová stabilita MSC i po opakovaných pasážích. Nejvyššího expanzního potenciálu bylo dosaženo v kultivačním médiu DMEM suplementovaného destičkovým lyzátem. Vyšší počet pasáží negativně ovlivňuje kvalitu MSC, proto jsou pro je doporučeno provádět kultivace maximálně do čtvrté pasáže. Dále je třeba dbát na aseptičnost podmínek přípravy a jejich validaci. Kontroly jakosti produktu včetně kontroly sterility a vizuální kontroly morfologie a konfluency jsou prováděny během expanze buněk; absolutní počet buněk a viabilita jsou hodnoceny při každé pasáži. Výstupní kritéria jsou stanovena s ohledem na účinnost a bezpečnost léčivého přípravku: počet buněk v závislosti na indikaci (10-50 x 10⁶ MSC pro lokální a 1-5 x 10⁶ / kg pro intravenózní podání), ≥ 80% viabilita a imunofenotyp splňující kritéria ISCT a vylučující přítomnost příměsí buněk. MSC v kostní dřeni představují poměrně nízký podíl jaderných

buněk (0.001 0,01%), avšak je možné je expandovat in vitro tak, aby bylo dosaženo dostatečného počtu buněk pro lokální i systémovou terapii. Budou prezentovány aktuální výsledky z validace výrobního procesu. Tato práce byla podpořena granty NPVII 2B08058 a Nadačním fondem Jistota Komerční banky.

1727.

Expanze T lymfocytů pro adoptivní transfer z mononukleárních buněk periferní krve za využití přístroje WAVE Bioreactor

Vidláková Petra, Kordačová Lucie, Cibulka Marek, Smejkalová Jana, Michálek Jaroslav
(MU, LF, Babákův výzkumný ústav, Brno)

Mononukleární buňky periferní krve (PBMC) získané z buffy coatu po centrifugaci periferní krve představují ideální zdroj T lymfocytů, které mohou být využity pro potřeby buněčné imunoterapie. U onkologicky nemocných pacientů obsahují malou frakci nádorově-specifických lymfocytů, které cíleně rozpoznávají nádorové antigeny. T lymfocyty představují 50-80% leukocytů v buffy coatu a mohou být dále aktivovány a expandovány in vitro tak, aby byl znásoben jejich protinádorový potenciál. K aktivaci jsou používány anti-CD3/CD28 potažené mikrokuličky, k růstu T lymfocytů dochází v prostředí bohatém na interleukin IL-2. In vivo podání aktivovaných expandovaných lymfocytů je jednou z možností imunoterapie v léčbě maligního melanomu. WAVE bioreaktor™ je zařízení pro kultivaci buněk. Využívá přitom vaku nepropustného pro plyny. Místo toho je pohyb kyslíku a míchání dosaženo novými postupem - vlnou-vyvolanou agitací. Vlnění je dosaženo speciálním mechanismem v bioreaktoru. Vlna bioreaktoru generuje volný prostor bublinek prostého kyslíku. Vlnění také mísí tekutiny v bioreaktoru a resuspenduje buňky a částice. Vlna vyvolaná agitací nevyžaduje invazivní mechanickou míchačku nebo pohánění plynem. Vše umožňuje konstrukce bioreaktoru. Na našem pracovišti jsme zahájili používání přístroje WAVE Bioreaktor v lednu 2010 za účelem Expanze T lymfocytů pro adoptivní transfer z mononukleárních buněk periferní krve pro následnou přípravu protinádorové vakcíny pro pacienty s pokročilým melanomem (klinické stádium IIIb, IIIc, IV). Výroba T lymfocytů probíhá za podmínek správné výrobní praxe v laboratořích Univerzitého centra buněčné imunoterapie Masarykovy univerzity v Brně. Během 14-ti denní kultivace na WAVE Bioreaktoru dojde k expanzi požadovaného množství lymfocytů (expanze 50x-100x - na minimálně 3x10¹⁰ T lymfocytů). T lymfocyty budou testovány na kvalitu a sterilitu a zamrazeny v tekutém dusíku (-196°C) a podány pacientovi ve dvou infúzích. Výroba bude probíhat ve čtyřech krocích: • Izolace PBMCs z buffy coatu • Expanze s Dynabeads magnetických nosičů s využitím přístroje WAVE Bioreaktor 2/10 EH • Separace magnetických nosičů na přístroji DYNAL ClinEx Vivo MPC • Zamražení Tato práce byla podpořena projektem MŠMT NPVII 2B06058

1620.

Vyhledávání biomarkerů akutního infarktu myokardu pomocí proteomických metod

Reicheltovej Zuzana, Májek Pavel, Suttar Jiří, Malý Martin, Oravec Milan, Štikarová Jana, Dyr Jan E.

(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; FN Motol, Praha)

Moderní proteomické metody mohou sloužit pro vyhledávání biomarkerů různých onemocnění. Tyto znalosti mohou být využity pro přesnější diagnostiku, prognózu onemocnění a vhodný způsob léčby. Pro základní proteomickou studii u souboru vzorků pacientů s akutním infarktem myokardu byly použity elektroforetické metody s identifikací proteinů hmotnostní spektrometrií. Cílem této práce bylo prokázat vhodnost takového postupu pro vyhledávání biomarkerů v plasmě pacientů s akutním infarktem myokardu. Pro separaci proteinů pomocí 2D SDS-PAGE byly použity vzorky depletované plasmy pacientů. V prvním směru byly proteiny rozděleny isoelektrickou fokusací v rozmezí pI 3-10, ve druhém směru pak pomocí gradientové (5-15%) SDS-PAGE. Gely byly barveny koloidní Coomassie Blue a po digitalizaci vyhodnoceny statistickým programem Progenesis SameSpots. Spoty, které se významně lišily ($p < 0,05$ a minimální násobný rozdíl alespoň 1,5) mezi skupinou pacientů a zdravých dárců byly vyříznuty z gelu a podrobeny identifikaci proteinů pomocí nanoLC-MS/MS. Pro porovnání skupiny pacientů s akutním infarktem myokardu a zdravých dárců bylo připraveno 46 2D SDS-PAGE gelů, celkem tedy pro každou skupinu 23 gelů. Ze skupiny AIM byl jeden gel pro svou nehomogenitu ze souboru vyřazen. Bylo nalezeno 13 spotů, jejichž normalizované objemy se mezi oběma skupinami významně lišily. Proteiny z jedenácti spotů se podařilo úspěšně identifikovat pomocí nanoLC-MS/MS, mezi nimi například beta a gama řetězce fibrinogenu, gelsolin, apolipoprotein A-1 nebo serum amyloid A protein. Ověřili jsme, že použité proteomické metody jsou vhodné pro vyhledávání biomarkerů v plasmě pacientů s akutním infarktem myokardu. Některé nalezené proteiny jsou v souladu s dosud publikovými daty, další se jeví jako potenciálně nové markery. Získaná data budou dále testována na rozsáhlejší souboru pacientů, který je v současnosti shromažďován. Poděkování: Tato práce byla podpořena granty AVČR KAN200670701, VZ ÚHK MZ 02373601 a MZ NS10633-3/2009.

1619.

Změny proteomu u pacientů s nestabilní anginou pectoris

Májek Pavel, Reicheltovej Zuzana, Suttar Jiří, Malý Martin, Oravec Milan, Štikarová Jana, Dyr Jan E.

