



TRANSFUZE A HEMATOLOGIE *dnes*

ČASOPIS SPOLEČNOSTI PRO TRANSFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ
A ČESKÉ HEMATOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI



XXV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí

**XV. Konference ošetřovatelství a zdravotnických laborantů
4rd Symposium on Advances in Molecular Hematology**

Olomouc, 22. – 25. 6. 2011

Supplementum

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

2

Neulasta® chrání vaše pacienty před febrilní neutropenií¹



Zkrácená informace o přípravku Neulasta®

Název přípravku: Neulasta 6 mg injekční roztok. **Léčivá látka a léčivá forma:** 6 mg pegfilgrastim v 0,6 ml (10 mg/ml) injekčního roztoku. Pegfilgrastim se vyrábí r-DNA technologií pomocí *E. coli* (K12). **Terapeutické indikace:** Zkrácení doby trvání neutropenie a snížení incidence febrilní neutropenie u pacientů léčených cytotoxickou chemoterapií pro maligní nádorové onemocnění (s výjimkou chronické myeloidní leukemie a myelodysplastického syndromu). **Dávkování a způsob podání:** Na jeden cyklus chemoterapie se doporučuje jedna dávka 6 mg Neulasty podaná subkutánní injekcí přibližně 24 hodin po aplikaci cytostatik. Zkušenosti u dětí jsou omezené. Úprava dávky u pacientů s poškozením ledvin, včetně pacientů s konečným stadiem onemocnění ledvin, se nedoporučuje. **Kontraindikace:** Hypersenzitivita na pegfilgrastim, na proteiny pocházející z *E. coli* nebo na kteroukoliv pomocnou látku. **Zvláštní upozornění a zvláštní opatření pro použití:** Dosud nejsou k dispozici dostatečné údaje o dlouhodobých účincích Neulasty u pacientů s akutní myeloidní leukémií. U těchto pacientů by měla být Neulasta podávána se zvláštní opatrností. Bezpečnost a účinnost Neulasty dosud nebyly zkoumány u pacientů s myelodysplastickým syndromem, chronickou myeloidní leukémií a u pacientů se sekundární AML, proto by u těchto pacientů neměla být používána. Zvláštní pozornost by měla být věnována rozlišení blastického zvratu u chronické myeloidní leukemie od akutní myeloidní leukemie. Bezpečnost a účinnost podávání Neulasty nebyla proведена u pacientů s nově zjištěnou AML, u pacientů mladších 55 let s cytogenetickým nálezem t(15;17) a u pacientů léčených vysokými dávkami chemoterapeutik, dále pak při mobilizaci krevních progenitorových buněk krve u pacientů nebo zdravých dárců. V případě příznaků syndromu dechové tísně u dospělých (ARDS) musí být léčba Neulastou ukončena podle rozhodnutí lékaře a musí být zahájena odpovídající terapie. Po podání G-CSFs se často vyskytuje obvykle bezpříznaková splenomegalie. Velmi vzácně byly hlášeny případy ruptury sleziny. Velikost sleziny by měla být proto pečlivě sledována. Doporučuje se pravidelné sledování počtu krevních destiček a hematokritu. Opatření je zapotřebí u pacientů se srpkovitou anémií. Farmakokinetické vlastnosti pegfilgrastimu byly hodnoceny u 37 pediatric-

kých pacientů se sarkomem, kteří dostali 100 µg/kg pegfilgrastimu po ukončení chemoterapie VAdriaC/IE. S výjimkou nejmladší věkové skupiny (0–5 let) byla u pediatrických pacientů farmakokinetika pegfilgrastimu podobná jako u dospělých léčených pegfilgrastimem v dávce 100 µg/kg po ukončení terapie kombinací doxorubicin/docetaxel. Nejmladší věková skupina (0–5 let) měla vyšší medián expozice pegfilgrastimu než starší děti. **Interakce s jinými léčivými přípravky a jiné formy interakce:** Neulasta by měla být podána přibližně 24 hodin po aplikaci cytostatik. Současné podání Neulasty a 5-fluorouracilu nebo jiných antimetabolitů během testů na zvířecím modelu mělo za následek potenciální myelosuprese. **Těhotenství a kojení:** Neulasta by se neměla podávat v těhotenství (pokud to není nezbytně nutné) a kojícím ženám. **Nežádoucí účinky:** Nejčastěji hlášeným nežádoucím účinkem byla bolest kostí, obecně mírná až středně těžká a přechodná a u většiny pacientů zvládnutelná standardními analgetiky. Také byly hlášeny alergické reakce včetně anafylaxe, vyrážky, kopřivky, reakce v místě vpichu, zarudnutí, angioedému, dyspnoe a hypotenze. Další hlášené nežádoucí účinky jsou bolest v místě aplikace; bolest na hrudi (nonkardiálního původu); bolest hlavy; artralgie; myalgie; bolest zad, končetin, muskuloskeletální bolest a bolest krku. **Děti:** U mladších dětí ve věku 0–5 let (92 %) byl pozorován ve srovnání se staršími dětmi ve věku 6–11 let (80 %) a 12–21 let (67 %) a dospělými vyšší výskyt závažných nežádoucích účinků. Nejčastějším nežádoucím účinkem byla bolest kostí. **Inkompatibility:** Neulasta je inkompatibilní s roztoky chloridu sodného. **Zvláštní opatření pro uchování:** Uchovávejte při 2–8 °C (v chladničce). Neulasta může být vystavena pokojové teplotě (do 30 °C) na maximálně jedno období ne delší než 72 hodin. Chraňte před mrazem a světlem. **Druh obalu:** Předplněná injekční stříkačka k jednorázovému použití ze skla typu I s jehlou z nerezavějící oceli. Jedna krabička obsahuje 1 předplněnou injekční stříkačku. **DRŽITEL ROZHODNUTÍ O REGISTRACI:** Amgen Europe B.V., Minervum 7061, 4817 ZK Breda, Nizozemsko. **REGISTRAČNÍ ČÍSLO:** EU/1/02/227/002. **DATUM REVIZE TEXTU:** 23. října 2009. Před předepsáním přípravku se prosím seznamte s úplným zněním Souhrnu údajů o přípravku. Přípravek je v zásobě na lékařský předpis. Přípravek je hrazen z prostředků zdravotního pojištění.

Literatura: 1. Vogel CL, et al. *J. Clin. Oncol.* 2005;23:1178–1184

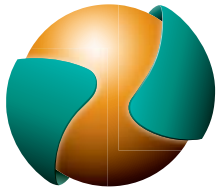
AMGEN
Oncology

Amgen s.r.o.
Klimentská 46, 110 02 Praha 1
Tel.: +420 221 773 500, fax: +420 221 773 501
www.amgen.cz

CZ-NL-AMG-005-2011

 **Neulasta®**
(pegfilgrastim)

Optimal protection



EXJADE®

deferasiroxum

ÚČINNÁ CHELATAČNÍ LÉČBA¹

- **INDIKOVANÉ TAKÉ U VRODNÝCH PACIENTŮ S MDS**
- **SNADNÉ DÁVKOVÁNÍ¹**

¹ SPC přípravku Exjade

² Norbert Gattermann, et al.; Deferasirox in iron-overloaded patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndromes: Results from the large 1-year EPIC study, *Leukemia Research* 34 (2010) 1143 – 1150

³ Chronické přetížení organismu železem způsobené transfuzemi krve, kde je léčba deferoxaminem kontraindikována nebo nevhodná u pacientů se získanou anémií s myelodysplastickým syndromem s nízkým či středním – 1 rizikem dle IPSS¹

EXJADE® 125 mg tablety pro přípravu perorální suspenze
EXJADE® 250 mg tablety pro přípravu perorální suspenze
EXJADE® 500 mg tablety pro přípravu perorální suspenze

Složení: Léčivá látka: Deferasiroxum 125 mg, 250 mg nebo 500 mg.

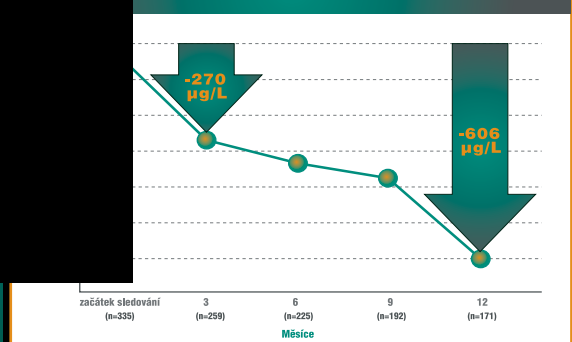
Indikace: Chronické přetížení organismu železem způsobené transfuzemi krve u pacientů s beta-talasiemií major. Chronické přetížení organismu železem způsobené transfuzemi krve, kde je léčba deferoxaminem kontraindikována nebo nevhodná u pacientů s jinými typy anemií.

Dávkování: Doporučená úvodní denní dávka je 20 mg/kg tělesné hmotnosti. Lze zvážit dávku 30 mg/kg u pacientů dostávajících 14 ml/kg/měsíc erytrocytární masy (>4 jednotky/měsíc) a s potřebou snížit hladinu železa v organismu. Lze zvážit dávku 10 mg/kg u pacientů, kteří dostávají <7 ml/kg/měsíc erytrocytární masy (<2 jednotky/měsíc) a kteří nepotřebují snížit zvýšenou hladinu železa v organismu. U pacientů již úspěšně léčených deferoxaminem lze stanovit úvodní dávku jako numerickou polovinu dávky deferoxaminu. Doporučuje se měsíčně monitorovat hladinu feritinu v séru a udržovací dávku postupně upravovat každý 3. až 6. měsíc podle výsledku o 5 až 10 mg/kg. U pacientů nedostatečně léčených dávkami 30 mg/kg (např. hladiny sérového feritinu přetrvávají nad hodnotou 2 500 µg/l a nevykazují klesající trend během léčby) mohou být zvážovány dávky do 40 mg/kg. Udržovací dávky vyšší než 40 mg/kg se nedoporučují. Při pokusu hladiny sérového feritinu pod 500 g/l se léčba přerušit. Tablety se užívají jednou denně nalačno, 30 minut před jídlem, rozmíchané ve vodě nebo džusu. U starších pacientů není nutná úprava dávek, nicméně během léčby by měly být pozorně sledovány nežádoucí účinky, které mohou vyžadovat změnu dávkování. * U dětí ve věku od 2 do 17 let není nutná úprava dávkování. Bezpečnost a účinnost u dětí od narození do 23 měsíců nebyla dosud stanovena. * U pacientů se zhoršenou funkcí jater není třeba upravovat úvodní dávku. Jaterní funkce musí být monitorovány před léčbou, každé 2 týdny během prvního měsíce léčby a potom každý měsíc.

Kontraindikace: Hypersenzitivita na léčivou látku nebo kteroukoli pomocnou látku přípravku. Kombinace s jinými chelatory železa. Pacienti s clearance kreatininu 60 ml/min.

Zvláštní upozornění: Sérovy kreatinin, clearance kreatininu je nutno stanovit před zahájením léčby a monitorovat každý týden první měsíc léčby nebo po změně dávky, poté jednou měsíčně. Dávku lze snížit o 10 mg/kg, pokud sérový kreatinin stoupne >33 % nad průměr před zahájením léčby a/nebo clearance kreatininu klesne pod spodní limit normálu. V některých případech po uvedení přípravku na trh vedlo zhoršení funkce ledvin k jejich selhání, které vyžadovalo přechodnou nebo trvalou potřebu dialýzy. Pokud je po snížení dávky pozorováno zvyšování sérového kreatininu a pokles clearance kreatininu, je nutno léčbu přerušit. Renální tubulopatie byla hlášena především u dětí a dospívajících s beta-talasiemií léčených přípravkem EXJADE. Měsíčně je třeba monitorovat proteinurii. Sérové transaminázy, bilirubin a alkalickou fosfatázu je nutno stanovit před zahájením léčby a monitorovat každé dva týdny první měsíc a poté jednou měsíčně. Léčba by měla být přerušena, jestliže zvýšená hladina transamináz v séru přetrvává nebo se dále zvyšuje. Po uvedení přípravku Exjade na trh byly hlášeny případy selhání jater (některé fatální). U pacientů s poškozením jater a ledvin může být Exjade podáván s opatrností. Mohou se vyskytnout známky gastrointestinálního podráždění. U pacientů s krátkou očekávanou délkou života (například s vysoce rizikovými myelodysplastickými syndromy), zejména pokud současně onemocnějí zvyšují riziko nežádoucích účinků, může být prospěch z léčby omezen a může být nižší než riziko. Z těchto důvodů není léčba doporučena. Byl hlášen výskyt vředů a krvácení ze zažívacího traktu u dospělých, dospívajících a dětí. Byla zaznamenána hlášení fatální gastrointestinální hemoragie, především u starších pacientů s

sné snížení hladiny feritinu se prohlubuje s dobou léčby²



hematologickými malignitami a/nebo nízkými počty krevních destiček. Je třeba věnovat pozornost pacientům užívajícím léky s ulcerogenním potenciálem nebo antikoagulační. *Současné podávání deferasiroxu a repaglinidu (substrát CYP2C8) nebo substrátů CYP1A2 s úzkým terapeutickým indexem jako je teofylin, klozapin nebo tizanidin není doporučeno. * Při výskytu závažné kožní vyrážky se podávání přípravku Exjade přerušit a po vymizení se léčba obnoví nižší dávkou. Léčbu je třeba ukončit při výskytu závažných reakcí hypersenzitivity. Provádí se pravidelné roční vyšetření sluchu a zraku. Tablety obsahují laktózu.

Po uvedení na trh byly hlášeny případy leukopenie, trombocytopenie nebo pancytopenie. Většina pacientů měla poruchy krve tvorby již před léčbou přípravkem Exjade, přispívající vliv léčby nicméně nelze vyloučit. Při neobjasněné cytopenii by mělo být zváženo přerušit léčbu. **Interakce:** Nedoporučuje se podávat společně s antacidy obsahujícími hliník. Biologická dostupnost byla zvýšena, pokud byl užíván spolu s potravou. Užívat nalačno, nejméně 30 minut před jídlem, ve stejnou denní dobu. Zvýšená opatrnost při současném užívání s látkami metabolizovanými s CYP3A4 (cyklosporin, simvastatin, hormonální kontraceptiva), substráty CYP2C8 (repaglinid, paklitaxel), látkami se známým ulcerogenním potenciálem (např. NSA, kortikosteroidy, perorální bisfosfonáty) nebo s antikoagulační. Nelze vyloučit snížení plazmatických hladin při současném podávání se silnými UGT induktory (rifampicin, karbamazepin, fenobarbital, fenytoin, ritonavir).

Těhotenství a kojení: Přípravek nepodávat v průběhu těhotenství, pokud to není nezbytně nutné. V průběhu podávání přípravku se nedoporučuje kojení.

Nežádoucí účinky: Velmi časté: zvýšení kreatininu v krvi. Časté: bolesti hlavy, průjem, zácpa, zvracení, nauzea, bolest břicha, nadýmání, dyspepsie, zvýšená hladina transamináz, vyrážka, svědění, proteinurie. Další nežádoucí účinky - viz úplná informace o přípravku.

Podmínky uchování: Uchovávejte v původní obalce před vlhkostí.

Dostupné lékové formy/velikosti balení: 28. Poznámka: Dříve než lék předepíšete, přečtěte si pozorně úplnou informaci o přípravku.

Reg. číslo: Exjade 125 mg – EU/1/06/356/003; Exjade 250 mg – EU/1/06/356/005; Exjade 500 mg – EU/1/06/356/005. Datum registrace: 28.02.2006. Datum poslední revize textu SPC: 12/2010. Informace o registraci: Novartis Europharm Limited, Horsham RH12 5AB, Velká Británie.