(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; FN Motol, Praha)

Vyhledávání biomarkerů onemocnění patří mezi jednu z priorit uplatnění moderních proteomických metod

v klinické praxi. Jejich znalost přispívá nejen k dokonalejší diagnostice, ale může významně ovlivnit i léčbu a prognózu daného onemocnění. Cílem této základní proteomické studie bylo nalézt změny proteomu plasmatických proteinů, případně nových biomarkerů, u pacientů s nestabilní anginou pectoris. Plasma byla získána centrifugací plné krve odebrané do protisrážlivého roztoku (EDTA) a jednotlivé vzorky byly depletovány na imunoafinitní koloně (odstranění šesti hojně zastoupených plasmatických proteinů). V prvním směru byly proteiny rozděleny isoelektrickou fokusací v rozmezí pI 3-10, ve druhém směru pak pomocí gradientové (5-15%) SDS-PAGE. Gely byly barveny koloidní Coomassie Blue a po digitalizaci vyhodnoceny statistickým programem Progenesis SameSpots. Spoty, které se významně lišily ($p < 0,05$ a minimální násobný rozdíl alespoň 1,5) mezi skupinou pacientů a zdravých dárců byly vyříznuty z gelu a podrobeny identifikaci proteinů pomocí nanoLC-MS/MS. Pro tuto proteomickou studii bylo použito 44 různých vzorků pro následnou 2D SDS-PAGE – 20 gelů bylo připraveno ve skupině zdravých dárců a 24 gelů ve skupině pacientů s nestabilní anginou pectoris. Z každé skupiny byl jeden gel vyřazen. Po statistickém vyhodnocení bylo nalezeno 27 významně odlišných spotů. Proteiny u 24 spotů byly úspěšně identifikovány. Mezi identifikovanými proteiny byly například alfa, beta i gama řetězce fibrinogenu, beta-2-glykoprotein 1, alfa-1-antitrypsin, komplement faktor B nebo apolipoprotein A-1. Některé námi identifikované proteiny jsou známy jako biomarkery u kardiovaskulárních onemocnění (např. apolipoprotein A-1). Další proteiny se jeví jako potenciální biomarkery nestabilní anginy pectoris, tento předpoklad je však třeba ověřit na rozsáhlejší souboru vzorků. Poděkování: Tato práce byla podpořena granty AVČR KAN200670701, VZ ÚHK MZ 02373601 a MZ NS10633-3/2009.

1823.

Závažné infekční komplikace u pacientů léčených pro maligní lymfomy

Ligová Alexandra, Matuška Milan, Ďuraš Juraj, Gumulec Jaromír

(Onkohematologická JIP, FN, Ostrava; Ústav klinické hematologie, FN, Ostrava)

Na posteru jsou prezentovány 2 kazuistiky pacientů léčených ve FN Ostrava pro NH lymfom, u kterých se v průběhu léčby vyskytly závažné infekční komplikace. V prvním případě se jedná o mladého pacienta R.W., r. 1970, léčeného chemoterapií v režimu R-CHOP pro Folikulární lymfom grade 3b s přechodem do DLBCL, klinické stadium IIBES, IPIaa 2 (performance status a LDH), dg. 5.10.09 z uzliny retroperitonea. Průběh CHT byl u pacienta případně komplikován rozsáhlým abscesovým ložiskem ve slezině, s nutností opakované antibiotické terapie. Stav progredoval do septického šoku, přeléčen tigecyklinem s velmi dobrým efektem a následně prove-

denou splenektomií. Druhý pacient K.M., r.1949, je léčen ve FN Ostrava již od roku 2003 pro duplicitní nález lymfomů, v r. 2003 dg. B-CLL/SLL, v r. 2004 dg. DLBCL – nyní léčba od 10/2009 pro relaps B-CLL/SLL, histologicky potvrzen, probíhala léčba R-FC, komplikována nejdříve cytomegalovirovou nemocí, a následně ještě legionelovou pneumonií.

1791.

Úspěšná léčba aspergilozy plic a CNS u pacientky s mnohočetným myelomem – kazuistika

Navrátil Milan, Kořístek Zdeněk, Tichá Marie, Weinbergerová Barbora, Mayer Jiří

(*Interní hematologická klinika, FN, Brno*)

49-letá žena s mnohočetným myelomem IgD lambda diagnostikovaným v r. 2007 s opakovaným relapsem, byla přijata v říjnu 2009 na naše pracoviště s dalším relapsem komplikovaným neoligurickým renálním selháním a hyperkalcémií. Po úvodní terapii režimem BDD jen velmi krátká a přechodná odpověď onemocnění na léčbu. Proto rozhodnuto o podání redukováného vysokodávkovaného melfalanu (70mg/m²) s autologní podporou periferními kmenovými hematopoetickými buňkami (Den 0 = 5.11.2009). V období neutropenie se nejprve rozvíjí febrilní stav s plícním nálezem a pozitivitou galaktomannanu – hodnoceno jako plícní aspergiloza. Zavedena kombinovaná antimykotická terapie vorikonazolem a micafunginem. Následně den +10 dochází ke křečovému stavu s nutností intubace a umělé plícní ventilace, původně přisuzováno těžké hypofosfatémii a hypokalémii. Po 3 dnech extubována, ale rozvíjí se hemoptýza a pro křečový stav s hemoptýzou opět nutná intubace. CT hlavy prokazuje suspektní mykotické ložisko v CNS, NMR nález potvrzuje tvorbu dutinového ložiska suspektního z aspergilomu CNS. Zároveň zjišťovány opakovaně vysoké hodnoty galaktomannanu. Při pokračování kombinované antimykotické terapie není pacientka pro neklid, obtížnou spolupráci schopna weaningu, provedena tedy tracheostomie, pokračuje podpurná ventilace a pacientka hospitalizována na KARIM. Den +52 dle kontrolního CT nárůst perifokálního edému kolem aspergilomu, proto následující den neurochirurgové provádějí extirpaci aspergilomu z temporoparietální oblasti mozku vpravo. Lokálně aplikován amfotericin a vancomycin. Den +60 pak pacientka odpojena od umělé ventilace. Pro polyneuropatie kriticky nemocných zahájena intenzivní rehabilitace, pokračuje jen monoterapií vorikonazolem pro pokles galaktomannanu na normu. Den +92 je pacientka propuštěna do domácí péče, vertikalizována s chůzí o dvou francouzských berlích. Tato kazuistika ukazuje, že v době moderních antimykotik je již i CNS forma aspergilozy léčitelná a to ve spolupráci hematologa, intenzivisty a neurochirurga.

1705.

Atypická infekce Legionella maceachernii u těžce imunokompromitovaného nemocného

Szotkowski Tomáš, Drašar Vladimír

(*Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc; Národní referenční laboratoř pro legionely, Zdravotní ústav, Ostrava*)

Úvod Legionella maceachernii je druh, který se vzácně vyskytuje ve vyšetřovaných vzorcích klinických i z okolního prostředí. Od roku 1985 bylo popsáno pouze 5 případů onemocnění způsobených touto legionelou, z toho 4 smrtelné. Vždy šlo o těžkou pneumonii u nemocného s imunodeficitem. Prezентujeme první případ laboratorně prokázané atypické infekce v Evropě. Popis případu 29-letý muž byl přijat na Hemato-onkologickou kliniku se zhoršující se dušností a dráždivým kašlem v březnu 2007. V roce 2005 nemocný podstoupil alogenní transplantaci krvetvorných buněk pro polycytemia vera, následná chronická extenzivní reakce štěpu proti hostiteli vyžadovala dlouhodobou imunopresivní léčbu vedoucí k častým a závažným infekčním komplikacím. Počítačová tomografie (CT) plic odhalila oboustranné plícní infiltráty budící podezření na mykotickou etiologii. Byla provedena bronchoalveolární laváž a nasazena antimykotická terapie (vorikonazol). Vyšetření tekutiny z laváže zachytilo vlákna Aspergillus sp., překvapivý byl pozitivní kultivační záchyt Legionella maceachernii. Tento záchyt byl potvrzen opakovaným sérologickým vyšetřením (čtyřnásobný vzestup specifických protilátek). Na podkladě záchytu legionely byl do léčby přidán levofloxacin (10 dnů po realizovaném vyšetření BAL). CT vyšetření plic provedené o měsíc později neprokázalo jakékoliv zlepšení nálezu. Navíc se následně rozvinul těžký septický stav (Staphylococcus aureus a polyrezistentní kmeny Pseudomonas aeruginosa). Kontrolní CT plic o další měsíc později již prokázalo regresi plícních infiltrátů. Jejich etiologie však nebyla jednoznačně uzavřena. Byla samozřejmě provedena vyšetření vzorků vody ve všech prostředích, kde nemocný v době před vznikem potíží pobýval, včetně nemocničního. Legionella maceachernii však nebyla v žádném vzorku zachycena. Závěr Legionella maceachernii způsobuje těžké pneumonie. I přes těžký imunodeficit nedošlo u nemocného k vývoji typické legionelové pneumonie popisované v literatuře. Podíl Legionella maceachernii detekované společně s Aspergillus spp. na plícních infiltrátech zůstal nejasný. Legionella maceachernii je druh v českém prostředí vzácný. Za posledních 20 let byl zachycen pouze dvakrát. Podpořeno výzkumným záměrem VZ MŠMT ČR 6198959205.

1669.

Gaucherova choroba jako vzácná příčina trombocytopenie a hepatosplenomegalie u pacientky středního věku - popis případu

Lavičková Alena, Malinová Věra

(*ÚKBH FN, Plzeň; ÚDMP VFN, Praha*)

Gaucherova choroba jako vzácná příčina hepatosplenomegalie a trombocytopenie u pacientky středního věku - po-

pis případu. A. Lavičková, V. Malinová (ÚKBH FN Plzeň, Národní centrum pro Gaucherovu chorobu, ÚDMP a VFN Praha) Úvod: Gaucherova choroba (GCH) je autosomálně recesivně dědičné onemocnění spojené s deficitem enzymu glukocerebrosidázy. Projevuje se střádáním glukocerebrosidu zejména v makrofázích jater, sleziny a kostní dřeni. Má širokou variabilitu a závažnost projevů od invalidizujících forem (postižení skeletu a CNS) až po asymptomatické jedince. Pacientka nar. 1964: Odeslána k hematologickému vyšetření pro protražované krvácení po zubní extrakci. V anamnéze zvýšená tvorba hematomů, častější epistaxe, zvýšená únavnost. Laboratorně trombocytopenie s průkazem trombocytárních protilátek, prodloužená krvácivost a pozitivní test fragility kapilár. Mírně prodloužené APTT bez průkazu deficitu faktorů a von Willebrandovy choroby. Při fyzikálním vyšetření mírná hepatosplenomegalie (potvrzeno CT vyšetřením - bez ložisek, bez adenomegalie). Dle archivní dokumentace hepatosplenomegalie popsána na USG již před 7 lety- tehdy dále nevyšetřována. Vyšetření v jaterní poradně příčinu hepatosplenomegalie neobjasnilo (vyloučena hepatitida a CI hepatitis, jícnové varixy neprokázány, jaterní testy v normě, biopsie jater neindikována). Předána zpět do hematologické ambulance. Vyšetření kostní dřeni odmítla. V průběhu dalšího sledování se objevují bolesti pravého ramene - ortopedem dg aseptická nekroza hlavice humeru. Díky kostním projevům dif. dg. zvažována možnost střádací choroby. Konzultován ÚDMP VFN Praha a provedeno enzymatické vyšetření, jehož výsledky společně s molekulárněgenetickým vyšetřením potvrdily GCH. Předána do péče specializovaného centra k zahájení enzymoterapie. Závěr: V ČR zatím cca 30 diagnostikovaných případů. Více než polovina diagnostikována až v dospělosti. Při incidenci onemocnění v naší populaci by jich mělo být více než 100. Pacienti s mírným, pomalu se rozvíjejícím onemocněním mohou zcela uniknout pozornosti lékařů. Existuje již účinná enzymová terapie, která pacientům zajistí plnohodnotný život. Cílem je stanovit diagnózu ještě před rozvojem ireverzibilního postižení. Vzhledem k hepatosplenomegalii, anemii, trombocytopenii a krvácivým projevům se pacienti s dosud nepoznanou GCH mohou objevit v hematologických ambulancích. V případě vyloučení hematologického onemocnění je třeba myslet i na možnost střádací choroby.

1635.

Non-invasive cardiovascular examinations for the evaluation of extracorporeal LDL-cholesterol elimination efficacy

Štrasová Alena, Bláha Milan, Lánská Miriam, Bláha Vladimír, Malý Radovan, Mašín Vladimír
(II. interní klinika - OKH, Hradec Králové; Geronto-metabolická klinika LF UK, Hradec Králové; Katedra biofyziky LF UK, Hradec Králové)

INTRODUCTION: Extracorporeal LDL-cholesterol elimination (EE) is a very successful therapeutic method in the treatment of severe familial hypercholeste-

roleemia (FH) after other therapeutic approaches have failed. The procedures must be effective but causing minimum discomfort to patients. However, it is very difficult to evaluate the actual activity of atherosclerosis. We report the significance of non-invasive cardiovascular examinations in long-term follow up of patients. **PATIENTS AND METHODS:** A group of 13 patients (8 males, 5 females) in the age of 48 ± 16.6 were treated during 6.5 ± 2.96 years. Two methods of EE were used: LDL-apheresis and hemorheopheresis. Both invasive and non-invasive examinations were used in affected body parts – EKG, ultrasound examination of heart, arteries and catheterisation. **RESULTS:** A rapid alleviation of symptoms was observed shortly after initiating EE therapy. Severe arteriosclerotic complications (myocardial infarctions and strokes) did not recur later. Invasive cardiovascular examinations were only necessary at the beginning of EE therapy. Non-invasive investigations (once in 6 months) were sufficient in the following period. The follow-up of the carotids (the media-intima) showed a regression of its thickness in 4 patients, an unchanged state in 3 and worsening was observed in 5 patients. **CONCLUSION:** Non-invasive cardio-angiologic examination of patients was sufficient as a follow-up in patients with FH treated by EE. It is of advantage to complement with selected haematological, biochemical and immunological indicators. EE of LDL-cholesterol is an effective method of treatment in severe forms of FH. Supported by the grants IGA MH CZ NR/9103-4.

1678.