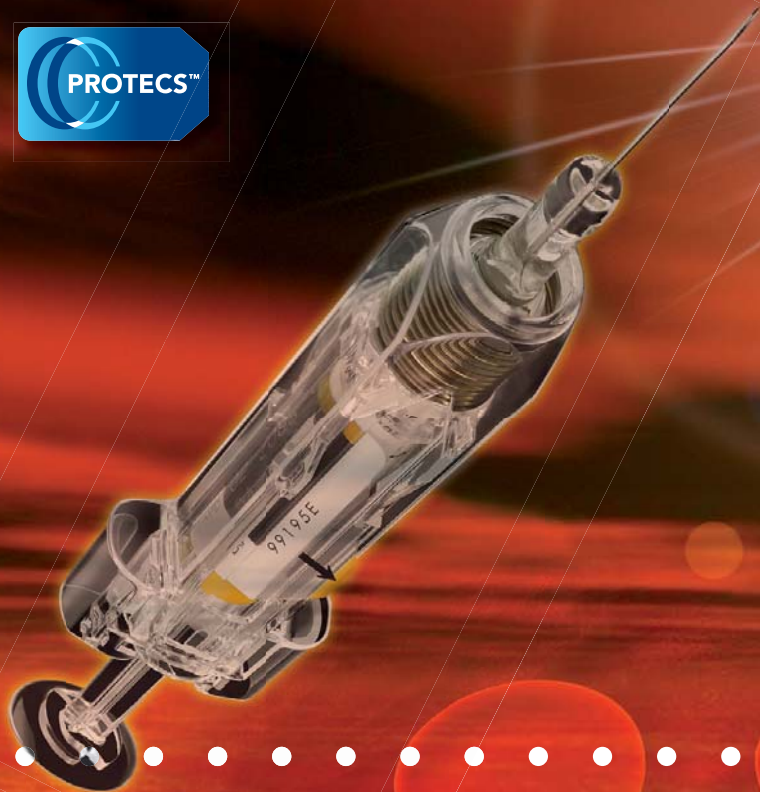
Výdej přípravku je vázán na lékařský předpis. Exjade 500 mg je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění. Uhrada přípravku Exjade 125 mg a Exjade 250 mg z prostředků veřejného zdravotního pojištění dosud nebyla stanovena.

*Všimněte si prosím změny (změn) v informacích o léčivém přípravku.



EPREX[®]
epoetin alfa

**Prověřená účinnost
a bezpečnost**



**Eprex 40.000 IU
jednou týdně**

ZKRÁCENÁ INFORMACE O PŘÍPRAVKU pro onkology a hematologický

Název přípravku: EPREX 40 000 IU/ml, injekční roztok. Antianemikum. **Účinná látka:** epoetinum alfa, 40 000 IU (336 mikrogramů v 1 ml)
Léková forma: injekční roztok k intravenózní a subkutánní aplikaci v předplněných injekčních stříkačkách a v injekčních lahvičkách. **Indikace v onkologii a hematologii:** Léčba anémie a snížení potřeby transfuze dospělých pacientů podstupujících chemoterapii solidních tumorů, maligního lymfomu nebo mnohočetného myelomu, a v případě rizika transfuze vyplývajícího z celkového stavu pacienta. Zvýšení výtečky autologní krve u dospělých pacientů v programu předoperačního autologního odběru a ke snížení rizika alogenních krevních transfuzí. **Dávkování:** EPREX se u pacientů s anémií podává subkutánně (koncentrace hemoglobinu ≤ 10 g/dl (6,2 mmol/l)). Vzhledem k variabilitě mezi jednotlivými pacienty mohou koncentrace hemoglobinu u jednotlivých pacientů být nižší nebo vyšší, než je požadovaný limit. Rozdíly v koncentraci hemoglobinu je nutné korigovat pomocí úpravy dávky tak, aby cílová koncentrace hemoglobinu byla v rozmezí 10 g/dl (6,2 mmol/l) až 12 g/dl (7,5 mmol/l). Je zapotřebí zabránit tomu, aby koncentrace hemoglobinu byla trvale vyšší než 12 g/dl (7,5 mmol/l). Úvodní dávka 150 IU/kg 3 x týdně subkutánně. Alternativně 450 IU/kg 1x týdně subkutánně. Po 4 týdnech kontrola léčebné odezvy (vzestup Hb ≥ 1 g/dl nebo retikulocyty ≥ 40 000 buněk/ μ l). Pokud odezva není, zvýšení dávky na 300 IU/kg 3 x týdně subkutánně. Pokud ani po dalších 4 týdnech léčebná odezva není, je účelné léčení ukončit. Při vzestupu Hb o > 2 g/dl za měsíc redukovat dávku o 25–50%. Přesáhne-li hladina Hb 13 g/dl, přerušit léčbu do poklesu pod 12 g/dl a poté zahájit dávkou o 25% nižší. Léčba by měla pokračovat jeden měsíc po ukončení chemoterapie. **Kontraindikace:** Pacienti, u nichž došlo v důsledku léčby kterýmkoliv erythropoetinem k rozvoji čisté aplázie červené řady. Nevládnutelná hypertenze, předtílvělost ke složkám přípravku. **Zvláštní upozornění:** Je nutné pravidelně kontrolovat hladinu hemoglobinu, monitorovat krevní tlak, případně zahájit nebo upravit antihypertenzní terapii. Doporučuje se monitorovat počet trombocytů. Před zahájením léčby epoetinem alfa by měly být diagnostikovány a léčeny jiné příčiny anémie (deficit železa, hemolyza, ztráta krve, deficit vitamínu B12 a kyseliny listové). Opatrnost je nutná u pacientů s epilepsií a chronickým jaterním selháním. Vzhledem ke zvýšenému výskytu trombovaskulárních příhod u pacientů s nádorovým onemocněním léčených látkami stimulujícími erytropoézu, zejména u pacientů se zvýšeným rizikem by mělo být pečlivě zhodnoceno riziko proti očekávanému přínosu. Kromě toho byly hlášeny i případy trombocytémie nad normální hodnoty. Existuje možnost, jako u všech růstových faktorů, že látky stimulující erytropoézu mohou stimulatovat růst některých malignit. Velmi vzácně byla po měsících až letech léčby subkutánním epoetinem hlášena čistá aplázie červené krevní řady způsobená tvorbou protilátek. Epoetin alfa by měl být podáván s opatrností pacientům s porfyrií. Pro zlepšení dohledatelnosti látek stimulujících erytropoézu (ESA) je nutno provést všechna nutná a možná opatření (např. řádné zdokumentování přesných informací o použití přípravku). Kromě toho mají být pacienti převedeni z léčby jednou ESA na jinou pouze pod náležitým dohledem. U pacientů léčených epoetinem alfa byl velmi vzácně pozorován vývoj nebo exacerbace porfyrie. Paradoxní pokles hemoglobinu a rozvoj závažné anémie související s nízkým počtem retikulocytů musí být výzvou k ukončení léčby epoetinem a k provedení testu na anti-erythropoetinové protilátky. Případy byly hlášeny u pacientů s hepatitidou C léčených interferonem a ribavirínem, když byly současně užívány epoetiny. Epoetiny nebyly schváleny pro léčbu anémie zároveň s hepatitidou C. V některých klinických situacích by měla být u anemických pacientů s nádorovým onemocněním upřednostňována krevní transfuze. Rozhodnutí podat rekombinantní erythropoetin by mělo být založeno na posouzení rizika ku prospěchu léčby s přihlédnutím na jednotlivého pacienta a mělo by zahrnovat specifický klinický kontext. Hodnotící faktory, které je třeba vzít v úvahu, jsou typ a stádium nádoru, stupeň anémie, doba přežití, prostředí, ve kterém je pacient léčen a pacientova volba. **Interakce:** Údaje svědčící pro alteraci metabolismu jiných léků při podávání epoetinu alfa nebyly zjištěny. Není však vyloučena potenciální interakce s cyklosporinem vzhledem k jeho vazbě na erytrocyty. Podává-li se epoetin alfa současně s cyklosporinem, je zapotřebí monitorovat koncentrace cyklosporinu v krvi a v případě nutnosti upravit dávkování cyklosporinu úměrně vzestupu hematokritu. Nepodávat intravenózní infúzi nebo spolu s roztoky jiných léků. **Těhotenství a kojení:** Adekvátní kontrolované studie u gravidních žen nejsou k dispozici. Studie se zvířaty prokázaly reprodukční toxicitu. Není známo, zda exogenní epoetin alfa prostupuje do mateřského mléka. Epoetin alfa by měl být užíván s opatrností u kojících žen. **Nežádoucí účinky:** Nejčastějším nežádoucím účinkem během léčby epoetinem alfa na dávce závislé zvýšení krevního tlaku nebo zhoršení již existující hypertenze, hluboká žilní trombóza, plicní embolie, záchvaty, průjem, nauzea, bolest hlavy, onemocnění podobné chřipce, pyrexie, vyrážka a zvracení. Onemocnění podobné chřipce včetně bolesti hlavy, artralgie, myalgie a pyrexie se může objevit zejména na začátku léčby. Byly hlášeny hypersenzitivní reakce, včetně případů vyrážky, kopřivky, anafylaktické reakce a angioneurotického edému. **Balení:** Druh obalu: předplněná jednorázová skleněná stříkačka s plastovým píštěm opatřeným teflonovým uzávěrem, s ocelovou jehlou chráněnou pevným krytem a bezpečnostním nástavcem připojeným ke stříkačce. Zapertovaná lahvička z bezbarvého skla s Al krytem s polypropylenovým chráněním, krabička. 0,5 ml (20 000 IU); 0,75 ml (30 000 IU); 1 ml (40 000 IU) injekčního roztoku v předplněné injekční stříkačce. 1 ml (40 000 IU) injekčního roztoku v injekční lahvičce. Na trhu nemusí být všechny velikosti balení. Doba použitelnosti předplněných injekčních stříkaček je 18 měsíců, injekčních lahviček 2 roky. Nepodávejte intravenózní infúzi nebo spolu s roztoky jiných léků. **Zvláštní opatření pro uchování:** V chladničce při teplotě 2–8 °C v původním obalu. Toto teplotní rozmezí musí být přísně dodržováno až do podání pacientovi. Je nutno zabránit zmraznutí, chránit před světlem, neroztřepávat před použitím. Jestliže je EPREX používán v rámci ambulantní péče, může jej pacient vyjmout z chladničky a uchovávat při teplotě do 25 °C nejdéle 3 dny, a to pouze jednou. **Návod k použití přípravku:** Přípravek je určen k jednorázovému použití. Předplněné injekční stříkačky jsou opatřeny bezpečnostním nástavcem, který pomáhá předjet poranění způsobeného použitím jehly. Přípravek by neměl být použit a měl by být zlikvidován – pokud je porušen uzávěr, roztok je zabarven nebo obsahuje viditelné částice, při poruše chladničky a při podezření, že přípravek mohl být nedopatřením zmrazen. **Držitel registračního povolení:** Janssen-Cilag s. r. o., Karla Enříše 3201/6, 150 00 Praha 5, Česká republika. **Registrační číslo:** 12/326/00–C. **Datum revize textu:** 03/2011. Podrobné informace v Souhrnu údajů o přípravku, v příbalové informaci nebo u firmy Janssen. Adresa: Janssen–Cilag s. r. o., Karla Enříše 3201/6, 150 00 Praha 5. Přípravek je na lékařský předpis. Je hrazen z prostředků zdravotního pojištění.

EPR/inj/ONC/ADS/APR2011/CZK001



KARLA ENŘIŠE 3201/6, 150 00 PRAHA 5 – SMÍCHOV, TEL.: 227 012 222, FAX: 227 012 275

www.janssen-cilag.cz

TRANSFUZE A HEMATOLOGIE *dněs*

SUPPLEMENTUM 2 • ČERVEN • ROČNÍK 17/2011

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 ČESKOU 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

pplk. MUDr. Miloš Bohoněk, Ph.D.

odd. hematologie, biochemie a krevní transfuze

Ústřední vojenské nemocnice, Praha

MUDr. Zuzana Čermáková, Ph.D.

Krevní centrum Fakultní nemocnice, Ostrava

MUDr. Dana Galuszková, Ph.D., MBA

Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice, Olomouc

doc. MUDr. Zdenka Gašová, CSc.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

MUDr. Růžena Herynková

Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice, Plzeň

MUDr. Jitka Kracíková

Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice

Královské Vinohrady, Praha

MUDr. Libuše Pagáčová

Autotransfuzní jednotka PLM Institutu klinické

a experimentální medicíny, Praha

MUDr. Renata Procházková, Ph.D.

Transfuzní oddělení Krajské nemocnice, Liberec

MUDr. Eva Tesařová

Transfuzní oddělení a krevní banka Fakultní nemocnice, Brno

ZA ČESKOU 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 LF UK a FN, 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

Podpůrná péče a infekční komplikace	7	XV. Konference ošetrovatelství a zdravotních laborantů (Laborantská sekce 2)	54
Hodgkinův lymfom	10	SOBOTA 25. ČERVNA 2011	
Hemostáza	13	Chronická myeloidní leukemie/Myeloproliferativní onemocnění	56
Transplantace	14	Chronická myeloidní leukemie	59
Ne-hodgkinské lymfomy 1	17	Chronická lymfocytární leukemie	61
Minimální residuální nemoc u lymfoidních malignit	19	Akutní leukemie	64
Myelodysplastický syndrom / Anémie	23	Myelodysplastický syndrom/Anémie	66
Ne-hodgkinské lymfomy 2	25	Chronická myeloidní leukemie/Myeloproliferativní nemoci	67
XV. Konference ošetrovatelství a zdravotních laborantů (Sesterská sekce 1)	28	Hemostáza	68
4th Symposium on Advances in Molecular Hematology I.	31	NHL	71
Edukační sekce Mnohočetný myelom	33	Podpůrná péče	71
XV. Konference ošetrovatelství a zdravotních laborantů (Sesterská sekce 2)	33	Transfuzní lékařství	72
4th Symposium on Advances in Molecular Hematology II.	35	Transplantace	75
Mnohočetný myelom	37	PÁTEK 24. ČERVNA 2011	
Transfuzní sekce	40	Chronická lymfocytární leukemie	81
4th Symposium on Advances in Molecular Hematology – Molecular pathogenesis and target therapy in multiple myeloma III.	42	Laboratorní sekce	81
XV. Konference ošetrovatelství a zdravotních laborantů (Laborantská sekce 1)	45	Mnohočetný myelom	86
Akutní leukemie	48	Molecular Hematology	92
Laboratorní sekce	51	Ošetrovatelství	92
		Zdravotní laboranti	96
		Pouze k publikaci	99

Redakce neručí za jazykovou a odbornou správnost abstrakt.

Časopis *Transfuze a hematologie dnes* je v roce 2011 poskytován členům ČHS a STL zdarma díky podpoře společnosti Janssen-Cilag.



<http://www.cls.cz>

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2011

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 30. 5. 2011

Zaslané příspěvky se nevracejí. **Vydavatel získá otiskem 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.

Místo konání
NH Olomouc Congress a Omega centrum sportu a zdraví, Olomouc

Prezident sjezdu

prof. MUDr. Karel Indrák, DrSc.

Předseda organizačního výboru

doc. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.

Předseda vědeckého výboru

doc. MUDr. Edgar Faber, CSc.

Vědecký sekretář pro transfuzní problematiku

MUDr. Dana Galuszková, Ph.D., MBA

Koordinátoři XV. Konference nelékařských profesí v hematologii

za sekci Ošetřovatelství

Mgr. Václav Kajaba, Ph.D.

Bc. Monika Labudíková

za sekci Zdravotních laborantů

Mgr. Jarmila Juráňová

Jana Kadlecová

Koordinátoři 4th Symposium on Advances in Molecular Hematology

doc. RNDr. Vladimír Divoký, Ph.D.

prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová, CSc.