Haemapheretic cholesterol eliminating therapy (25 years of experience)

Bláha Milan, Zadák Zdeněk, Bláha Vladimír, Andrýs Ctirad, Lánská Miriam, Filip Stanislav, Malý Jaroslav
(II. interní klinika - OKH, Hradec Králové; Centrum pro vědu a výzkum, LF UK, Hradec Králové; Geronto-metabolická klinika LF UK, Hradec Králové; Ústav imunologie a alergologie, LFUK, Hradec Králové; Klinika radiologie a onkologie, LF UK, Hradec Králové)

Therapeutic aphereses are conducted in a broad spectrum of indications (plasma exchange, leukapheresis, erythrapheresis, plateletapheresis, photopheresis, various types of adsorption including ABO mismatch for transplantations) either as routine procedures or in research projects. We started extracorporeal LDL-cholesterol elimination with therapeutical plasmapheresis (plasma exchange) in the year 1984. One (or more) body volume of plasma was exchanged and albumin was usually used as a replacement solution. But the method has shown to be non-specific and some of our authors state that for removal of 1 g of pathogenic substance 200g of plasma proteins should be removed at an average. However, in emergency plasmapheresis remains a rescue method. The research was aimed at specific ex-

tracorporeal elimination of LDL-cholesterol and we treated the first homozygote by immunoapheresis in 1996. In the Czech Republic the therapy of severe familial hypercholesterolemia (FH) by extracorporeal elimination using LDL-apheresis (immunoabsorption) and hemopheresis is concentrated into one center. The authors evaluate the long-term therapy (3-12 years, median 7,25) in 12 patients with FH - 3 homozygous, 9 heterozygous; Fredrickson type IIa, IIb (treated: 9 by LDL-apheresis and 3 by hemopheresis). Immunoapheretic interventions decrease LDL-cholesterol, ApoB and even Lp(a) of about 82 ± 1 ; 73 ± 13 ; 82 ± 19 %, respectively. Selected non-invasive methods (cardiologic, angiologic) are important for a long-term and repeated follow-up. Carotid intima-media thickness showed improvement or stagnation in 75% of the patients. The level of some adhesive molecules, cytokins, endoglin and some coagulation functions were measured, but no universally accepted biomarkers informing of the actual activity of the disease was found to predict and plan the therapy. A new program for procedure planning with the use of Microsoft® Excel for Windows® was developed. In summary, LDL-apheresis and hemopheresis substantially lower LDL-cholesterol in FH. Our experience with long-term therapy also shows good tolerance and a small number of complications (5,6% of clinically irrelevant side-effects). Hemopheresis may improve blood flow in microcirculation in familial hypercholesterolemia and also in some other disorders of microcirculation. The work was supported by a grant from the Internal Grant Agency, Ministry of Health, Czech Republic, No. NS/9743-4.

1668.

Monitorování VEGF v průběhu POEMS syndromu
Minařík Jiří, Ščudla Vlastimil, Bačovský Jaroslav, Pika Tomáš, Petrová Pavla, Čtvrtlík Filip, Metelková Iva, Mysliveček Miroslav
(III. interní klinika FN, Olomouc; Oddělení klinické biochemie FN, Olomouc; Radiologická klinika FN, Olomouc; Klinika nukleární medicíny FN Olomouc)

POEMS syndrom (polyneuropatie, organomegalie, endokrinopatie, monoklonální gamapatie, „skin lesions“) je vzácnou klinickou jednotkou patřící mezi plazmocelulární dyskrázie. Jeho patogeneza je dávana do souvislosti s nerovnováhou mezi prozánětlivými cytokiny. Zejména vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) je v současnosti považován za nejvýznamnější patogenetický činitel a současně patří mezi současné hlavní kritéria POEMS syndromu. Cílem našeho hodnocení bylo posouzení chování VEGF v průběhu onemocnění. V rámci hodnocení byli posouzeni 3 jedinci s POEMS syndromem a odlišnou manifestací i průběhem onemocnění. Kromě splnění konvenčních kritérií hrála významnou roli v diagnostice též moderní zobrazovací vyšetření včetně techneciové scintigrafie,

PET/CT, MRI a angiografie. U všech nemocných byly retrospektivně zhodnoceny hladiny VEGF v různých fázích onemocnění. U prvního nemocného byly vyšší hodnoty zaznamenány v aktivní fázi oproti stabilnímu onemocnění. U dalších dvou bylo možné sledovat chování parametru od diagnózy onemocnění v průběhu léčby, kdy dosažení remise bylo provázeno poklesem VEGF a naopak refrakterní a/nebo relabující onemocnění mělo vzestupný trend tohoto parametru. Naše pozorování naznačují, že VEGF má zásadní roli v patogeneze POEMS syndromu a jeho dlouhodobé sledování do značné míry koreluje s aktivitou onemocnění. Posuzování VEGF tak přispívá k diagnostice a monitorování onemocnění a může být i potenciálním terapeutickým cílem. Za podpory grantu MZ CR NR 9489-3 a VVZ MSM 6198959205.

1786.

Úspěšná léčba intravaskulárního velkobuněčného B-lymfomu rituximabem v monoterapii.

Hrudková Monika, Šimkovič Martin, Smolej Lukáš, Belada David, Malý Jaroslav
(II. interní klinika, oddělení klinické hematologie FN a LF UK, Hradec Králové)

70-letá žena byla v únoru 2010 přijata na naše pracoviště k dovyšetření závažné pancytopenie s febriliemi. Pacientka byla dosud sledována pro arteriální hypertenzi, uzul ve štítné žláze a parézu n.VI nejasné etiologie od r. 2001 (opakovaně normální nález na MR mozku). Klinickému obrazu dominovala 2 měsíce progredující únava, necílený váhový úbytek, recidivující horečky, polyurie a dušnost s hyposaturací s normálním nálezem na RTG i HRCT plic. Dle UZ srdce byly popsány známky plicní hypertenze. V krevním obraze byla přítomna pancytopenie s dominující neutropenií a trombocytopenií (leukocyty $0,49 \times 10^9/l$, hemoglobin 98 g/l, trombocyty $41 \times 10^9/l$). Renální funkce i hormony štítné žlázy byly v normě, výrazná byla elevace LDH (27,1 ukat/l). Cytologie kostní dřeně odhalila kromě zřetelných dysplastických změn také 39 % nezralých elementů, které imunofenotypizačně odpovídaly klonu B-buněčného NeHodgkinova lymfomu, což bylo potvrzeno histologicky nálezem výrazné infiltrace dilatovaných sinusoidů i intersticia lymfoidními elementy se silnou pozitivitou CD20 a CD79 a MUM-1. Nález byl uzavřen jako intravaskulární velkobuněčný B-lymfom. CT/PET prokázal výrazný rozsah extranodálního postižení bez lymfadenopatie (mnohočetná ložiska záchyty fluorodeoxyglukózy ve skeletu, obou plicních křídlech a v parenchymu obou ledvin), jednalo se tedy o stádium IVB,E, IPI 5. Po prefázi (methylprednisolon 80 mg i.v. D1-5, vinkristin 2 mg i.v. D1) byla pro těžkou pancytopenií a špatný celkový stav (výkonnostní stav 3 dle ECOG) zahájena léčba rituximabem v monoterapii (rituximab 375 mg/m^2 1x týdně, celkem 4x). Dále byla pro masivní extranodální postižení provedena lumbální punkce

s intratékální aplikací cytostatik, cytologie i imunofenotypizace likvoru byly negativní. Po 4 dávkách rituximabu došlo k úplné úpravě oxygenační poruchy, diurézy a k ústupu B-příznaků, laboratorně k normalizaci LDH, počtu leukocytů a trombocytů. Kontrolní cytologické, fenotypizační a histologické vyšetření kostní dřeně v březnu 2010 neprokázalo infiltraci lymfomem, došlo také k regresi dysplastických změn. V další léčbě je plánována imunochemoterapie R-COP či R-CHOP v závislosti na celkovém stavu nemocné. Závěr: Intravaskulární velkobuněčný B-lymfom je velmi vzácným typem lymfomu s atypickou symptomatologií, diagnóza je v řadě případů stanovena až post mortem. I když jde o agresivní lymfom, naše kazuistika prezentuje úspěšnou léčbu rituximabem v monoterapii. Podpořeno výzkumným záměrem MZO 00179906 MZ ČR.

1633.

In vazivna mykotická infekcia v orofaciálnej oblasti u imunokompromitovanej pacientky (kazuistika).

Tošková Martina, Ráčil Zdeněk, Kocmanová Iva, Lenigerová Martina, Hrnčířová Kristýna, Mayer Jiří
(*Interní hematologická klinika, FN a LF MU, Brno; Oddělení klinické mikrobiologie, FN Brno; Centrum molekulární biologie a genové terapie IHOK, FN a LF MU, Brno*)

Úvod: Behom posledných rokov došlo k výraznému nárastu počtu invazívnych mykotických infekcií (aspergilóza i zygomykóza), ktoré najčastejšie postihujú imunokompromitovaných pacientov (pacientov s hematologickou malignitou, s imunosupresívnou liečbou, po transplantácii kostnej drene alebo solídnych orgánov), ale aj pacientov s dekompenzovaným diabetom (hyperglykémia, ketoacidóza). Invazívne mykózy predstavujú závažnú komplikáciu ich ďalšej liečby. Metódy: Popis prípadu úspešne liečenej zygomykózy v orofaciálnej oblasti u pacientky (pac.) s akútnou myeloidnou leukémiou (AML) po alogénnej transplantácii kostnej drene (aloHSCT). Výsledky: U 59 ročnej pac. s AML po aloHSCT sa v dobe maximálneho útlmu krvotvorby rozvinula febrilná neutropénia bez reakcie na zavedené empirické antibiotiká a antimykotiká (cefepim, amikacin, flukonazol). Postupne vznikol opuch ľavej tváre a rozvinula sa nekróza vestibula a mäkkého a tvrdého podnebia ľavého maxilárneho výbežku. Histologicky

bolo postihnuté tkanivo prestúpené širokými, neseptovanými mykotickými vláknami, vetviacimi sa v pravom uhle, so zrejmovou angioinváziou. Kultiváciou a PCR metódou bol dokázaný *Rhizopus microsporus* a ihneď zavedená terapia lipidovým komplexom amfotericínu B v dávke 5 mg/kg. V spolupráci s lekármi ústnej a čelustnej chirurgie bola postupne znesená nekróza až na mukoperiost. Na 57. deň po aloHSCT bola pac. spravená subtotálna resekcia maxily. Na obdobie operácie a skoré pooperačné obdobie prechodne zvýšená dávka amfotericínu B na 10 mg/kg. Defekt postupne granuluje od krajov, až granulačné tkanivo celkom prekrylo komunikáciu s maxilárnou dutinou. Pac. bola zhotovená snímateľná náhrada. Celková doba podávania lipid. komplexu amfotericínu bola 124 dní s minimálnou nefrotoxicitou. Pac. bola hospitalizovaná 6 mesiacov, priebeh bol komplikovaný drobnými bakteriálnymi infekciami a vznikom akútnej kožnej GvHD gr. I.-II., ktorá spontánne regredovala. Pac. je t. č. stále v kompletnej remisii invazívnej zygomykózy aj AML. Záver: Liečba zygomykózy je multidisciplinárna. Stojí na systémovej podávanií antimykotík a dôslednej chirurgickej liečbe – odstránenie postihnutej časti tkaniva. Zygomycetami spôsobená cievna trombotizácia a následná tkanivová nekróza totiž zapríčiňuje nízky prienik antimykotík do postihnutých tkanív. Chirurgické odstránenie postihnutého tkaniva sa spája s lepším prežívaním pacientov. Práca bola podporená grantmi Ministerstva Českej republiky NS 10442-3/2009 a NS 10441-3/2009.



Rejstřík autorů

A			
Adam Tomáš		61	
Adam Zdeněk	47, 49, 56, 57, 96, 97, 99, 106		
Adamová Dagmar		56, 92	
Adkins Irena		71	
Aiglová Květoslava		99	
Almáši Martina		95	
Alsabty Firas		52	
Ambrůzová Zuzana		21	
Andrýs Ctirad		113	
Augustiňáková Alena		85, 86	
B			
Bačáková Lucie		101	
Bačovský Jaroslav	48, 49, 92, 114		
Bachratý J.		70	
Balcárková Jana		48	
Balhárek Tomáš		37, 59	
Barbara Cauwelier		52	
Bárta Tomáš		36	
Bartek Jiri		43	
Barthová Martina		37	
Basová Petra		37, 52	
Belada David	10, 17, 29, 31, 39, 114		
Beličková Monika		25	
Bělohávková Petra		34, 64, 77	
Benešová Kateřina		29	
Berková Adéla		52	
Bláha Milan	16, 98, 113		
Bláha Vladimír		113	
Blažek Bohumír		51	
Bocchia M.		19	
Bogoczová Elen		104	
Bojtárová Eva		69	
Bolcková Hana Tereza		46	
Bolčák Karel		31	
Borsky Marek		53	
Böttcher Sebastian		26	
Boublíková Ludmila		89	
Boudová Ludmila		14, 39	
Bourquin Jean-Pierre		54	
Brandejsová R.		16	
Brdicka Tomas		54	
Brejcha Martin		29, 104	
Brychtová Yvona	10, 12, 50, 53		
Brynda Eduard		101	
Březinová Jana		25, 32, 89	
Břízová Helena		85, 86	
Büchler Tomáš		96	
Bultasová Lenka		108	
Burda Pavel		45, 52	
Buresova Ivana		94, 95	
Burešová Iva		96	
Burešová Ivana	47, 93, 109		
Burešová Lucie		79	
Buriánková Eva		10, 38	
Burianová D.		46	
Burjanivová Tatiana		59	
Byrtusová Jana		73	
Bystřická Dagmar		25	
Bystřická Eva		16, 17	
C			
Calábková Lenka		106	
Campr V.		21	
Campr Vít	29, 31, 39, 85		
Cetkovský Petr		52, 59	
Cibulka Marek		110	
Cieslar Petr		102	
Cmunt Eduard		10, 87	
Cukrová Věra		87	
Curik Nikola		36	
Czerny Daniel		104	
Č			
Čecháková Eva		40	
Čechová Hana		33	
Čermák Jaroslav	20, 32, 33, 34, 44, 89		
Čermáková Markéta		15	
Čermáková Zuzana		72, 73	
Černá Daniela		45	
Černá Zdena		51	
Černá Zdeňka		107	
Červínek Libor		34	
Čmejla Radek	17, 24, 64		
Čorbová Drahomíra		99	
Čoupková Irena		31	
Čtvrtlík Filip		114	
Čumová Jana		93, 109	
Čuřík Nikola		45, 52	
D			
de la Rosa Carrillo Daniel		45	
De Souza Goulart Luiz Fernando		45	
Dědečková Kateřina		31	
Demečková Eva	69, 77, 105		
Demytyeva Elena		95	
Demovičová Alice		50	
Dhaifallah Ishraq		100	
Divoká Martina	28, 41, 61, 75, 76, 80, 82, 106		
Divoký Vladimír	35, 43, 62, 63, 106		
Dobeš Petr		18	
Dobešová Blanka		59, 60	
Dobešová E.		46	
Dolezel Petr		43	
Doležalová Dáša		36	
Doležalová Lenka		107	