Vědecký výbor

E. Bystřická, J. Čermák, V. Divoký, M. Doubek, E. Faber, D. Galuszková, R. Hájek, A. Hluší, M. Hubáček, K. Indrák, M. Jarošová, J. Juráňová, J. Kadlecová, V. Kajaba, H. Klamová, V. Koza, M. Labudíková, T. Lipšic, V. Maisnar, J. Malý, J. Masopust, J. Mayer, T. Papajík, Z. Pavlíková, L. Plank, D. Pospíšilová, V. Procházka, L. Raida, V. Řeháček, L. Smolej, D. Starostka, J. Starý, T. Stopka, V. Ščudla, T. Szotkowski, J. Trka, M. Trněný, J. Veselková, S. Vokurka, J. Vondráková, M. Zítková

Organizační výbor

D. Bendová, V. Divoký, E. Faber, M. Hofmanová, K. Indrák, M. Jarošová, V. Kajaba, T. Papajík, Z. Pikalová, T. Szotkowski, L. Štursová

Hlavní téma

Mnohočetný myelom

Témata

Akutní a chronické leukemie	Trombofilní a krvácivé stavy
Maligní lymfoproliferace	Transfuzní lékařství
Myelodysplastický syndrom a příbuzné choroby	Laboratorní a experimentální hematologie
Chronická myeloproliferativní onemocnění	Podpůrná péče
Transplantace krvevorných buněk	Ošetřovatelská problematika
Anémie	Varia
Imunitní cytopenie	

Topics of 4th Symposium on Advances in Molecular Hematology

Oncogenes and tumor suppressor genes
Regulation of cell cycle
Stem cells
Epigenetics
Advances in molecular diagnostics and targeted therapy

Formy prezentace
přednášky, postery

Jednací jazyk
čeština, slovenština, angličtina

**Organizační sekretariát,
registrace**
Lenka Štursová a Dana Bendová

POŘÁDAJÍ

Česká hematologická společnost ČLS JEP
HAIMAOM, nadace na podporu transplantace kostní dřeně
Lékařská fakulta UP v Olomouci
Česká asociace sester
Společnost pro transfúzní lékařství ČLS JEP



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. M. Koláře, Ph.D.
hejtmana Olomouckého kraje Ing. M. Tesaříka

GENERÁLNÍ PARTNEŘI

AMGEN s.r.o. / Janssen - Cilag s.r.o. / Novartis s.r.o.

AMGEN

Janssen
PHARMACEUTICAL COMPANIES
OF Johnson & Johnson

NOVARTIS
ONCOLOGY

HLAVNÍ PARTNEŘI

Bristol - Myers Squibb spol. s r.o. / Celgene s.r.o. / GlaxoSmithKline s.r.o. /
Pfizer Inc. / Roche s.r.o.

 **Bristol-Myers Squibb**

Celgene

gsk GlaxoSmithKline

Pfizer

Roche

VÝZNAMNÍ PARTNEŘI

Astellas Pharma s.r.o. / Genzyme Czech s.r.o. / Sysmex CZ s.r.o. / Actavis CZ s.r.o.

 **astellas**
Leading Light for Life

genzyme

sysmex

actavis
creating value in pharmaceuticals

PARTNEŘI

Alexion Pharma International
AOP Orphan Pharmaceuticals AG
Baxter Czech spol. s r.o.
Berlin-Chemie/A.Menarini Česká republika s.r.o.
Bayer s.r.o.
Biohem spol. s r.o.
CaridianBCT
Cephalon Sp z o.o.
Fresenius Medical Care Česká republika spol.s r.o.
Grifols s.r.o.
Hospira Czech Republic s.r.o.
Medista spol.s.r.o.
Medicom International s.r.o.
Merck Sharp & Dohme IDEA, Inc.
Octapharma CZ s.r.o.
Sandoz s.r.o.
Teva Pharmaceuticals ČR s.r.o.
The Binding Site s.r.o.
Ybux s.r.o.

ZA PODPORY



DĚKUJEME

HARMONOGRAM OLOMOUCKÝCH HEMATOLOGICKÝCH DNÍ 2011

	07:00	08:00	09:00	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	17:00	18:00	19:00	20:00	21:00
St / 22. 6.															
M							Celgene 1	Novartis 1	GSK	Amgen 2					
O			Zasedání výboru ČHS												UVÍTACÍ VEČER restaurace Archa Svatý Kopeček
E1							Amgen 1	Pfizer	BMS	Celgene 2	Roche				
Čt / 23. 6.															
S													Org. výbor sjezdu CZ/SK 2012		
M						Koagulace		MRCH			Janssen- Cilag				
O		Cephalon	Podpůrná péče		TDK			MDS / Anemie			Novartis 2				Svatý Mořic Varhanní koncert
E1			M. Hodkín		NHL 1			NHL 2		Wiederman, přednáška					
Pá / 24. 6.							Prezentace posterů s oberstvením - sál E2								
M		Astellas	XV. konference Sesterská sekce 1		XV. konference Sesterská sekce 2			Transfuzní sekce		AL					
O			4th Symposium Leukemia Lymphoma		4th Symposium Regulation and Dysregulation of Hematopoiesis			4 th Symposium Molecular pathogenesis of MM		Laboratorní sekce					GALAVEČER Sportcentrum Omega
E1		Alexion	Edukační sekce MM		MM			XV. Konference Laboratorní sekce 1		XV. Konference Laboratorní sekce 2					
So / 25. 6.															
M			CML/MPN		CML										
E1					CLL										

VYSVĚTLIVKY:
 NH Congress Hotel: O - sál Olomouc, M - sál Madrid, E1 - sál Evropa 1,
 E2 - sál Evropa 2 (posterový), S - salonek restaurace

PODPŮRNÁ PÉČE A INFEKČNÍ KOMPLIKACE

2076.

Normalizovaná EBV nálož u pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk – benigní reaktivace, lokalizovaná a generalizovaná EBV asociovaná lymfoproliferativní nemoc

Hubáček Petr, Mejstříková E., Marková M., Kouba M., Kabíčková E., Hrdličková A., Zajac M., Čapková L., Hornofová L., Keslová P., Cetkovský Petr, Sedláček Petr
(Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha; Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha; Ústav lékařské mikrobiologie, FN Motol, Praha; Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha)

EBV zůstává důležitým patogenem u pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (HSCT). Vedle benigní reaktivace může být EBV příčinou lokalizované či generalizované formy EBV asociované lymfoproliferativní nemoci (EBV-LPD) s klinickými symptomy jako jsou horečka, hepatopatie, symptomy podobé lymfomům a B lymfocytární proliferaci v periferní krvi. Od ledna 2002 do ledna 2011 jsme prospektivně otestovali vzorky plné krve od 277 dětských (8273 vzorků) a od 507 dospělých pacientů (7669 vzorků) po alogenní HSCT. Zároveň jsme testovali malé množství vzorků tkáně a tělních tekutin. Retrospektivně jsme otestovali 50 vzorků od 4 dětí, které zemřeli na EBV-LPD v roce 2000. Kvantita EBV a albuminového genu byla stanovena pomocí RQ-PCR; kvantita EBV byla normalizována na 100000 lidských genomických ekvivalentů. V případě prospektivního testování jsme EBV detekovali v plné krvi 205 dětí (74,0%; 2617 vzorků; medián 89 normalizovaných virových kopií (NVCs) a 311 dospělých (61,3%; 1973 vzorků; medián 80 NVCs). Více jak 1000 NVCs bylo detekováno u 66 dětí a 62 dospělých, více jak 10000 NVCs u 14 dětí a 14 dospělých. Klinické, nebo laboratorní známky EBV-LPD byly pozorovány u 10 dětí a 10 dospělých. Generalizovaná EBV-LPD byla detekována u 7 pacientů, lokalizovaná pak u 13. Úspěšná léčba EBV-LPD pomocí rituximabu byla použita u 9 dětí a 9 dospělých; 10000 NVCs bylo překročeno u všech léčených. U čtyř pacientů se vyvinul EBV+ DLBCL s detekcí 3700-3679000 NVCs v periferní krvi a 847000-2407000 NVCs ve vzorcích tkáně. Žádný z prospektivně testovaných pacientů nezemřel na EBV-LPD. Mezi retrospektivně testovanými pacienty se nejvyšší detekovaná nálož pohybovala mezi 1165000-11060500 NVCs s intervalem první detekce EBV a úmrtí 24-91 dní. EBV je detekována u velké části pacientů po HSCT, více u dětských pacientů. Hranice 10000 NVC se zdá být dobrou hranicí pro terapii a je 100x nižší než nejvyšší kvantita detekovaná u pacientů zemřelých na EBV-LPD. Normalizace se ukázala být užitečným přístupem pro srovnávání EBV nálože v periferní krvi a tkáních. Podpořeno MŠMT 0021620813 a MZ0FMN2005

2075.

Cytomegalovirus disease and resistance to virostatics in children and adult haematopoietic stem cell transplant recipients

Hubáček Petr, Boutolleau D., Deback C., Keslova P., Hrdlickova A., Conan F., Lelabousse B., Zajac M., Markova M., Skapa P., Pohlreich D., Agut H., Sedláček Petr, Cetkovský Petr

(Dept. of Paediatric Haematology and Oncology, 2nd Medical Faculty of Charles University and Motol University Hospital, Prague – CZ; Dept. of Virology, University of Pierre and Marie Curie and Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris – FR; Dept. of Medical Microbiology, Motol University Hospital, Prague – CZ; Institute of Haematology and Blood Transfusion, Prague – CZ; Dept. of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Medical Faculty of Charles University and Motol University Hospital, Prague – CZ)

Despite the improvement of infection monitoring and virostatic treatments, CMV infections remain an important cause of morbidity and mortality in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients (alloHSCT). Our aim was to investigate CMV resistance in paediatric and adult alloHSCT recipients and to clarify the CMV load in whole peripheral blood and target tissue in situation of CMV disease. Between I/2002 and XII/2009, we tested 17,463 whole blood samples from 431 adults (median 22 per patient) and 214 children (median 32 per patient) after alloHSCT. Samples were tested for CMV and albumine quantity by RQ-PCR and results were normalized to 100,000 human genome equivalents. First-line antiviral treatment, usually ganciclovir, was initiated when CMV load exceeded 1,000 normalized viral copies (NVCs), and switched to foscarnet or cidofovir in case of none response. Clinical resistance was suspected after 2 weeks of unsuccessful well-conducted treatment. Resistance was studied using UL97 and UL54 gene sequencing. In the patients deceased in consequence of CMV infection, DNA quantity in the tissue was tested too. Virostatic treatment was started in 142 adults (33%) and 64 (30%) children. In 72 patients (50 adults and 22 children) clinical resistance was observed. Genotypic resistance of CMV was proved in 13 patients (mutation A591V, A594V, L595S, L595F, G598S and del597-599 in UL97 and del981-982, N408K, V715M, P522S, T700A in UL54). Natural polymorphisms and novel mutations of unknown phenotype were proved in both genes too. Despite the virostatic treatment, symptomatic CMV disease was observed in 29 patients. 11 patients deceased in consequence of CMV infection, mainly combined with GvHD. Typical pathological signs of CMV infection and antigen detection in the tissue were observed in 1 patient only. Despite this median of CMV quantity in mainly affected lung tissue was 9,534 NVCs (range 1,029-384,456) while median in the whole blood was only 1,065 NVCs (range 183-89,072). Quantifying of CMV DNA is very useful in the treatment of CMV infection. Unfortunately our observation suggests the limits in case of CMV disease. Genotypic

evidence of CMV resistance proved to be very useful in improvement of therapeutic management of the patients. Further studies are required to ascertain the true nature of the novel mutations described within UL97 and UL54 same as compartmentation of CMV infection. Supported by VZOFNM2005, MSTM0021620813

2008.

Výskyt toxoplazmózy CNS v letech 2005-2010 u pacientů HOK FN Olomouc

Urbanová Renata, Raida Luděk, Turcsányi Peter, Vondráková Jana, Rusiňáková Zuzana, Papajík Tomáš, Indrák Karel (*Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc*)

Úvod: U pacientů s hematologickým onemocněním a imunodeficitem se zvýšeně vyskytují oportunní infekce, včetně infekce *Toxoplasma gondii*. U intenzivně léčených pacientů a dlouhodobých lymfopenií může reaktivace infekce *T. gondii* vyvolat těžký, někdy fatální průběh. Soubor pacientů: Referujeme 8 pacientů s toxoplazmózou CNS. Medián věku byl 44 let (rozmezí 36-52). Zastoupení diagnóz bylo: 2x B chronická lymfatická a 1x T prolymfocytární leukemie, 2x Hodgkinův lymfom, 1x akutní myeloidní leukemie, 1x difuzní velkobuněčný lymfom a 1x imunní trombocytopenie. Pět pacientů podstoupilo alogenní nepřibuzenskou transplantaci kmenových buněk s nemyeloablativním přípravným režimem. Pacient s difuzním velkobuněčným lymfomem byl dlouhodobě lymfocytopenický po vysocedávkované imunochemoterapii a autologní transplantaci, pacient s imunní trombocytopenií na kortikoterapii měl lymfopenii a těžký deficit CD4+ T lymfocytů, pacientka s Hodgkinovým lymfomem byla pět let po ukončení chemo a radioterapie dlouhodobě lymfopenická, všichni byli v remisi hematologického onemocnění. Toxoplazmóza CNS se manifestovala neurologickými a neuropsychiatrickými příznaky, subfebriliemi a příznaky infektu dýchacích cest. U dvou pacientů byla hyponatrémie a hypoosmolarita. Diagnóza byla stanovena na základě klinického obrazu, nálezů na magnetické rezonanci (MR) mozku, PCR testování krve a likvoru na *T.gondii*, serologické pozitivity a na základě odpovědi na podávanou terapii. Pouze v jednom případě jsme přistoupili k biopsii ložiska. U všech pacientů byl pozitivní, nález na MR mozku, z toho ve 3 případech byl popsán typický obraz ložisek s prstenčitým lemem. PCR pozitivita na *T. gondii* byla prokázána u 3 pacientů z krve a u 2 pacientů z likvoru, pozitivní serologický průkaz protilátek a/nebo pozitivita komplement fixační reakce byl u 4 pacientů. 7 pacientů podstoupilo kombinovanou antibiotickou terapii obsahující pyrimetamin, klindamycin a kotrimoxazol. U všech došlo po terapii k úpravě klinického stavu, jeden pacient zemřel před zahájením terapie. U 2 pacientů jsme zaznamenali recidivu onemocnění s dobrou odpovědí na znovu podanou terapii, jeden pacient je vzhledem k trvajícím imunodeficitu na antibiotické sekundární profylaxi. Závěr: Na mozkovou toxoplazmózu by mělo být pomysleno u kaž-

dého pacienta s hlubokým imunodeficitem při fokálním neurologickém nálezů. Diagnostika je obtížná, úspěšná empirická antibiotická terapie se považuje za potvrzení diagnózy.

2005.