Doležalová Ludmila	82	Hájková Hana	44
Doskočilová Karolína	98	Hájková Veronika	7
Dostálová Merkerová Michaela	25	Hak Jiří	51
Doubek Jaroslav	67	Hamid Z.	70
Doubek Michael	8, 10, 17, 50, 58, 59, 67,	Hampl Aleš	36, 67
Doubek Michal	12, 20, 53	Hanke Ivo	85
Dráber Peter	26	Hastka J.	7
Drabkin Harry	42	Haškovec Cedrik	44
Drašar Vladimír	112	Hatok Jozef	88
Dudíková Marie	91	Haugvicová Renata	24, 64
Dulíček Petr	55, 58	Hellström-Lindberg Eva	20
Žuraš Juraj	111	Heřmanová Ivana	53
Žuríková E.	70	Heřmanová Zuzana	48, 92
Dušek Ladislav	41, 42, 52, 59	Hilská Irena	85, 86
Dvořák Petr	36	Hluší Antonín	99, 108
Dvořáková Barbora	18	Hnídková Irena	66
Dvořáková Dana	12, 40, 59, 60, 78, 79	Hnilicová R.	46
Dvořáková Lucie	64	Hobbs Josie	92
Dworzak Michael	25	Hochová Iana	32
Dyr Jan E.	101, 111	Hojsíková Ivana	75
F		Holbíková Marta	8
Faber Edgar	13, 14, 34, 61, 67, 75, 76, 80, 82, 86, 106	Holická Monika	32
Fabianová Eva	88	Hollý Pavol	101
Fakan František	14	Holm Anders	45
Feltl David	104	Holubcová Zuzana	36
Filip Stanislav	113	Holusková Iva	91
Filová Elena	101	Holzerová Milena	18, 41, 75, 76, 80, 106
Fišer Karel	25, 45, 54	Hončíková Michaela	23, 28
Flodr Patrik	38	Horáček Jan M.	68
Flores-Montero Juan	26	Horáček Jan	98
Folber František	50, 67, 68	Horký Ondřej	12
Foltánková Veronika	110	Horos Rastislav	62
Forejtková Sylva	67	Horváthová Monika	62
Frančeová Alena	8	Houda Jiří	40
Franková Nikola	93	Hrabáková Pavla	33
Friedecký David	61	Hrabětová Marcela	9, 58
Froňková Eva	54, 104	Hrabětová Šárka	52
Fuchs Oto	32	Hrnčár Matej	101
G		Hrnčířová Kristýna	27, 81, 109, 115
Gabrielová Michaela	66	Hrstková H.	55
Gajdoš Petr		Hrstková Hana	51
Galuszková Dana	91	Hrudková Monika	10, 17, 19, 114
Gančarčíková Markéta	89	Hrušák Ondřej	13, 26, 45, 51, 54
Gazdová Jana	75, 82	Hubáček Jaromír	41, 90
Geierová Věra	107	Hubáček Petr	13
Geryková Bujalková Mária	75	CH	
Gregor Verhoef	52	Chalupníková Petra	28, 29
Gregora Evžen	56, 57, 91, 97, 98	Charalambidu Jedličková A.	46
Gregůrková Jana	22	Chasáková Kateřina	22
Greslikova Henrieta	47, 93, 95	Chlupáč Jaroslav	101
Gumulec Jaromír	56, 104, 111	Chmelenská D.	46
H		Chovancová Jana	67
Hájek Roman	56	Chris De Wolf-Peeters	52
Hájek Roman	47, 49, 55, 56, 57, 81, 91, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 109	Chudej Juraj	88, 101
		Chudý Peter	88

I		Kideryová Linda	82
Idoya Lahortiga	52	Kirkpatrick William R.	109
Ijspeert Hanna	62	Klabusay Martin	67
Indrák Karel	10, 13, 14, 34, 37, 38, 41, 42, 52, 58, 61, 63, 67, 75, 76, 80, 82, 86, 87, 90, 106, 108	Klamová Hana	59, 73, 76
Indráková Jarmila	22, 28, 87	Klásková Kateřina	10, 31, 92
Irving Julie	25	Klimentová Hana	72
Ivičič Jaroslav	85	Klimeš Daniel	47
Izáková Silvia	89	Klincová Mária	47, 49, 92
J		Klodová Drahomíra	104
Jan CoolsIwona Wlodarska	52	Knápková P.	46
Jančinová Viera	88	Kňourková Lidmila	66
Janíková Andrea	39, 40, 83, 84, 85	Kňourková Ludmila	16, 66
Jankovičová Karolína	19	Kocmanová Iva	24, 27, 71, 109, 115
Jankovská Milada	20, 39	Kodet Roman	85, 86
Janotová Iveta	51	Kokavec Juraj	36
Jarkovský Jiří	38	Koláčková Monika	28
Jarošová Marie	10, 14, 18, 28, 34, 41, 42, 48, 51, 61, 75, 76, 80, 82, 106	Kolář Michal	23
Jebavý Ladislav	34, 68	Koledova Zuzana	35
Jedličková Lenka	93	Konířová Eva	102
Jelínek Jiří	71	Koranda Pavel	10, 38
Jenčík Ján	33	Kordačová Lucie	110
Ježáková Jarmila	28, 29	Korelusová Ivana	108
Ježíšková Ivana	60	Kořístek Zdeněk	12, 68, 112
Jindra Pavel	9, 11, 52, 58, 70	Kostečka Arnošt	32
Jirásková I.	27	Kotuličová Daniela	101
Jonášová Anna	32, 34, 45, 87	Kotus Dušan	13
Jungová Alexandra	9, 52, 58, 60, 69, 90	Koubková Petra	8
Jurajdová Lenka	72	Koukalová Alena	17, 106
Juráňová Jarmila	14, 22	Koukalová Renata	99
Jurček Tomáš	50, 59, 60, 79	Koutná Irena	78
Jurečeková Jana	88	Kovarova Lucie	94
K		Kovářová Lucie	81, 93, 96, 109
Kabíčková Edita	29	Koza Vladimír	9, 11, 31, 41, 42, 52, 58, 60, 69, 70, 90
Kacerova Tereza	54	Kozák Tomáš	10, 17, 20, 23, 24, 28, 31, 41, 42, 52
Kačalová Petra	28, 29	Kozelská Renata	73
Kadlčková Eva	32	Kozubek Michal	78
Kadlecová Jana	28	Krajsová Ivana	46
Kaisarová Petra	49, 97, 98	Král Zdeněk	31, 32, 39
Kajaba Václav	7, 17	Kralovics Robert	43
Kalandrová Eliška	28	Kramarzová Karolina	89
Kalina Tomas	54	Krämer Alwin	35
Kalina Tomáš	13, 26, 45, 54	Krátká M.	46
Kalinová Markéta	85, 86	Kratochvílová Lucie	15
Kalousová Jana	105	Krčová Věra	55, 99
Kamarádová Kateřina	31	Krejčí Marta	12, 47, 49, 50, 56, 57, 96
Kanderová Veronika	45	Krejčík Zdeněk	25
Kapalova Martina	36	Krejsek Jan	19
Karas Michal	9, 11, 17, 52, 58, 64, 69, 70, 90, 107	Król Ladislav	13
Karban J.	27	Kryukov Fedor	95
Karban Josef	9, 52, 87, 102	Křen L.	21
Kaspers Gertjan	51	Křivanová Andrea	47, 56, 96
Katrien Van Roosbroeck	52	Kuba Adam	76
Katrincsáková Beáta	41	Kubáčková Kateřina	39
Kessler Petr	56	Kubalová Stanislava	69
		Kubíčková Jana	8
		Kubisz Peter	101
		Kubová Barbora	74
		Kubová Zuzana	82, 86