Empirická a preemtivní antimykotická terapie mikafunginom u hematoonkologických pacientů

Tošková Martina, Ráčil Zdeněk, Winterová Jana, Weinbergerová Barbora, Rolencová Monika, Mayer Jiří (*Interní hematoonkologická klinika, FN a LF MU, Brno*)

Úvod: Mikafungin je antimykotikum ze skupiny echinokandínů, které se používá na léčbu a profylaxii kandidových infekcí. V literatuře sa dôkazy o účinnosti a bezpečnosti mikafunginu v liečbe hematologických pac. objavujú čoraz častejšie. Metódy: Retrospektívna analýza pac. liečených mikafunginom s cieľom zhodnotiť účinnosť a bezpečnosť mikafunginu. Pac. boli zaradení do analýzy, ak sa jednalo o empirickú alebo preemtivnú liečbu a ak dĺžka liečby bola ≥ 5 dní. Empirická liečba bola definovaná ako liečba u pac. s febrilnou neutropéniou nereagujúcou na 48-72hod. Podávané širokospektrálne antibiotiká a pac. okrem teplôt nemal klinicky alebo mikrobiologicky definovaný fokus infekcie. O preemtivnú liečbu sa jednalo vtedy, ak bola infekcia dokumentovaná klinicky alebo zobrazovacou metódou (napr. infiltrácia pľúc na HRCT alebo kolitída podľa USG), ale neboli žiadne mikrobiologické záchyty (vrátane nekultivačných metód). Výsledky: V období od 1/1/2010 do 31/12/2010 sme mikafunginom liečili 54 pac. s hematologickou malignitou s mediánom veku 51 r. 90% pac. malo v dobe liečby mikafunginom aktívnu chorobu, 15% pac. bolo po alogénnej transplantácii. 31% bolo liečených empiricky, 69% preemtivne. 81% (44/54) pac. bolo v dobe liečby neutropenických (Neu < $1,0 \times 10^9/l$). 78% (42/54) zareagovalo na podanie mikafunginu ústupom teplot, poklesom CRP a zlepšením klinického stavu, 20% (11/54) pac. na mikafungin nezareagovalo, 2% (1/54) neboli hodnotiteľné. Všetci pac. dostávali mikafungin v dávke 100mg 1x denne, bez nutnosti redukcie, u žiadneho pac. nebolo nutné prerušenie liečby pre NÚ. U 2 pac. (4%) došlo behom liečby k vzostupu kreatinínu z normy na stupeň 1 (podľa CTCAE 4.0), avšak pri podávaní konkomitantnej nefrotoxickej medikácie, u ostatných pac. sa kreatinín behom liečby mikafunginom nezmenil. U 3 pac. došlo behom liečby k vzostupu bilirubínu (o 1-2 st.), ale etiologicky sa jednalo 1x o hepatopatiu po asparagináze, 1x o progresiu choroby a 1x o multiorgánové zlyhanie. U 4 pac. (8%) bol pozorovaný vzostup pečeneových testov (ALT, AST, GGT alebo ALP) o 2 st., etiologicky súvisiaci s mikafunginom, u 1 pac. elevácia pretrvávala i po ukončení liečby. V súbore bolo 1 úmrtie v súvislosti s infekciou. Závěr: Naše výsledky ukazujú, že použitie empirického a preemtivného mikafunginu u hematoonkologických pacientů je účinné a bezpečné.

1895.

Chromozomálně integrovaný HHV-6 u zdravých dárců a pacientů s hematologickou malignitou

Hubáček Petr, Hrdličková Alena, Mužíková Kateřina, Zajac Miroslav, Špaček Martin, Kouba Michal, Sedláček Petr, Kozák Tomáš, Cetkovský Petr, Starý Jan
(*Klinika dětské hematologie a onkologie a Ústav lékařské mikrobiologie 2. LFUK a FN Motol, Praha; Ústav lékařské mikrobiologie FN Motol, Praha; Oddělení klinické hematologie 3. LFUK a FN Královské Vinohrady, Praha; Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha*)

Chromozomální integrace šestého lidského herpesviru (CHI-HHV-6) je varianta výskytu HHV-6 při které se HHV-6 DNA integruje do telomerických oblastí chromozómů a šíří se dál vertikálním přenosem z rodiče na potomka. Virová DNA je tedy přítomna ve všech buňkách organismu a poměr lidské a virové DNA je 1:1. Aktivní infekce s tvorbou nových virových partikulí zatím nebyla u CHI-HHV-6 prokázána. Cílem naší studie bylo otestovat výskyt CHI-HHV-6 na vzorcích DNA od celkem 1019 pacientů léčených pro hematologické malignity (ALL,AML,HL) v centrech ČR v letech 1995-2010. K určení frekvence v běžné populaci jsme otestovali vzorky DNA od 420 zdravých dárců. Zároveň jsme chtěli porovnat hladiny IgG a IgM protilátek u 148 nosičů CI-HHV6 a pacientů při diagnóze maligního onemocnění. Vzorky DNA pacientů určených původně ke stanovování MRD, či k přítomnosti virové DNA jsme otestovali na přítomnost HHV-6 pomocí RQ-PCR a virovou nálož normalizovali na 10 000 lidských genomických ekvivalentů. CI-HHV-6 u vysoce pozitivních pacientů jsme pak konfirmovali detekcí HHV-6 z nehtů. Nehty byly použity také pro screening dárců z běžné populace, CI-HHV-6 byla konfirmována testem vzorku krve. DNA byla izolována pomocí Qiagen DNA Blood Mini Kitů a Qiagen DNA Micro Kitů. Kvantita protilátek byla testována pomocí ELISA kitů firmy PanBio. CI-HHV-6 byla detekována u 13 pacientů (1,3%) a u 5 zdravých dárců (1,2%). U CI-HHV-6 jsme provedli rodinné studie, kde jsme potvrdili vertikální přenos virové DNA. U pacientů i zdravých dárců jsme detekovali obě varianty viru A (9+3) i B (4+2). U několika pacientů s CI-HHV-6-A následně léčených cytostatiky jsme prokázali také reaktivaci běžné HHV-6-B infekce. U žádného z pacientů léčených pro maligní onemocnění nebyly pozorovány komplikace, které by mohl způsobovat HHV-6. Tři pacienti prodělali také alogenní HSCT a jeden pacient byl ve sledovaném období transplantován dárce s CI-HHV-6. U žádného z léčených nebyly pozorovány HHV-6 komplikace. V hladinách protilátek proti HHV-6 jsme nedetekovali zásadní rozdíl mezi lidmi s CI-HHV-6 a bez něj. Shodné frekvence výskytu nenaznačují jakákoli rizika CI-HHV-6 pro vznik hematologických malignit; stejně protilátkový profil a detekce běžné HHV-6-B reaktivity také CI-HHV-6 nosiče neodlišují od běžné populace. Z klinického hlediska je tak tento stav s vysokou pozitivitou HHV-6 DNA pro pacienta nebezpečný pouze potenciálně zbytečnou léčbou viros-

tatiky s jejich nežádoucími účinky. Podpořeno IGA MZ ČR NS 9907-4.

1864.

FIND - „Fungal infection database“ - retrospective analysis of invasive aspergillosis in haematological departments in Czech and Slovak Republic between 2001-2009

Weinbergerová Barbora, Ráčil Zdeněk, Drgoňa Luboš, Kocmanová Iva, Haber Jan, Mallátová Naďa, Kouba Michal, Vydra Jan, Múdry Petr, Guman Tomáš, Sejnová Daniela, Bojtárová Eva, Žiaková Barbora, Forsterová Kristína, Masárová Lucia, Smrčková Alena, Foralová Renata, Tóthová Elena, Ševčíková Eva, Mayer Jiří, Cetkovský Petr
(*Interní hematologická klinika, MU a FN, Brno; II. onkologická klinika LF UK a Oddelenie klinickej hematológie, Národný onkologický ústav, Bratislava – SK; Oddělení klinické mikrobiologie, FN, Brno; I. interní klinika – klinika hematologie, Všeobecná fakultní nemocnice, Praha; Laboratoř parazitologie a mykologie, Nemocnice, České Budějovice; Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha; Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha; Klinika dětské onkologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno; Klinika hematologie a onkohematologie, Univerzitná nemocnica L. Pasteura, Košice – SK; Klinika detskej hematológie a onkológie, Detská fakultná nemocnica s poliklinikou, Bratislava – SK; Klinika hematologie a transfúziologie, Nemocnica sv. Cyrila a Metoda, Univerzitná nemocnica, Bratislava – SK; Dětské oddělení, Nemocnice, České Budějovice*)

Background: „Fungal infection database“ (FIND) represents international database of invasive fungal infections in Czech and Slovak haematological departments. FIND - aspergillus covers all case of invasive aspergillosis (IA) in participating centers since 2001. Methods: The goal of our retrospective analysis was to evaluate incidence, early diagnostic procedures and effect of antifungal therapy in proven and probable IA that occurred in 9 institutions participating in FIND database between 2001-2009. We followed EORTC/MSG 2002 criteria in evaluation of IA diagnosis and therapy response. Results: 162 probable and 36 proven IA (91% isolated pulmonary IA, IPA) have been documented. Prolonged and profound neutropenia (63%) and long-term use of corticosteroids (31%) were identified as the major risk factors of IA. 161 cases (89%) had abnormality on pulmonary CT, however with non-specific infiltrates as the most frequent finding (49%). 74% pts. had consecutive positivity of serum-galactomannan (S-GM) (OD index > 0.5). Primary mold active antifungal prophylaxis was used in 23% pts. - 13% itraconazole, 4% voriconazole (VORI), 3% posaconazole and 3% others. Empiric antifungal therapy was used in 43% pts. with median of 5 days of administration before IA diagnosis (range: 2-44 days) - amphotericine B deoxycholate (C-AMB) was used in 31% of

patients with empirical antifungal therapy, lipid-based AMB (LBA) in 24%, VORI in 18% and echinocandins (ECHINO) in 15%, respectively. The primary antifungal therapy of IA represents: in 38% of cases VORI, in 6% ECHINO, in 26% VORI+ECHINO, in 11% C-AMB and in 8% LBA. Overall RR to primary therapy of IA was 62% - VORI 62%, VORI+ECHINO 60%, C-AMB 32%, LBA 53%, ECHINO 20%. There was a statistically significant difference in overall RR to targeted therapy in pts. with neutrophil count $< 0,1$ and $> 1,0 \times 10^9/l$ at the end of therapy (21% vs. 71%). The overall mortality rate was 57%, with 42% attributable to IA. Conclusions: On the basis of our analysis we confirm typical risk factors for IA and critical role of S-GM and CT for early diagnosis and prompt start of antifungal therapy of IA. A reasonable treatment response was achieved using VORI, VORI+ECHINO or LBA in primary therapy of IA. We have confirmed neutropenia at the end of antifungal therapy as the major predictive factor for therapeutic response. On behalf of CELL - The Czech leukemia study group for life. NS10441-3/2009 NS10442-3/2009

HODGKINŮV LYMFOM

2019.

Snížení dávkové denzity cytostatik v chemoterapeutických protokolech primární léčby neovlivňuje prognózu nemocných s Hodgkinovým lymfomem

Raida Luděk, Papajík Tomáš, Rusiňáková Zuzana, Procházka Vít, Kubová Zuzana, Sztokowski Tomáš, Urbanová Renáta, Vondráková Jana, Hluší Antonín, Procházková Jana, Faber Edgar, Rohoň Peter, Sičová Kateřina, Indrák Karel, Langová Kateřina

(HOK FN, Olomouc; Katedra biofyziky LF UP, Olomouc)

Úvod: Dávková denzita cytostatik aplikovaných v chemoterapeutických protokolech primární léčby Hodgkinova lymfomu (HL) je považována za jeden z faktorů ovlivňujících dosažení kompletní remise (KR) choroby a riziko jejího relapsu. Snížení dávkové denzity je většinou způsobeno prodloužením intervalu mezi plánovanými aplikacemi chemoterapie oproti původnímu protokolárnímu harmonogramu. Cíl studie: U nemocných s HL porovnat dosažení KR, výskyt relapsů a úmrtí, pravděpodobnost přežití bez nežádoucí události (EFS) a celkového přežití (OS) v závislosti na dodržení dávkové denzity cytostatik (harmonogramu chemoterapie) v primární léčbě. Soubor nemocných: Byla analyzována data 194 nemocných s mediánem sledování 8 (1-17) let. Chemoterapeutický protokol byl dodržen dle časového harmonogramu u 107 (55%) nemocných. K prodloužení došlo u 87 (45%) pacientů, v mediánu o 12 (4-134) % oproti původně plánované aplikaci. Obě skupiny se nelišily v zastoupení pohlaví, věku, histologickém typu a klinickém stádiu HL, manifestaci B symptomů, uzlinovém „bulk“, sedimentaci erytrocytů, hladině albuminu, počtu leukocytů, chemoterapeutických protokolech a aplikaci radioterapie v pri-

mární léčbě. U pacientů s následným prodloužením harmonogramu chemoterapie byla vstupně zaznamenána signifikantně nižší hladina hemoglobinu ($P=0,018$) a nižší absolutní počet lymfocytů ($P=0,04$). Výsledky: Mezi oběma skupinami nemocných nebyl prokázán signifikantní rozdíl v počtu KR (92% vs. 90%; $P=0,8$), relapsů HL (20% vs. 24%; $P=0,59$) a úmrtí (9% vs. 15%; $P=0,27$). Pravděpodobné průměry EFS se v obou skupinách statisticky nelišily (12 /95% CI 11-13/ vs. 11 /95% CI 10-13/ let; $P=0,35$). Rozdíl nebyl prokázán ani v průměrném OS (15 /95% CI 14-16/ vs. 14 /95% CI 13-15/ let; $P=0,52$). Závěr: Tato analýza nepotvrdila prognostický vliv snížení dávkové denzity cytostatik (při zachování jejich celkové dávky) aplikovaných v chemoterapeutických protokolech primární léčby HL. Podpořeno Výzkumným záměrem MŠMT MSM-6198959205, grantem LF-2011-006 UP v Olomouci a projektem CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

1983.

Kombinace čtyř cyklů eskalovaný BEACOPP a čtyř cyklů bazální BEACOPP v léčbě pokročilého stádia Hodgkinova lymfomu – retrospektivní analýza jednoho centra

Štěpánková Pavla, Belada David, Sýkorová Alice, Malý Jaroslav

(II. interní klinika – oddělení klinické hematologie, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice, Hradec Králové)

Úvod: Ve studii HD-12 srovnává German Hodgkin Study Group deeskalovanou léčbu pokročilého stádia Hodgkinova lymfomu (HL) 4 cykly eskalovaný a 4 cykly bazální BEACOPP se standardně používanými 8 cykly eskalovaný BEACOPP. V následující analýze hodnotíme efekt a toxicitu tohoto nového schématu používaného na našem pracovišti od r. 2001. Pacienti a metody: V letech 2001-2010 byl deeskalovaný léčebný postup zvolen u 78 pacientů (p.) mladších 50 let s nově diagnostikovaným HL v pokročilém stádiu. Stádium II/III/IV bylo zastoupeno u 12/32/18 pacientů. Do závěrečného hodnocení jsme zařadili 62 nemocných (medián věku 31 let) s minimální dobou sledování 12 měsíců od ukončení léčby. Sledovali jsme léčebný efekt, dobu trvání remise a časovou toxicitu léčby. Léčebná odpověď byla hodnocena dle Chesonových kritérií (2007) Výsledky: Celkem 59 (95%) pacientů dosáhlo kompletní remise. Jeden pacient zemřel v průběhu léčby, u 1 jsme zaznamenali progresi při léčbě, u 1 stabilní onemocnění. Radioterapií bylo léčeno 10 pacientů s reziduální PET pozitivitou. U 3 pacientů došlo k relapsu onemocnění 13/22/22 měsíců od zahájení terapie. Relaps či progresse se tedy objevily celkem u 5 (8%) pacientů. Při mediánu sledování 59,5 měsíce po ukončení léčby je FFTF 92%, celkové přežití 93%. Plánovaných 8 cyklů léčby dokončilo 54 pacientů (87%). U 5 pacientů byla léčba předčasně ukončena pro závažné komplikace, u dvou pro nespolehlivost. Dominujícím nežádoucím účinkem byla hematotoxicita. Anemii st. 3-4 jsme zaznamenali u 26 p. (42%), neutropenii st. 3-4 u 55 p. (89%),

trombocytopenii st. 3-4 u 23 p. (37%). Podpůrná léčba G-CSF i při bazálních BEACOPP byla nutná u 41 (66%) p., 9 pacientů bylo hospitalizováno pro febrilní neutropenii. Nejčastější nehematologické nežádoucí účinky tvořily: periferní neuropatie, hluboká žilní trombóza, pneumonitida, pneumonie infekční etiologie, osteoporóza s patologickou frakturou, herpes zoster. Po skončení léčby byla u jednoho pacienta diagnostikována sekundární malignita, u jednoho myelodysplastický syndrom. Akutní leukemie se ve sledovaném souboru nemocných nevyskytla. Závěr: Kombinovaný léčebný režim eskalovaného a bazálního BEACOPP se zdá být velmi účinný s akceptovatelnou akutní toxicitou a velmi slibnou efektivitou. K hodnocení pozdní toxicity a dlouhodobého efektu bude nutné delší sledování. Podpořeno grantem: MZ CR MZO 00179906

1889.

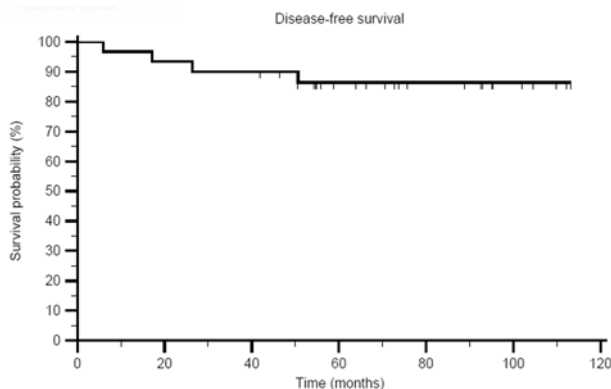
Intenzifikovaná terapie eskalovaný BEACOPP + ABVD s následnou radioterapií oproti režimu ABVD s následnou radioterapií u pacientů s intermediárním stadiem Hodgkinova lymfomu (HL):

zkušenosti centra

Sýkorová Alice, Štěpánková Pavla, Belada David, Malý Jaroslav

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

Východiska: Intenzifikovaná léčba 2x eskalovaný BEACOPP (eBEACOPP)+2xABVD+radioterapie (RT) 20Gy involved field (IF) je podle výsledků studie HD14 německé skupiny German Hodgkin Study Group (GHSG) novým standardem pro mladší nemocné (<60 let) s intermediárním stadiem HL. Režimem 2xeBEACOPP+2xABVD+RTIF léčíme nemocné standardně od r. 2007. První zkušenost s režimem má naše centrum z r. 2004. Do r. 2006 byli nemocní léčeni režimem ABVD+RTIF, pouze někteří pacienti s masivním mediastinálním tumorem a extranodálním postižením byli léčeni eBEACOPP+ABVD+RTIF. Cíl: Zhodnocení efektu, toxicity terapie eBEACOPP+ABVD+RTIF oproti ABVD+RTIF. Kalkulace dávkové intenzity eBEACOPP+ABVD. Pacienti a metody: V letech 2001-2010 jsme léčili 51 mladších pacientů (p) s intermediárním stadiem HL definovaným dle



GHSG. 30p bylo léčeno ABVD, u 29p následovala RTIF 30Gy či 36Gy; 21p bylo léčeno režimem 2xeBEACOPP+2xABVD+RTIF 30Gy či 20Gy. Léčebná odpověď byla hodnocena dle kritérií p. Cheson (2007). Průběh pravděpodobností přežití (DFS) byl hodnocen dle metody Kaplan-Meiera. Celková relativní intenzita dávky (TRDI, %) u režimu eBEACOPP+ABVD byla hodnocena pomocí protokolů intenzity dávky projektu DIOS® (Dose Intensity As Oncology Standard). Podpora G-CSF byla u eBEACOPP použita obligatorně od 9. dne, u ABVD fakultativně. Výsledky: Medián věku pacientů byl 31 let (19-59). Klinické stadium II/IIIE/IIIS dle Ann Arbor klasifikace bylo u eBEACOPP+ABVD 17/2/2, stadium I/II/IIIE u ABVD 4/25/1. Léčbou bylo dosaženo 50 kompletních remisí a 1 parciální remise. Medián počtu cyklů ABVD byl 5 (4-6). Medián sledování celého souboru je 65 měsíců(m) /ABVD 80m (31-123), eBEACOPP+ABVD 20m (6-76)/. Po režimu ABVD je 5-leté přežití bez relapsu 85%, 1p zemřel. Po ABVD+RTIF jsme zaznamenali 1 sekundární malignitu, 12p je léčeno pro hypothyreózu. Po terapii eBEACOPP+ABVD zatím k relapsu nedošlo, nikdo nezemřel, 3p mají hypothyreózu. TRDI byla 97.3% (88-104) pro 2xeBEACOPP a 93% (78-103) pro 2xABVD. U režimu eBEACOPP+ABVD byla nejčastějším nežádoucím účinkem myelotoxicita, 18p (85%) potřebovalo G-CSF podporu i během ABVD. Závěr: Naše data podporují vysokou účinnost kombinované terapie eBEACOPP+ABVD+RTIF, delší sledování umožní porovnat přežití (PFS, OS, DFS) oproti ABVD. Léčba je spojena s vysokou, ale zvladatelnou myelotoxicitou, proto podpora G-CSF se jeví racionální jako prevence infekce a především pro udržení dávkové intenzity režimu. Pozdní účinky bude možné hodnotit až s odstupem času.

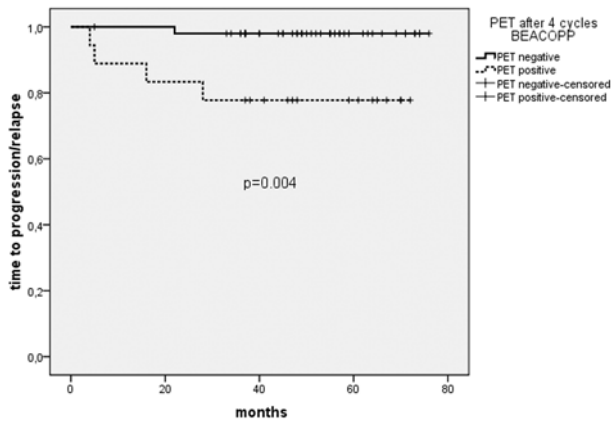
1887.

Response Assessment after 4 Cycles of BEACOPP using FDG-PET in Patients with Advanced-Stage Hodgkin Lymphoma

Marková Jana, Kobe Carsten, Skopalová M., Dědečková K., Móciková Heidi, Klásková K., Kahraman D., Dietlein M., Kozák Tomáš

(*Department of Clinical Hematology, University Hospital Kralovske Vinohrady, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague – CZ; Department of Nuclear Medicine, University of Cologne, 50924 Cologne – Germany; (Department of Nuclear Medicine, PET Center, Na Homolce Hospital, Prague – CZ; Institute of Radiation Oncology, University Hospital Na Bulovce, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague – CZ)*

Background: Positron emission tomography (PET) has been proven to be a powerful prognostic marker during the treatment of Hodgkin lymphoma with ABVD. Here, we analysed the prognostic value of PET after 4 cycles of BEACOPP in patients with advanced-stage Hodgkin lymphoma. Patients and methods: Between January 2004



and February 2008, 69 patients with newly diagnosed HL in clinical stages IIB with large mediastinal mass or extranodal disease, III and IV were treated in or according to the HD15 protocol of the German Hodgkin Study Group. In addition to the protocol of the HD15 trial all patients received a PET scan after 4 cycles of BEACOPP (PET-4) in the treatment consistent of 6-8 cycles of BEACOPP. Results: Of the overall group (n=69), 18 patients had a positive PET-4 while 51 had a negative PET-4. At a median observation time of 55 months, 4 of the 18 patients with a positive PET-4 had progressed or relapsed, while there was one relapse in the group of PET-4 negative patients. The negative predictive value of PET-4 was 98%; the positive predictive value of PET-4 was 22%. There was a significant arm difference between PET-4 negative and positive patients concerning the time to progression or relapse starting from the point of diagnosis ($p=0.004$). Conclusion: The results of the present analysis underline the clinical impact of PET-4 scan in advanced-stage Hodgkin lymphoma. A negative PET-4 scan has a high negative predictive value and predicts a significant longer non-progression than PET-4 positive patients.

1865.

Autologní transplantace periferních kmenových buněk u pacientů s relapsem nodulární lymfocytární predominance Hodgkinova lymfomu

Mócičková Heidi, Michalka Jozef, Štěpánková Pavla, Ráida Luděk, Wild Alexander, Vozobulová Věra, Král Zdeněk, Belada David, Marková Jana, Mayer Jiří, Indrák Karel, Koza Vladimír, Kozák Tomáš

(Oddělení klinické hematologie, FN Královské Vinohrady, Praha; Interní hematologická klinika FN, Brno; Klinika hematologie FN, Hradec Králové; Hematologická klinika FN, Olomouc; Hematologické oddělení, Rooseveltova nemocnice, Banská Bystrica – SK; Olomouc, Hematologické oddělení FN, Plzeň)

Východiska: Role autologní transplantace kmenových buněk (ASCT) u pacientů s relapsem nodulární lymfocytární predominance Hodgkinova lymfomu (NLPHL) po zavedení léčby rituximabem v kombinaci s chemoterapií není jasná. Cílem studie bylo porovnat celkové přežití paci-

entů s relapsem NLPHL léčených s nebo bez ASCT. Pacienti a metody: 17 pacientů (12 s relapsem NLPHL a 5 s transformací NLPHL do difuzního velkobuněčného B-buněčného lymfomu [DLBCL]) bylo léčeno konvenční chemoterapií a/nebo rituximabem a 7 z nich dostalo chemoterapii BEAM (karmustin, etoposid, cytarabin, melfalan) s ASCT. Skupiny s a bez ASCT byly srovnatelné z hlediska pohlaví, věku, klinického stádia, počtu pacientů transformovaných do DLBCL, počtu relapsů a počtu linií léčby. Více cyklů rituximabu bylo podáno ve skupině bez ASCT ($p=0,035$). Výsledky: Medián sledování 17 pacientů od diagnózy byl 8 let. Ze 17 pacientů 15 žije v kompletní remisi a 2 transplantovaní pacienti s transformací NLPHL do DLBCL zemřeli: 1 po úrazu břicha a 1 v důsledku potransplantačních komplikací. 5leté přežití bez progresu po ASCT bylo 60%. 10leté celkové přežití celé skupiny od diagnózy bylo 85,7%. Rozdíl mezi 10letým celkovým přežitím od diagnózy ve skupině s a bez ASCT nebylo signifikantní ($p=0,302$). Rozdíl v 5letém celkovém přežití od poslední konvenční terapie ve srovnání s ASCT nebylo signifikantní ($p=0,527$). Závěry: Nejistili jsme významný rozdíl v celkovém přežití ve skupině léčené ASCT ve srovnání s konvenční chemoterapií včetně rituximabu u opakovaných relapsů NLPHL. ASCT je možné použít u těchto pacientů, i když relapsy se objevují i po ASCT.

1952.

Stromální buňky chrání maligní B-lymfocyty před rituximabem indukovanou apoptózou a inhibicí integrinu alfa-4-beta-1 (VLA-4) umožňuje překonat tuto rezistenci

Mráz Marek, Zent S. Clive, Church K. Amy, Jelinek F. Diane, Mayer Jiří, Pospíšilová Šárka, Ansell M. Steven, Novak J. Anne, Witzig E. Thomas, Nowakowski S. Grzegorz (Div. of Hematology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota – USA; Interní hematologická klinika FN, Brno; CEITEC a Lékařská fakulta MU, Brno; Immunology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota – USA)

V nedávné době byla popsána důležitá úloha podpůrných buněk v kostní dřeni a lymfatických uzlinách pro přežívání maligních B-lymfocytů a rezistenci k chemoterapii (Burger et al., 2009). Zatím nebyla studována úloha stromálních buněk v rezistenci k monoklonálním protilátkám. Přítomnost reziduálních nádorových buněk po chemo-immunoterapii je příčinou relapsu onemocnění a těžko dosažitelné vyléčitelnosti B-buněčných lymfomů. Cílem práce byla charakterizace vztahu interakce maligních B-buněk lymfomů se stromatem a jejich vliv na chemo-immunoterapii in vitro modelu. Specificky byla studována povaha rezistence k monoklonální protilátce rituximab (anti-CD20). Zároveň jsme předpokládali, že inhibicí adhezivních molekul B-lymfocytů bude možné překonat rezistenci způsobenou stromálními buňkami. Zavedli jsme ko-kultivační model stromálních buněk kostní dřeni (HS-5) a maligních B lymfocytů (10 lymfomových buněčných linií a primární vzorky), který umožnil studium jejich interakce. Maligní lymfocyty by-

ly v ko-kultivaci s HS-5 vystaveny působení rituximabu (10ug/ml) a různým koncentracím fludarabinu (F-ara-A; 1-32uM) a doxorubicinu (10-300ng/ml). Viabilita buněk byla měřena pomocí barvení Annexin V/PI na populaci CD19+ lymfocytů. Na tomto modelu jsme poprvé objasnili úlohu stromálních buněk v rezistenci k rituximabu a byl popsán fenomén označený jako CAM-AR (cell adhesion-mediated antibody resistance). Jako potenciální cíl pro překonání rezistence způsobené stromatem byl vytipován integrin alfa-4-beta-1, který zprostředkovává adhezi B lymfocytů v lymfatických uzlinách a kostní dřeni. Prokázali jsme, že tato molekula je silně exprimována na většině buněk B-buněčných lymfomů a také u agresivních případů CLL. Testovaná monoklonální protilátka natalizumab cílená proti této molekule se ukázala být velmi účinnou v in vitro experimentech. Aplikace natalizumabu vedla k inhibici adheze B-lymfocytů z 75-95% a buňky také ztratili morfologii spojenou s adhezí. Natalizumab byl schopen přerušit stromatem zprostředkovanou protekci před rituximabem nebo cytostatiky z 30-70%. Potenciální výhodou natalizumabu je jeho relativně snadná dostupnost pro klinické studie, neboť je již využíván v terapii nemaligních onemocnění (Crohnova choroba, roztroušená skleróza). Na základě získaných výsledků byla popsána úloha stromálních buněk v rezistenci na rituximab a důležitost inhibice integrinu alfa-4-beta-1 pro její překonání. Podpořeno IGA MZ ČR NT11218-6/2010 a MŠMT MSM0011611430.

HEMOSTÁZA

2089.

Clotting made easy - The contribution of thrombin generation to the understanding and diagnosis of thrombotic and haemorrhagic disease

Hemker H. Coenraad

(Maastricht University, Maastricht – NL)

Since we introduced an easy way to measure thrombin generation (TG) in large series of samples (Hemker, Giesen, Al Dieri, Regnault, de Smedt, Wagenvoort, Lecompte, Beguin. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33: 4-15) a large number of papers has appeared that allow one simple conclusion: Haemostasis and thrombosis are directly dependent upon the amount of thrombin formed in clotting blood(plasma) rather than on the time that it takes before thrombin appears - i.e. the clotting time. This can be summarised in the first law of haemostasis and thrombosis: The more thrombin the less bleeding but the more thrombosis; the less thrombin the less thrombosis but the more bleeding. Unlike clotting times, TG is capable to detect a thrombotic tendency. Unlike clotting times TG is sensitive to all forms of antithrombotic treatment alike and also quantifies mixed treatment. TG shows that there is a wide variation of response to a standard dose of any type of anticoagulant, so that it appears unlikely that it is safe to administer anticoagulants in standard do-

ses. TG can be used to tailor prophylaxis and treatment in haemophiliacs, by substitution therapy as well as by factor VIII bypassing therapy. Doing TG experiments under different conditions, such as adding thrombomodulin, allow refined diagnosis of congenital (e.g. factor VLeiden) or acquired (e.g. oral contraceptives) thrombotic conditions. The concept of thrombin generation makes it possible for the non-specialist to estimate the function of the coagulation system in a simple manner and thus facilitates the understanding of this knotty chapter of medicine.

2006.