Kučerová Jana	63	Marcinek Juraj	37, 59
Kučerová Ladislava	10, 38, 82, 86	Marečková Andrea	83, 84
Kučerová Lenka	19	Marková Jana	31
Kuglík Petr	47, 93, 95	Marschalek Rolf	54, 105
Kupská Renata	47, 93	Martišová Michaela	77
Kupska Renata	95	Mašín Vladimír	113
Kyjovská Drahomíra	95, 109	Matějková Eva	46, 110
Kynčl Martin		Matuska Milan	104
L		Matuška Milan	29, 39, 111
Lakotová O.	72	Matýšková M.	7
Lakotová Oldřiška	73	Mayer Jiri	53
Lánská Miriam	66, 98, 113	Mayer Jiří	12, 17, 18, 24, 31, 27, 39, 50, 56, 59, 60, 61, 67, 68, 71, 72, 78, 79, 80, 81, 83, 84, 99, 106, 109, 112, 115
Lapčíková Anna	14, 22	Mazal Oldřich	17, 24, 64
Lasota Zenon	46	Měchurová Alena	100
Laššuthová Petra	33	Mejstříková Ester	25, 26, 42, 51, 54, 105
Lattová Veronika	100	Mendonça Andreia	26
Laváková Veronika	104	Mensah Fane	62
Lavičková Alena	112	Metelková Iva	114
Lécrevisse QuentinCullen Mathew	26	Meyer Claus	105
Lengerová Martina	24, 27, 71, 81, 109, 115	Mičová Kateřina	61
Lhermitte Ludovic	26	Mihál Vladimír	40, 51
Libiger Jiří	32	Michal Michal	14
Ligova Alexandra	104	Michálek Jaroslav	71, 96, 110
Ligová Alexandra	111	Michálka Josef	85
Lindern Marieke	62	Michalka Jozef	39, 83
Lipšic Tomáš	21, 63	Michálková Kamila	40
Lizcová Libuše	89	Michalová Kyra	25, 32, 41, 42, 89
Löfflerová Simona	66	Mikula Peter	22, 48
Lochman Pavel	48	Mikulášová Aneta	23, 47
Lochman Pavel	92	Minařík Jiří	48, 49, 57, 92, 97, 98, 114
Lochmanová Jana	18, 53	Minářová L.	46
Lopotová Tereza	73, 76	Mistrík Martin	69, 77, 88, 105
Lubušký Marek	91, 100	Mjartanová Dagmar	8
Luk Cox	52	Mociková Heidi	23, 29, 31
Lund-Johansen Fridtjof	45	Mohammadová Lekaa	58
Luzna Pavla	43	Mojzíková Renáta	106
Lysák Daniel	9, 11, 58, 70	Mollová Klára	96
M		Moravcová Jana	26, 59, 73, 76, 79, 109
Maaloufová Jacqueline	41, 42	Moricová Hana	104
Machala Ladislav	23	Moulis Mojmír	67, 106
Machálková Kateřina	55, 97, 98	Mráz Marek	18
Machová Poláková Kateřina	26, 59, 73, 76, 79	Mraz Marek	53
Maisnar Vladimír	47, 55, 56, 57, 92, 97, 98	Mrázek František	21
Májek Pavel	101, 111	Mrazkova Pavla	104
Majumdar Romit	36	Mrhalová Marcela	86
Maláková Jana	77	Murdychová Eva	15
Malášková Ludmila	61, 72, 80	Mustjoki S.	7
Malcikova Jitka	53	Muthu Raja Karthick Raja	93, 94, 96
Malčíková Jitka	18	Mužík Jan	12, 41, 42, 52, 59
Malinová Eva	89	Mužíková Kateřina	54
Malinová Karla	84	Mysliveček Miroslav	10, 38, 49, 86, 114
Malinová Věra	112	N	
Malušková A.	72	Nádvořníková Sylvie	26, 79
Malý Jaroslav	19, 34, 55, 68, 77, 98, 113, 114	Najvar Laura K.	109
Malý Martin	111	Navrátil Milan	12, 68, 85, 112
Malý Radovan	113		

Navrkalová Veronika	18	Plank Lukáš	14, 37, 59
Nebeský Tomáš	106	Plevová Karla	18
Necas Emanuel	36, 37	Plevova Karla	53
Nečas Emanuel	52	Plonková Hana	92
Neklanová Marta	40	Polák Jaroslav	73
Němec Pavel	93	Polívka Jindřich	20, 89
Nemec Pavel	95	Polívková Václava	26
Neničková Marie	91	Polonska Marina	70
Neubauer Jiří	99, 106	Porkka K.	19
Neuwirtová Radana	32, 87	Pospisilova Dagmar	62
Neuzil Jiri	35	Pospisilova Sarka	53
NorbertVormoor Josef	25	Pospíšil Vít	52
Nosál Miloš	88	Pospíšil Zdeněk	59
Novák Martin	108	Pospíšilová D.	55
Novák Zbyněk	40	Pospíšilová Dagmar	21, 40, 58, 62, 107
Nováková Ludmila	32, 34, 44, 89	Pospíšilová Šárka	18, 36, 67, 84
Novosadová Alena	22, 28, 92, 106	Potáčková Anna	93
O		Potěšil David	78
Obernauerová Jarmila	56, 92	Pour Luděk	47, 49, 56, 57, 95, 96, 97, 98
Obtliková Petra	9, 52	Prášek Jiří	99
Očadlíková Darina	96	Prejdová Z.	46
Olavarria E.	19	Procházka Martin	100
Olga Gielen	52	Procházka Vít	10, 14, 18, 29, 37, 38, 39, 82, 86
Oltová Alexandra	51	Procházková D.	55
Ondráčková Zuzana	76	Procházková Daniela	51
Oravec Milan	111	Procházková Jana	100
Orfao Alberto	26	Provazníková Dana	32
Ovesná Petra	58	Průcha Miroslav	24
P		Pták Jan	74
Paloušová Dita	27, 81	Ptoszková H.	55
Palová Miroslava	108	Pýcha Karel	105
Panovská Anna	8, 17	Pytlík Robert	9, 29, 31, 39, 82
Papajík Tomáš	10, 14, 18, 29, 37, 38, 39, 75, 82, 86	R	
Pascale De Paepe	52	Ráčil Zdeněk	12, 24, 27, 50, 59, 60, 61, 71, 72, 78, 79, 80, 81, 109, 115
Patterson Thomas F.	109	Radocha Jakub	55, 92, 97, 98,
Pavlíček Pavel	57, 97, 98	Radocha Jakub	92
Pavlova Sarka	53	Raida Luděk	13, 23, 34, 67, 82, 86
Peková Soňa	9, 17, 19, 20, 24, 64	Raskova Kafkova Leona	35
Pelcová Jana	47	Razga Filip	50, 60, 61, 78, 79
Penka M.	7	Reicheltovej Zuzana	101, 111
Penka Miroslav	21, 55, 58, 81, 93	Repovský Štefan	46
Peter Marynen	52	Riedel Tomáš	101
Peter Račay	88	Ročňová Ludmila	18
Peter Vandenberghe	52	Rohoň Peter	7, 10, 61, 75, 80, 106
Peterková Martina	78	Rolencová Monika	24, 72
Petrboková Radka	44	Roziaková Ľubica	105
Petrová Markéta	39	Rožmanová Šárka	28, 61, 76, 80
Petrová Pavla	21, 114	Rulcová Jana	79
Pika Tomáš	48, 49, 57, 92, 114	Rusiňáková Zuzana	13, 67, 86
Pikalová Zuzana	10, 18, 75, 108	Rychtrmocová Hana	82
Piknová D.	46	Ryšavá Jana	59
Pilka Radovan	100	Ř	
Pindurová Ester	105	Řehák Zdeněk	99, 106
Piterkova Lucie	43, 63	Řehořová Lenka	45
Plachý Radek	17, 18, 24, 64		
Plameňová Ivana	88		