Naše zkušenosti s tromboembolickou chorobou u adolescentních dívek

Pospíšilová Dagmar, Ludíková Barbora, Novák Zbyněk, Sulovská Lucie, Stejskalová Ivana, Michálková Kamila (*Dětská klinika Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice, Olomouc; Radiologická klinika Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice, Olomouc*)

Úvod: Incidence tromboembolické nemoci (TEN) u dětí v posledních letech výrazně narůstá a je příčinou významné morbidity a mortality, hlavně při pozdním stanovení diagnózy. Cílem práce je analyzovat rizikové faktory TEN ve skupině adolescentních dívek léčených na pediatrickém klinickém pracovišti v letech 2005-2009. Pacienti a metody: Ve sledovaném období bylo pro TEN léčeno 10 dívek ve věku 15 -18 let (medián 16,5 let). Byly podrobně analyzovány údaje získané z rodinné a osobní anamnézy. U všech pacientek byla provedena následující vyšetření: hladina proteinu C, S, AT III, vyšetření Leidenské mutace (G1691A), mutace genu kódujícího protrombin (G20210A) a mutace genu kódujícího methylenetetrahydrofolát-reduktázu (C677T) s vyšetřením hladiny homocysteinu. Výsledky Všechny pacientky souboru užívaly hormonální antikoncepci (HAK). Devět pacientek mělo pozitivní rodinnou anamnézu TEN, pouze jedna z nich však byla na tyto údaje dotazována před nasazením HAK. U této pacientky bylo provedeno vyšetření trombofilního rizika v rámci rodinné studie s nálezem deficitu proteinu S, dívka však byla nedostatečně informována ošetřujícím gynekologem. U 6 dívek bylo až v rámci hospitalizace pro TEN zjištěno vrozené trombofilní riziko (5xLeidenská mutace, 1x deficit proteinu S). U pěti pacientek byl zjištěn další získaný rizikový faktor (kouření, nadváha, infekce, imobilizace, podávání kortikoidů). Ve všech případech byla TEN léčena nízkomolekulárním heparinem s následným nasazením Warfarinu. U jedné pacientky byla použita trombolýza. U 5 pacientek došlo ke kompletní rekanalizaci trombolýzy. Závěr: Všechny pacientky s TEN ve vyšetřeném souboru užívaly HAK, u všech bylo navíc zjištěno nejméně jedno vrozené nebo získané trombofilní riziko. V pediatrii je v posledních letech patrný trend nadužívání HAK z různých důvodů (bolesti při menstruačním krvácení, problémy s pletí a j.). Rodiče nejsou vždy o podávání HAK u svých adolescentních dcer informováni. Analýza výše uvedeného souboru jasně

ukazuje, že před nasazením HAK není vždy odebrána cílená anamnéza se zaměřením na výskyt TEN v rodině. Proto je nezbytně nutná lepší komunikace a spolupráce mezi gynekology, praktickými pediatry a dětskými hematology. Před nasazením HAK by měla být analyzována vrozená i získaná rizika vzniku TEN a adolescentní dívky by měly být podrobně poučeny o reálném riziku vzniku TEN. Včasná diagnostika a léčba TEN může zabránit trvalým následkům. Podporováno Výzkumným záměrem MSM 6198959205.

1998.

Frekvence trombofilních genetických variant v české populaci

Koudová Monika, Vlčková Romana, Bittóová Martina, Majer Michal, Slepíčková Ilona, Lavická Eva, Hlaváčová Monika, Izrael Gergely, Indráková Vanda, Karas Jan, Kohlíková Eva
(GHC GENETICS, s.r.o.- NZZ, Praha; FTVS UK, Praha)

Úvod: Genetické dispozice pro trombózu zahrnují mutace a genetické varianty v genech, které narušují rovnováhu v tvorbě a rozpouštění trombu nebo zvyšují hladinu homocysteinu v krvi. Metodika: Celkem bylo vyšetřeno 800 žen a 800 mužů české populace, průměrný věk testovaných osob byl 39,9 let. Materiál pro izolaci DNA byl získán stěrem sliznice dutiny ústní nebo odběrem periferní nesrážlivé žilní krve. DNA byla izolována použitím separačních kolonek Qiagen pomocí kytu QIAmp DNA Minikit a analyzována použitím následujících metod pro molekulárně genetickou analýzu: PCR-ARMS s následnou gelovou elektroforézou na 3% agaróze a vizualizací zařízením UV/kamera, Real-Time PCR, fragmentační analýza na genetickém analyzátoru ABI 3130, High Resolution Melting Analysis na přístroji LightScanner a metodou DNA Microarray (GoldenGate Genotyping Assay) na přístroji BeadStation 500G. Byly testovány tyto mutace/genetické varianty: Leiden (G1691A) genu F5, G20210A genu F2, C677T a A1298C genu MTHFR, 4G/5G genu PAI-1, c.196C>T genu ITGB3 (HPA1), C10034T genu FGG, g.1253198C>A a g.1249535C>T genu F7. Statisticky byly vyhodnoceny frekvence jednotlivých alel a genotypů, které byly srovnány s údaji evropské populace. Současně byly výsledky korelovány s anamnestickými údaji z osobní a rodinné anamnézy. Výsledky: Frekvence výskytu jednotlivých alel v genech regulujících hemostázu korelovala s daty evropské populace. Závažné trombofilní mutace (mutace Leiden genu F5 a mutace G20210A F2) byly celkem prokázány v 10,12% u žen a v 11,3% u mužů. Z těchto geneticky rizikových jedinců by na základě anamnestických dat až 80% nesplňovalo doporučená klinická kritéria pro genetické testování, přičemž u 1/2 z nich byly současně zjištěny zevní rizikové faktory pro vznik trombózy a jsou tedy významně rizikové pro rozvoj TEN. V genu MTHFR byla trojkombinace rizikových alel 677T a 1298C (genotypy TT/AC a CT/CC) prokázána každá v 0,13%, rizikový genotyp TT/CC nalezen nebyl. Závěr: Téměř 50% jedinců s význam-

ně zvýšeným rizikem pro vznik trombózy by nebylo indikováno k molekulárně genetickému vyšetření, kdyby nepodstoupilo prediktivní genetické vyšetření. Následnou hematologickou dispenzarizací a dodržováním doporučených preventivních opatření předpokládáme významné snížení rizika vzniku trombózy a jejích komplikací v budoucnosti. Výskyt kombinací rizikových alel MTHFR odpovídá dřívějším údajům, že zvyšující se množství mutovaných alel 677T a 1298C MTHFR snižuje životaschopnost plodu.

TRANSPLANTACE

2051.

Úspěšnost HSCT z pohledu HLA shody

Dobrovolná Marie, Vraná Milena, Válková Veronika, Marková Markéta
(NRL pro DNA diagnostiku, ÚHK, Praha)

V období let 1995- 2010 bylo v našem transplantacním centru provedeno 614 alogenních transplantací hematopoetických kmenových buněk u dospělých pacientů. Pacienti byli v 252 případech (41%) indikováni pro akutní leukemie, 119 (19%) pacientů bylo indikováno pro CML, 103 (16,7%) pro MDS, 95 (15,6%) pro lymfoproliferace, 36 (5,9%) pro MF, zbytek pro další hematologická onemocnění u dospělých pacientů méně častá (1,8%). Skupina je tvořena 269 ženami a 345 muži ve věkovém rozmezí 18- 64 let, s mediánem věku 41 let. HLA genotypizace potenciálních příbuzných a nepříbuzných dárců byla prováděna komerčními kity Olerup SSP nebo metodou přímého sekvenování pomocí kitů AlleleSEQR v pěti transplantacně významných lokusech HLA-A,-B,-C (HLA I.třídy), -DRB1, -DQB-1 (HLA II.třídy) na úrovni jednotlivých alel. HLA akceptovatelný příbuzný dárcé byl nalezen pro 223 pacientů. 90 pacientů (40%) z této skupiny vyvinulo akutní GVHD, 69 pacientů (31%) chronickou GVHD. Relaps primárního onemocnění byl zaznamenán u 62 pacientů (28%). 107 transplantovaných pacientů (48%) žije. Pro 391 pacientů byl vyhledáván vhodný dárcé v registrech nepříbuzných dárců doma i v zahraničí. Pro každého pacienta byl testován různý počet dárců (od 1 do 8, medián 2). Pro 200 pacientů byl nalezen 10/10 shodný dárcé. V této skupině 105 pacientů (52,5%) vyvinulo aGVHD, 56 (28%) chronickou GVHD. Relaps onemocnění byl zaznamenán u 49 pacientů (24,5%). 113 transplantovaných (56,5%) žije. Pro 112 byl vybrán nepříbuzný dárcé s jednou neshodou (9/10). Z toho ve 23% byla neshoda v HLA-A nebo -B, 58% v HLA-C, v 19% se jednalo o neshodu v HLA II.třídy. Z této skupiny 57 pacientů (51%) vyvinulo aGVHD, 30 pacientů (26,5%) cGVHD. Relaps byl diagnostikován u 28 pacientů (25%). Z této skupiny žije 54 pacientů (48%). U zbývajících 79 pacientů byla provedena HSCT od nepříbuzných dárců s více než jednou neshodou. 46 pacientů (58%) vyvinulo aGVHD, 16 pacientů (20%) cGVHD. Relaps byl diagnostikován u 18 pacientů (22%). Z této skupiny žije 33 pacientů (41%). Na základě výše uvedených dat lze konstatovat, že pacienti, kteří nemají shodného příbuzného dárcé,

mohou být úspěšně transplantováni od nepříbuzného dárce z registru, a to i v případě, že není nalezen 10/10 shodný dárce, ale i dárce s akceptovatelnou neshodou. V tomto případě se sice zvyšuje pravděpodobnost aGVHD, ale snižuje se incidence relapsů, takže výsledné přežití pacientů se zásadně neliší. Podpořeno Výzkumným záměrem MZCR 00023736

2015.

Nepříbuzenská transplantace krvetvorných buněk je u selektované skupiny nemocných starších 60 let plnohodnotnou léčebnou možností – zkušenosti centra

Jindra Pavel, Koza Vladimír, Karas Michal, Steinerová Kateřina, Lysák Daniel, Svoboda Tomáš, Vokurka Samuel, Hrabětová Marcela, Navrátilová Jana, Vozobulová Věra, Schutzová Miroslava, Jungová Alexandra
(*Hematologicko-onkologické oddělení FN, Plzeň*)

Nepříbuzenské transplantace krvetvorných buněk (TKB) jsou jedinou kurativní léčbou u některých pacientů s „high-risk“ hematologickými malignitami bez příbuzného dárce. S ohledem na vyšší transplantační mortalitu oproti příbuzenským TKB však panovala určitá zdrženlivost v indikaci u starších nemocných. Vzhledem k pokrokům v HLA typizaci a podpůrné péči jsou však již nyní nepříbuzní, dobře HLA shodní, dárce považováni za plnohodnotnou alternativu příbuzenských dárců, minimálně u mladších nemocných. Pro skupinu starších nemocných (≥ 60 let) jsou klinická data relativně omezená. Metodika: Unicentrická retrospektivní analýza 31 konsekutivních pacientů ≥ 60 let věku (medián 63, rozmezí 61-68) s vysoce rizikovými hematologickými malignitami, kteří byli transplantováni s nepříbuznými, HLA molekulárně zcela shodnými (10/10, $n=17$) nebo s částečně shodnými (shoda 9/10, $n=14$) dárce. 12 pacientů (39%) mělo lymfoidní malignitu, zatímco 19 (61%) myeloidní. Mimo 1. remisi bylo transplantováno 19 (61%) pacientů („pokročilí“). S jedinou výjimkou byli všichni transplantováni protokoly s nemyeloablativní přípravou. Mezi skupinami nebyly signifikantní rozdíly v relevantních klinických faktorech (dg. a její stadium, doba sledování, typ transplantace, pohlaví CMV stav atp.). Výsledky: Při mediánu sledování žijících 20 měsíců (rozmezí 7-74) pro všechny pacienty bylo 3-leté přežívání (OS) a přežívání bez nemoci (DFS) 51%, resp. 42%, zatímco celková non-relapsová mortalita (NRM) 29% (9/31) a incidence relapsů 19% (6/31). Celková incidence aGVHD byla 48%, aGVHD gr. $\geq III$ 10%. cGVHD se vyskytovala v 63%. Nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl v 3-r OS mezi nemocnými s transplantovanými s časnou či pokročilou nemocí (44% vs. 53%, $p=0,9823$), mezi nemocnými se shodou 10/10 a shodou 9/10 (38% vs. 57%, $p=0,8061$), stejně jako mezi pacienty s myeloidní vs. lymfoidní malignitou (53% vs. 49%, $p=0,9766$). Všechny tyto uvedené skupiny měly i srovnatelnou incidenci GVHD, relapsu a NRM. Závěr: Výsledky nepříbuzenské transplantace krvetvorných buněk v naší skupině rizikových hematologických pacientů ≥ 60 let jsou srovnatelné s mladšími nemocnými. U pečlivě selek-

tovaných nemocných ≥ 60 let je nepříbuzenská transplantace s 9-10/10 molekulárně shodným dárce nepochybně plnohodnotnou léčebnou modalitou s akceptovanou mortalitou i morbiditou

1940.

Systém řízení kvality v rámci transplantačního programu: 3-letá zkušenost v JACIE akreditovaném centru

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

Systém řízení kvality (SŘK) představuje mechanismus zajišťující, že všechny procedury, procesy a postupy v organizaci probíhají v souladu se standardy. V transplantačním programu to znamená, že klinická část, laboratorní část a odběrové centrum spolupracuje tak, aby dosáhlo nejlepší komunikace a zvýšení bezpečnosti pacienta i dárce krvetvorných buněk. Transplantační program Hematologicko-onkologického oddělení (HOO) FN Plzeň se skládá z klinické části (CU), odběrového centra (AU), laboratoře buněčné terapie (CPL) a kontrahované HLA laboratoře ČNRDD. Na začátku roku 2007 byla zahájena příprava k získání JACIE akreditace, kdy hlavním úkolem bylo zavedení SŘK. Sestavená skupina řízení kvality (QMG) složená z vedoucího lékaře, jeho zástupce, vrchní sestry, manažera kontroly kvality, vedoucích lékařů CU, AU a CPL postupně nově implementovala SŘK. Hlavními body SŘK definovanými dle JACIE standard byly: standardní operační postupy, systém interních auditů, detekce nežádoucích událostí, edukace a trénink personálu atd. „On-site“ inspekce JACIE se uskutečnila v červnu 2008 a od října 2008 byla našemu oddělení úspěšně udělena JACIE akreditace. V současné době, 3 roky po akreditaci, probíhá revize funkčnosti celého SŘK s cílem dalšího zlepšení kvality transplantačního programu. Nyní shrneme 2 důležité součásti SŘK – interní auditů a detekci nežádoucích příhod. Během posledních 3 let bylo uskutečněno celkem 13 schůzí Rady kvality, kde byly pravidelně diskutovány všechny klíčové body SŘK. Během interních auditů bylo nalezeno 15 drobných odchylek (6 v roce 2008, 4 v roce 2009 a 5 v roce 2010), detekované odchylky nebyly systematické, byly definovány a provedeny korektivní akce. V roce 2008 bylo reportováno celkem 51 nežádoucích příhod, 20(39%) hlášeno z CPL, 6(12%) z AU a 25(49%) z CU. V roce 2009 bylo detekováno 26 nežádoucích příhod, 12(46%) hlášeno z CPL, 3(12%) z AU a 11(42%) z CU. 38 nežádoucích příhod bylo zaznamenáno v roce 2010, 12(32%) z CPL, 8(22%) z AU a 19(50%) z CU. Z celkového počtu bylo 5 klasifikováno jako SAE (severe adverse events). Závěr: SŘK zajišťuje v rámci organizace rychlou detekci nežádoucích příhod, jejich analýzu a provedení následných korektivních akcí k minimalizaci opakování. Při srovnání prvního roku fungování SŘK na našem oddělení s dalšími léty jsme zaznamenali menší výskyt nežádoucích příhod než v následujících letech. SŘK je nyní dobře zaveden a zajišťuje

neustálé zlepšování různých částí transplantčního programu HOO FN Plzeň.

1918.