S		Sulovská Ivana	46
Sáblíková Barbora	95	Sulovská L.	55
Salačová Petra	28	Sulovská Lucie	107
Salamon Marek	73	Sumerauer David	30
Sandecka Viera	49, 57	Suská Renata	81, 93
Savvulidi Filipp	36, 37, 52	Suttnar Jiří	101, 111
Sečkařová Martina	28, 29	Sůvová J.	8
Sedek Lukasz	26	Svoboda Tomáš	9, 11, 58, 70, 90
Sedláček Petr	13, 51	Svojr Karel	54
Sedláčková Karla	74	Sýkorová Alice	29, 39
Shaik Gouse M.	26	Sýkorová Miroslava	28, 29
Schillerová Lenka	18	Szépe Peter	37, 59
Schmitzová Daniela	19	Szotkowski Tomáš	41, 42, 90, 112
Scholzová Soňa	8	Szturz Petr	106
Schumich Angela	25	Szturz Petr	49, 57, 99
Schützová Miroslava	9, 56, 57, 58, 92, 97, 98	Š	
Schwarz Jiří	9, 10, 21, 44, 51, 58, 73	Šálek David	29, 39, 83, 84, 85
Sičová Kateřina	41, 42, 52	Šárová Iveta	89
Siebertová Katarína	87	Šauerová Renata	87
Sieger Tomáš	25	Ščudla Vlastimil	48, 49, 56, 57, 92, 97, 98, 114
Simetka Ondrej	104	Ščudlová Jana	7, 16
Skopalová Magdalena	31	Šebo Petr	71
Skoultchi Arthur I.	36	Šedo Ondrej	93
Skoumalová Ivana	34, 61, 75, 80	Šedová Zuzana	10, 38, 82, 86
Skuhrová-Francová Hana	84	Šemrová Lucie	16
Slámová Lucie	54	Ševčíková Sabina	95
SlĀstad Heidi	45	Šilerová Věra	92
Slavík Luděk	28, 29, 100	Šimáčková Jitka	46
Sláviková Margita	91	Šimara Pavel	78
Smejkalová Jana	110	Šimetka Ondřej	100
Smetana Jan	47, 93, 95	Šimkovič Martin	17, 114
Smetana Karel	27	Šimová Jarmila	74
Smíšek P.	55	Široký Oldřich	55
Smíšek Petr	51, 54	Šišková Magda	32, 45, 87
Smolej Lukáš	10, 17, 19, 29, 114	Šlechtová Jitka	108
Sninská Zuzana	60, 77	Šlězár Jiří	46
Staňková Martina	33	Šmardová Lenka	31, 39
Stano Kozubik Katerina	53	Špaček Martin	10, 28
Staňo Kozubík Kateřina	84	Špička Ivan	56, 57, 97, 98
Starková Júlia	42, 44, 53	Šrámková Lucie	104
Starostka David	22, 56, 74	Šťastný Petr	24
Starý Jan	13, 51, 54, 89, 104, 105	Štefániková Zdena	92, 105
Staško Ján	101	Štemberková Radka	33
Stehlíková Olga	67	Štěrba Jaroslav	51
Steinerová Kateřina	9, 11, 31, 41, 42, 58, 70	Štikarová Jana	101, 111
Stejskal Stanislav	78	Štossová Jana	109
Stejskalová Alena	22	Štouračová Marcela	109
Stopka Tomas	36, 37	Štrasová Alena	113
Stopka Tomáš	45, 52	Šubrtová Hana	23, 28
Stossova Jana	94	Šupíková Jana	84
Straub Jan	57, 92, 97, 98	Šváblová Helena	68
Strháková Ľubica	75	Šváchová Hana	95, 96
Strnadová Blanka	16	Švojkrová Mája	58
Strnadová Blažena	66	Švubová R.	46
Strojil Jan	7		
Stuchlý Jan	13, 45	T	
Sukopová Věra	7	Takacova Sylvia	43
Suková Martina	104		

Taskesen Erdogan	62	Volfová Pavlína	27, 81
Terkovičová P.	72	Vondráčková Hana	72
Tesařová Lenka	78	Vondráková Jana	13, 32, 34, 62, 87
Thomas Tousseyn	52	Vorlíček Jiří	12
Tichá Marie	112	Votava Tomáš	54, 107
Tichý Boris	18, 83, 84	Votrubová Jana	
Tichy Boris	53	Vozobulová Věra	9, 58
Tichý Martin	74	Vrbacký Filip	19
Tichý Miloš	68	Vroblová Vladimíra	19
Timr Pavel	51	Výdra Jan	23, 24, 41, 42
Tomáška Miroslav	12	Vykydalová Alena	22
Tomšová Hana	16, 66	Vyskočilová Markéta	61
Tošková Martina	24, 27, 71, 81, 115		
Tóthová Elena	92	W	
Touw Ivo	62	Walterová Lenka	56, 92
Trbusek Martin	53	Wasserburgerová Renata	46
Trbušek Martin	18, 67	Weinbergerová Barbora	27, 71, 81, 112
Trka Jan	42, 53, 54, 89	Wiederhold Nathan P.	109
Trněný M.	27	Winterová Jana	27, 71, 72, 80, 81
Trněný Marek	9, 29, 31, 39, 45, 52, 59, 82, 102	Wood Brent	25
Trnková Marie	31, 39	Wróbel Marek	56, 92, 104
Tuček Pavel	13	Wu Weiwei	45
Turcsanyi Peter	10, 18, 108		
		Z	
Ú		Zadák Zdeněk	113
Úlehlová Jana	28, 29, 100	Zahradová Lenka	47, 49, 56, 57, 96
Ulrych Jan	102	Zámková Alena	51
Urbánková Marie	46	Zamostná Blanka	42
Urbanová Renata	10, 14, 18, 75	Zaoralová Romana	47
Uvírová Magdaléna	74	Zapletalová Jana	18, 34, 76, 80, 87
		Zápotocký Michal	44, 105
V		Zarbochová Pavla	81, 93
Vachová Petra	7	Zavadil Jiří	52
Valík Dalibor	104	Zavřelová Alžběta	34, 98
Válková Veronika	9	Zazula Roman	24
van Delft Frederik	54	Zdráhal Zbyněk	78, 93
van der Velden Vincent	26	Zelený Jaroslav	18
van Dongen Jacques	26	Zemanová Karla	79
Vargová Karin	37	Zemanová Markéta	46
Vargová Karina	45, 52	Zemanová Zuzana	25, 51, 54, 89, 104, 105
Vašatová Martina	68	Zini G.	7
Vášová Ingrid	29, 39, 83, 84, 85	Zuna Jan	51, 54, 105
Vávra Vladimír	51		
Verner Jan	36, 53, 67	Ž	
Vernerová Zdeňka	31	Žáčková Daniela	59, 60, 61, 79
Veselá Pavla	14	Žáčková Markéta	73, 76
Veselá Romana	82	Žák Pavel	31, 34, 41, 42, 52, 68, 77, 98
Vidláková Petra	95, 110	Žejšková Lenka	17, 24, 64
Vinarský Vladimír	36	Žiaková Barbora	69
Vlasáková Hana	8	Žikavská Lubica	31
Vodičková Elena	51, 54, 104, 105	Žižková Hana	33
Vodičková Petra	16	Žmijáková Andrea	68
Voglová Jaroslava	34, 41, 42, 52, 60, 64, 77	Žmolíková Jana	48, 74
Vokurka Samuel	9, 11, 16, 58, 69, 70, 90	Žučková Marie	46