Alogenní transplantace krvetvorných buněk provedená mimo kompletní remisi choroby je u nemocných s akutní myeloidní leukémií léčebným přístupem s reálným kurativním potenciálem

Szotkowski Tomáš, Raida Luděk, Faber Edgar, Hubáček Jaromír, Indrák Karel

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

Významná část nemocných s akutní myeloidní leukémií (AML) se střední či nepříznivou cytogenetickou prognózou po chemoterapii nedosáhne kompletní remise (KR) nebo po jejím dosažení relabuje a na další léčbu je rezistentní. V těchto případech zůstává jedinou šancí na vyléčení nemoci alogenní transplantace krvetvorných buněk (ATKB). Na Hemato-onkologické klinice FN Olomouc podstoupilo v letech 1999-2010 ATKB 70 nemocných s AML. Dvacet čtyři nemocných (34,3%) bylo transplantováno mimo KR choroby. Jednalo se o 13 mužů a 11 žen ve věku 20-59 (medián 44) let. U 6 nemocných (25%) byl stav nemoci v době ATKB hodnocen jako parciální remise po předchozí léčbě, 1 nemocná byla transplantována v protražované dřevňové aplázii po záchranné chemoterapii podávané pro relaps nemoci a 17 nemocných (70,8%) mělo v době ATKB floridní AML. Dárce pro 17 nemocných byl HLA identický sourozenec. Sedm nemocných bylo transplantováno od nepříbuzného dobrovolného dárce, v 5 případech byl dárce HLA identický s nemocným, u 2 byla shoda v 8 z 10 HLA znaků. Šestnáct nemocných (66,7%) dosáhlo po ATKB KR choroby, přičemž u 1 nemocného bylo dosaženo KR až po 2. transplantaci. U 5 z nich choroba relabovala, dalších 5 zemřelo na komplikace léčby (infekce, reakce štěpu proti hostiteli). Šest nemocných (25%) žije v době analýzy v trvajícím KR, 4 z nich déle než 5 let od transplantace. Více než 7 let po transplantaci žije v KR nemocný, který remise dosáhl až po druhé ATKB. Dva nemocní ze zmíněných 6 žijících byli v době provedení ATKB v parciální remisi onemocnění, zbývajících 4 měli floridní a na chemoterapii rezistentní AML. Naše výsledky podporují možnost indikace ATKB jako potenciálně kurativního léčebného přístupu i u nemocných mimo KR choroby. Podpořeno výzkumným záměrem VZ MŠMT ČR 6198959205 a grantem Univerzity Palackého v Olomouci LF-2011-006.

1888.

Kombinace fludarabinu s cytarabinem a následná alogenní transplantace po režimu s redukovanou intenzitou u 24 pacientů s pokročilými lymfoidními malignitami

Krejčí Marta, Brychtová Yvona, Doubek Michael, Sandecká Věra, Kořístek Zdeněk, Navrátil Milan, Tomáška Miroslav, Horký Ondřej, Dvořáková Dana, Mayer Jiří
(Interní hemato-onkologická klinika, FN, Brno)

Úvod: Podání kombinované chemoterapie a následné provedení alogenní transplantace (SCT) po režimu s redukovanou intenzitou (RIC) vedlo k dobrým léčebným výsledkům především u pacientů (pac.) s AML. Cílem našeho sdělení bylo ověřit, zda obdobný režim je efektivní také u nemocných s jinými typy hematologických malignit. Metody: Retrospektivně bylo analyzováno 24 pac., kteří absolvovali chemoterapii a RIC s následnou SCT v našem centru v období 2006-2010. Diagnózy byly následující: ALL 5x, CLL 8x, NHL 11x. Kombinace fludarabinu (30 mg/m²) s cytarabinem (2 g/m²) po 4 dny (FC) byla použita k cytoredukcii. Po třídní pauze byl aplikován RIC: 4 Gy TBI, dále ATG (Fresenius) 10-20 mg/kg/den po 3 dny a cyklofosfamid 40-60 mg/kg/den po 2 dny. Stav onemocnění před SCT: 1x CR1, 7x CR2, 1x CR3, 7x PR2, 1x PR3, 7x refrakterní/progredující onemocnění. Medián věku byl 49 let (rozpětí 25-62). Typy dárce: 9x HLA identický sourozenec, 15x nepříbuzenský dárce. Podané štěpy: 22x PBSC, 2x kostní dřev. Výsledky: Medián příhojení neutrofilů (nad 0,5 x 10⁹/l) byl 17 dní, příhojení štěpu bylo dosaženo u všech 24 pac. Nejčastější toxicity dle CTC kritérií byly infekce stupně III/IV (16 z 24 pac.) a dále gastrointestinální toxicita (stupeň III u 7 z 24 pac.). Kompletního chimerismu bylo dosaženo u 83 % pac. v mediánu 60 dní (rozpětí 23-240). Úmrtí bez souvislosti s relapsem (NRM) v 1 roce a ve 2 letech od SCT byla 17 % a 21 %. Příčiny NRM: 2x GVHD, 3x septický šok s multiorgánovým selháním. Incidence akutní GVHD byla 61 % (14/23); 11x stupeň I+II, 3x stupeň III. Incidence chronické GVHD byla 45 % (9/20), 5x forma limitovaná, 4x extenzivní. Léčebná odpověď byla hodnocena u 22 pac.: 21x remise (95 %), 1x progres (5 %). Medián sledování od SCT je 24 měsíců (rozpětí 9-54). U 24 % pac. (5/21) došlo k relapsu. Žije 15 pac. (63 %) v remisi onemocnění; 9 pac. (37 %) zemřelo (z toho NRM 5x, progres 4x). V celé skupině 24 pac. je 2-leté přežití bez relapsu nemoci (PFS) 52% a 2-leté celkové přežití (OS) po SCT 65 %. Závěr: FC-RIC protokol se jeví jako efektivní terapie u pacientů s pokročilými lymfoidními malignitami s přiměřenou toxicitou. Léčebná odpověď je 91 %, NRM ve 2 letech je 21 %, 2-leté PFS a OS jsou 52% a 65%.

1886.

Transplantácia krvotvorných kmeňových buniek v SR
Mistrík Martin, Horáková Júlia, Hudeček Jan, Lakota Ján, Wild Alexander, Palašthy Stanislav, Tóthová Elena,
(KHaT LF UK, SZU a UN, Bratislava – SK; II. DK DFNSP, Bratislava – SK; KHaT UN a JLF UK, Martin – SK; NOÚ, Bratislava – SK; HO NsP F.D.R., Banská Bystrica – SK; HTO NsP, Prešov – SK; KH a OH LFLP a UN, Košice – SK)

Úvod: Evidovanie ročného počtu transplantovaných chorých na Slovensku podľa typu transplantácie krvotvorných buniek sa začalo v roku 1994. Od roku 1998 sa mapovanie transplantácie aktivity rozšírilo s cieľom získať validné informácie o vývoji a trendoch v oblasti klinickej transplantácie krvotvorných buniek (TKB). Všetky

transplantačné centrá v SR sa zapojili a novo zriadené centrá sa pripojili ku každoročnému referovaniu počtu transplantovaných chorých podľa indikácie, zdroja krvotvorných buniek a typu darcu. Metódy: V rokoch 1994 – 1997 sa evidoval ročný počet transplantovaných pacientov podľa typu transplantácie. Od roku 1998 sa používajú na zbieranie základných informácií o transplantačnej aktivite na jednotlivých pracoviskách v SR údaje z aktuálnej verzie štandardného formuláru Európskej skupiny pre transplantáciu krvotvorných buniek (EBMT). Výsledky: Doteraz (1989 – 2010) bolo v SR transplantovaných spolu 2 237 pacientov (autológne 1710, alogénne 527). Od roku 1988 sa podrobilo transplantácii krvotvorných buniek 1 925 chorých: krvotvorné bunky periférnej krvi dostalo 1 812 pacientov (autológna 1475; alogénna 337), dreňovú krv 103 (14; 89), 5 pacientov dostalo krvotvorné bunky z periférnej krvi a z kostnej drene (autológna) a 5 alogénnu pupečníkovú krv. Spomedzi 1 925 chorých lymfóm malo 678 (638; 40), mnohopočetný myelóm 498 (454; 4), akútnu leukémiu 401 (156; 245), solídny nádor 193 (178; 15), chronickú myelocytovú leukémiu 89 (23; 66), aplastickú anémiu 42 (0; 42) a vzácne indikácie pre TKB 24 pacientov (5; 19). V roku 2010 ročný počet alogénnych TKB od nepríbuzného darcu (26) prekročil počet TKB od súrodenca (20), a urobilo sa viac autotransplantácií pre mnohopočetný myelóm (59) ako pre lymfoproliferatívne choroby (46). Záver: 13 ročné sledovanie poskytuje informácie o vývoji a stave transplantačného programu krvotvorných buniek v SR. Odráža rozhodovanie lekárov, transplantačných tímov a prístup riadiacich pracovníkov zdravotníckych zariadení a zdravotných poisťovní. Hlavné zmeny sú v type darcov a indikáciách TKB. Zber neposkytuje informácie o dosahovaných výsledkoch TKB na Slovensku.

NE-HODGKINSKÉ LYMFOMY 1

1936.

Včasné a pre-lymfomatózne lézie niektorých B-lymfoidných neoplázií

Balhárek Tomáš, Szépe Peter, Marcinek Juraj, Plank Lukáš (Ústav patologickej anatómie a Konzultačné centrum bioprotickej diagnostiky ochorení krvotvorby JLF UK a UNM, Martin – SK)

Snahou onkologickej diagnostiky je identifikovať nádorovú léziu čo najskôr. Pri epitelových malignitách sú známe koncepty dysplázií, intraepitelových neoplázií a dnes intraepitelových lézií. Snaha definovať a identifikovať včasné lézie je evidentná aj u mezenchymálnych nádorov ako sú malígne lymfómy (ML) B-pôvodu. Ide o lézie, ktoré sú považované za biologicky a klinicky včasné, prejavujúce sa ako subklinické, tlejúce a indolentné. Najdlhšie známou a klinicky akceptovanou je monoklonálna gamapatia nejasného významu (MGUS), ktorá je prototypom pre-lymfomatózne lézie. Za včasnú léziu chronickej lymfocytovej leukémie (CLL) sa považuje mo-

noklonálna B-lymfocytóza (MBL). Po definovaní jej kritérií v periférnej krvi (PK) sa dnes intenzívne diskutuje o tkanivovej manifestácii CLL-typu MBL ako tkanivového ekvivalentu pre-lymfomatózne lézie CLL. Zároveň sa otvárajú otázky jej odlíšenia od včasných štádií tzv. interfolikulovej CLL a včasného malolymfocytového lymfómu (SLL) s „MBL-like“ leukemickým postihnutím PK. Je otázne, či sú fokálne infiltrácie lymfatických uzlín alebo kostnej drene „CLL/SLL-like“ proliferáciami klinicky signifikantné a či má ich rozpoznanie pred rozvojom symptómov CLL/SLL vplyv na prežívanie pacientov. Ďalšou intenzívne diskutovanou pre-lymfomatóznou léziou je folikulový lymfóm in-situ (FLIS). Ten býva incidentálne identifikovaný v <5% prípadov atypickej reaktívnej folikulovej hyperplázie na základe silnej expresie bcl-2 v CD10+ B-bunkách zárodočných centier, ktoré sú IGH/BCL2+. FLIS nie je skutočným ML v klinickom zmysle slova, lebo FL sa vyvinie len v malej časti týchto prípadov. Prípady FLIS treba odlíšiť od parciálnej infiltrácie FL koexistujúcim na inom mieste. Ďalšou známou pre-lymfomatóznou léziou je lymfóm z plášťových buniek in-situ (MCLIS). Prejavuje sa ako incidentálny nález cyklín-D1+ a IGH/CCND1+ B-buniek v plášťovej zóne reaktívnych lymfatických folikulov. MCLIS by mohol byť včasnou léziou klasického a aj tzv. indolentného (leukemického, splenického) MCL. Uvedené lézie sú zriedkavé, zvyčajne ťažko identifikovateľné a viaceré predstavujú len incidentálny nález. Ich klinický význam nie je úplne jasný, nakoľko zatiaľ chýbajú relevantné follow-up údaje. Keďže majú rovnaké genetické abnormality ako ich lymfómové formy, môžu prispieť k objasneniu patogenézy niektorých ML. Diskutuje sa aj o prognostických faktoroch zodpovedných za ich progresiu do skutočných MLa je len otázkou času, kedy sa objavia koncepty včasných lézií aj iných ML.

2028.

Význam detekcie cyklínu D1 a CD5 v diagnostike NHL: lymfóm z plášťových buniek versus iné NHL

Plank Lukáš

(Ústav patologickej anatómie a Konzultačné centrum bioprotickej diagnostiky ochorení krvotvorby JLF UK a UN, Martin – SK; Martinské bioprotické centrum, s.r.o., Martin – SK)

Súčasná pozitívna expresia CD5 a cyklínu D1, prípadne podporená dôkazom t(11;14)(q13;q32) metódou FISH sa v bioprotickej diagnostickej praxi úspešne používa ako marker lymfómu z plášťových buniek (MCL). Tento prístup má umožniť klinicky významnú identifikáciu tzv. konvenčného MCL ako malobunkového nevyliciteľného NHL, agresívnych variantov MCL (pleomorfného a blastoidného) a prípadov MCL in situ. Uvedený postup je však súčasne zaťažený nasledovnými rizikami: a) existujú prípady MCL bez t(11;14) a expresie cyklínu D1, v nich býva prítomná dysregulácia cyklínu D2, prípadne D3 a pre ich diagnostiku sa ukazuje byť nápomocná expresia transkripčného faktora SOX11, b) ďalej prípady MCL

s indolentním biologickým priebehom, tzv. iMCL - tie sú histologicky a fenotypove neodlíšiteľné od konvenčného MCL, ako aj c) iné B-NHL s expresiou CD5 a/alebo cyklínu D1 bez ohľadu na to, či deregulácia cyklínu je dôsledkom zmien na transkripčnej alebo postranskripčnej úrovni. Medzi tieto lymfómy patria najmä prípady cyklín D1+ trichocelulárnej leukémie (HCL), plazmocytového myelómu (PcM) a difúzneho veľkobunkového B-lymfómu (DLBCL). Dysregulácia cyklínu D1 je pritom dôsledkom t(11;14) len v prípade PcM, v ostatných ide zrejme o expresiu posttranskripčného typu. V procese biopptickej diagnostiky prvých dvoch prípadov obyčajne nevznikajú diferenciálno-diagnostické problémy (s výnimkou niektorých prípadov tzv. malobunkového CD20+ plazmocytómu, resp. G3 PcM). Identifikácia exprese cyklínu D1 prispieva k pochopeniu ich biológie, prípadne je prognosticky relevantná. Expresia cyklínu D1 v časti prípadov DLBCL poukazuje tiež na možnú úlohu cyklínov v patogenéze tohoto nádoru a môže, najmä v kombinácii so súčasnou CD5 pozitivitou, spôsobovať rozpaky pri diagnostike agresívnej varianty pleomorfného MCL. Prípady DLBCL s pozitivitou CD5+ a cyklín D1+ bývajú obyčajne morfológicky nadmerne pleomorfnými NHL s extrémne vysokou proliferacnou (Ki-67) frakciou a častou imunohistochemickou pozitivitou bcl6+/MUM1(IRF-4)+, pri neraz pozitivnej translokácii BCL6 génu. Preto možno konštatovať, že diferenciálna diagnostika cyklín D1+ a CD5+ B-NHL musí byť komplexná a podporená dôkladnou histomorfologickou, fenotypovou a genotypovou analýzou, a to prinajmenej génov CCND1 a BCL6. Podporené Centrom excelentnosti CEPV I (ITMS kód 26220120016), CEPVII (ITMS kód 26220120036) a RKM (ITMS kód 26220220113).

1870.

Léčba folikulárního lymfomu v roce 2011: kde jsme a kam směřujeme?

David Belada

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

Standardní přístup k nemocným s folikulárním lymfomem v roce 2011 představuje sledování nemocných do doby splnění některého z GELF kritérií velké nádorové masy, poté indukční léčba režimem R-CHOP nebo R-COP. U nemocných, kde touto léčbou bylo dosaženo parciální (PR) nebo kompletní remise (CR) pak udržovací léčba rituximabem po 2 měsících po dobu 2 let dle výsledků studie PRIMA. Kam tedy směřuje léčba FL v roce 2011? První změnou může být vypuštění strategie „watch and wait“ u nemocných s FL s malou nádorovou masou v úvodu. Dle výsledků mezinárodní studie porovnávací tento přístup s léčbou rituximabem a ve třetím rameni se stejnou léčbou s navazující udržovací léčbou po 2M po dobu 2 let se prokázalo, že časně podání rituximabu výrazně oddaluje nutnost podání chemoterapie. Vzhledem k minimální toxicitě této biologické léčby se jeví tento přístup jako velmi na-

dějný. V indukční léčbě se ukazuje jako výhodnější alternativou oproti klasickému R-CHOP nebo R-COP kombinace rituximabu s bendamustinem (BR). Tento režim oproti R-CHOP podstatně prodlužuje dobu do progresu (55 vs. 35 měsíců, p=0.0002). Velkou výhodou je i nižší myelotoxicita, absence alopecie i nižší celkový výskyt infekcí. Samostatným problémem je otázka konsolidační léčby Zevalinem u nemocných v PR nebo CR. Dle výsledků FIT studie byl prokázán význam této léčby oproti observaci, bohužel data po podání rituximabu a chemoterapie (R-CHEMO) v 1. linii jsou velmi omezená, tudíž z klinického hlediska asi má tento přístup význam jen pro nemocné v parciální remisi FL po R-CHEMO. V udržovací léčbě se zkouší režimy s delším podáváním rituximabu (až 5 let v SAKK studii), výsledky zatím nejsou k dispozici. Z nových léků se jeví jako nadějný lenalidomide, v relapsu onemocnění pak kombinace bortezomibu s rituximabem. Nadějně výsledky jsou u nových monoklonálních protilátek 2. generace (zejména GA 101). Z praktického hlediska probíhají klinické studie se subkutánním podáváním rituximabu, což by velmi ulehčilo a zrychlilo provoz na ambulancích. Folikulární lymfom představuje velmi dynamickou klinickou jednotku s obrovským posunem v posledních letech. V nejbližších letech jsou velmi pravděpodobně zcela zásadní změny k přístupu v léčbě tohoto onemocnění. Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.

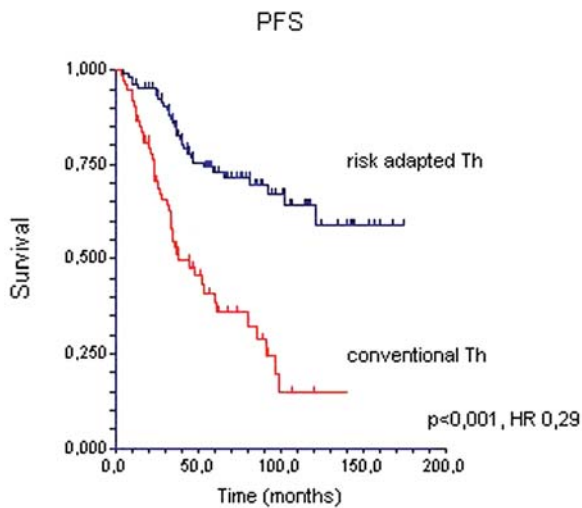
2030.

Riziku uzpůsobená terapie zlepšuje přežití nemocných s folikulárním lymfomem

Procházka Vít, Papajík Tomáš, Kubová Zuzana, Faber Edgar, Raida Luděk, Indrák Karel

(Hemato-onkologická klinika FN a UP, Olomouc)

Úvod: Optimální strategie úvodní léčby pacientů s FL není dosud stanovena. Data z prospektivních studií (PRIMA) ukazují, že konvenční chemoimunoterapie je vysoce efektivní ve skupinách nízkého – středního rizika dle FLIPI. Přežití vysoce rizikových pacientů je však nespokojivé. Cíl: Retrospektivně analyzovat přínos riziku uzpůsobené terapie v populaci dosud neléčených nemocných s FL Metoda: Analyzovali jsme data 209 nemocných. Medián věku při diagnóze: 54 let, KS III/IV dle Ann Arbor u 76 %, bulky choroba (>7 cm) u 60 %, postižení >4 uzlinové lokality u 49 % nemocných, hladina LDH zvýšena u 27 %, B2M u 32 % a s-TK u 32 % nemocných. FLIPI skóre bylo nízké 30,5 %, střední 29,5 % a vysoké u 40 % nemocných. Celkem bylo léčeno nepaliativní chemoterapií 184 pacientů – 77 bylo léčeno riziku uzpůsobenou terapií a 107 (58,5 %) terapií adekvátní riziku. Tito byli stratifikováni do 3 ramen: 1. pacienti s FLIPI 0-1 bez kumulace nepříznivých prognostických faktorů byli léčeni konvenční chemoterapií (n=113), 2. pacienti s FLIPI 2 s kumulací nepříznivých RF a <=65 let byli léčeni intenzifikovaně (ProMACE-CytaBOM, sekvencní protokol) n=28, 3. nemocní s FLIPI 3-5, <=65 let



v 1. CR/PR byli navíc konsolidováni ASCT (BEAM 200); n=42. Rituximab byl v indukci aplikován v 98 (48 %) případech. 68 nemocných bylo léčeno udržovací terapií interferonem (n=24), rituximabem (n=40) nebo ibritumomab tiuxetanem (n=4). Populace neléčená dle rizika byla starší (49 vs 59 let, $p < 0,001$), častěji se vyskytovalo KS III/IV (75 % vs 79 %, $p = 0,003$), častěji bylo detekována vyšší LDH (32 % vs 57 %, $p = 0,003$) i B2M (32 % vs 57 %, $p < 0,001$). Nebyl rozdíl v četnosti podání rituximabu či udržovací terapie. Většina rozdílů mezi skupinami byla způsobena faktem, že níže riziková pacienta odpovídali skupině léčené dle rizika. Výsledky: Léčebná odpověď byla hodnocena u 175 nemocných: CR/CRu dosáhlo 146 (83 %), PR 24 (14 %) a 5 nemocných na léčbu nereagovalo (SD+PD). Procento CR bylo vyšší u nemocných léčených adekvátně riziku (69 % vs 93 %, $p < 0,001$). Při mediánu sledování 73,3 měsíců dosáhlo OS celého souboru v 5 letech 83,6 % (95%CI 0,78-0,89), PFS v 5 letech 56,9 % (95% CI 0,49-0,64). OS i PFS v 5 letech bylo signifikantně vyšší u nemocných léčených dle rizika. OS: 71,4 % vs 94,7 % ($p < 0,001$, HR 0,18), PFS: 38,5 % vs 72,8 % ($p < 0,001$, HR 0,29). Závěr: Terapie adekvátní riziku vede ke kvalitnější léčebné odpovědi a lepšímu přežití nemocných s FL. Podpořeno: LF-2011-006, MSM 6198959205.

1981.

Mplus - Bezpečnost a účinnost udržovací léčby indolentních lymfomů rituximabem v podmínkách běžné klinické praxe - data z registru KLS - průběžná zpráva

Belada David, Jankovská Milada, Papajík Tomáš, Pirnos Jan, Pytlík Robert, Štěpánková Pavla, Smolej Lukáš, Starostka David, Špička Ivan, Motyčková Monika, Kubová Zuzana, Žikavská Lubica, Holíková Marta, Trněný Marek (II. interní klinika, OKH, FN a LF UK, Hradec Králové; Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Onkologické oddělení nemocnice, České Budějovice; I. interní klinika Všeobecné fakultní nemoc-

nice, Praha; Nemocnice, Havířov; Onkologické oddělení nemocnice, Liberec)

Charakteristika souboru: Od roku 2007 bylo do programu Mplus nahlášeno 384 pacientů s indolentními NHL (iNHL) léčených udržovací léčbou rituximabem (RM). K 25.3.2011 jsou alespoň částečně vyhodnotitelné údaje od 248 pacientů. U 119 pacientů s potvrzenou diagnózou (u 129 pacientů zatím ověřena nebyla) bylo 63 léčeno pro FL v 1. linii, 24 léčeno pro FL v relapsu, 22 léčeno pro MCL a 10 léčeno pro další méně časté iNHL (MALT, MZL, SLL, apod.). 92,5 % (n=209) pacientů bylo v indukci léčeno imunochemoterapií (R-CHEMO), 15 pacientů podstoupilo ASCT. 63 % pacientů bylo léčeno udržovací léčbou rituximabem po 3 měsících, 30 % po 2 měsících a pouze u 10 pacientů byl zvolena jiná frekvence podávání. Bezpečnost: Léčba byla předčasně ukončena u 27 pacientů, a to zejména z důvodu progresu (n=16), úmrtí (n=3), dále pak z důvodu výskytu sekundárního MDS, aktivace poliomyoviru, hepatopatie, ložiskového plicního procesu a pancytopenie (vše n=1), u 2 nemocných důvod ukončení neveden. Z důvodů nežádoucích účinků (NÚ) předčasně ukončilo 6 pacientů (4 % pacientů u kterých je znám alespoň průběh 1. roku léčby). U 12 pacientů došlo k odložení infuze z důvodů NÚ léčby (hematologická toxicita, infekce HCD, pneumonie, hepatopatie, průjmy, ITP, sialoadenitis). Hematologická ani infekční toxicita léčby, která její průběh neovlivnila (odklad infuze či předčasné ukončení léčby) nebyla sledována. Účinnost: Ze 79 pacientů, u kterých jsou známy údaje o dokončení léčby po 2 letech, jich je při ukončení léčby 81 % (n=64) bez známek progresu. U pacientů léčených v 1. linii FL, kde 75 % z nich bez známek progresu, je úspěšnost léčby srovnatelná s výsledky studie PRIMA (2letý PFS 82 %) V souladu s očekáváním se progresu vyskytuje nejčastěji u pacientů s relabujícím MCL (3 z 5 pacientů léčených v progresi MCL). Doposud byla hlášena úmrtí pouze u 3 pacientů. Závěr: Studie Mplus potvrzuje, že udržovací léčba rituximabem je i v podmínkách běžné praxe dobře snášena a provázena minimem klinicky relevantních komplikací. Dosavadní výsledky léčby potvrzují přínos RM, který byl prokázán v randomizovaných studiích.

MINIMÁLNÍ RESIDUÁLNÍ NEMOC U LYMFODINNÍCH MALIGNIT

1909.

Kvantitativní detekce minimální residuální nemoci u pacientů s ALL: od výzkumu ke klinickým aplikacím
Trka Jan, Mužíková Kateřina, Froňková Eva, Sedláček Petr, Šrámková Lucie, Starý Jan
(CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2. LF, Praha)

Kvantitativní detekce klonálně specifických přestaveb imunoreceptorových genů (Ig a TCR) se na přelomu sto-

letí stala standardní metodou sledování minimální residuální nemoci (MRN) u pacientů s ALL. Během posledního desetiletí začala být stratifikace pomocí určení hladin MRN využívána v řadě léčebných protokolů pro čerstvě diagnostikované i recidivující ALL dětského i dospělého věku. V roce 2002 byla skupina CLIP zakládajícím členem mezinárodní pracovní skupiny European Study Group on MRD Detection in ALL (ESG-MRD-ALL; dnes s akronymem EuroMRD). Tato skupina dnes sdružuje téměř 50 laboratoří z celého světa a dvakrát ročně pořádá mezinárodní kontrolu kvality. Jedním z prvních významných počínů skupiny ESG-MRD-ALL byla mezinárodní studie, která prokázala význam hladin MRN před začátkem předtransplantační přípravy u dětských pacientů s ALL indikovanou k allogenní transplantaci hemopoetických progenitorů (Krejčí et al, Bone Marrow Transplant 2003). Dramatický rozdíl v prognose prokázala i naše další publikace na stejné téma (Šrámková et al, Pediatr Blood Cancer 2007). Současným standardem – vedoucím ke zlepšení přežití pacientů po transplantaci – je snaha o omezení množství leukemických buněk v těle příjemce chemoterapií před zahájením vlastní transplantace. Podpořeno MSM0021620813.

1990.

Technické aspekty kvantifikace přestaveb genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory (Ig/TCR)

Froňková Eva, Trka Jan

(CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2. LF a FN Motol, Praha)

Minimální reziduální nemoc (MRN) je u ALL stanovována relativně k diagnostickému nebo relapsovému vzorku kostní dřeně (KD). DNA z tohoto vzorku je používána pro iniciální vyhledání přestaveb Ig/TCR, ve kterých je vzorek klonální, a pro tvorbu ředící řady. Pokud vzorek KD z diagnózy nebo relapsu není k dispozici, není možno MRN touto metodou určovat. V laboratořích CLIP provádíme u každého diagnostického vzorku screening na kompletní a nekompletní přestavby těžkých řetězců imunoglobulinů (IGH), delece lehkého řetězce kappa (IGK), přestavby T-buněčného receptoru gama (TCRG), delta (TCRD) a beta (TCRB). Používáme celkem 24 sad primerů u B-prekursorové ALL a 16 sad primerů u T-ALL. U monoklonálních přestaveb navrhuje se na základě přechodové V-(D)-J sekvence 2-3 specifické primery a optimalizujeme pacient-specifické qPCR. Cílem je zavést minimálně jeden, ideálně dva nezávislé cíle se senzitivitou 10⁻⁴. Pro zavedení do klinické praxe zavedla skupina ESG-MRD-ALL vedle pojmu senzitivita pojem rozmezí kvantifikace (quantitative range, QR), který určuje poslední ředění, ke kterému lze spolehlivě číselně vyjádřit hladinu MRN. Hlavním úskalím metody je přítomnost polyklonálních přestaveb ve zdravých lymfocytech nebo jejich prekursorech, která způsobuje nespecifickou amplifikaci s rizikem falešné positivity u cca 50% pacient-specifických systémů. Je proto nutné pou-

žívat jako negativní kontrolu DNA z periferní krve zdravých dárců v dostatečném množství replikátů (minimálně 6). Poměrně složitá pravidla skupiny ESG-MRD-ALL pro interpretaci výsledků (Van der Velden et al, Leukemia 2007) pak stanovují senzitivitu a QR v závislosti na cyklu qPCR, ve kterém dochází k amplifikaci negativní kontroly. Velká pozornost je věnována hraničním, slabě pozitivním vzorkům. Zde se pravidla liší v závislosti na tom, zda je MRN vyšetřována za účelem deescalace léčby (např. při stratifikaci do skupiny nízkého rizika na základě negativity MRN), nebo za účelem intenzifikace léčby (např. infuze dárcovských T-lymfocytů na základě positivity MRN po transplantaci). Pravidla pro intenzifikaci léčby jsou přísnější, všechny replikáty vzorku musí být amplifikovány o více než 3 cykly dříve než negativní kontrola, zatímco na stanovení positivity u protokolů s potenciální deescalací léčby stačí odstup jednoho cyklu.

1993.

Minimální residuální nemoc MRN v protokolech pro léčbu ALL (BFM, GMALL, REZ)

Froňková Eva, Mužíková Kateřina

(CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2. LF a FN Motol, Praha)

Jako první začal MRN pomocí kvantifikace klonálně specifických přestaveb Ig/TCR používat protokol AIEOP-BFM 2000. Pro zařazení pacientů do skupiny standardního rizika (SR) vyžadoval tento protokol negativní MRN pomocí dvou nezávislých Ig/TCR cílů ve dvou časových bodech: na konci první fáze indukční léčby (den 33) a v týdnu 12. MRN vyšší než 10⁻³ v týdnu 12 znamenala zařazení do vysokého rizika. Analýza přežívání pacientů na tomto protokolu ukázala, že MRN měřená pouze jedním cílem má velmi podobnou výpovědní hodnotu jako MRN stanovená dvěma nezávislými cíli. V České republice byly děti s ALL léčeny paralelním protokolem ALL IC-BFM 2002, který pro stratifikaci do rizikových skupin nepoužíval MRN, ale klinické znaky jako věk, leukocytóza a odpověď na prednisonovou předfázi spolu s morfologickým hodnocením kostní dřeně 15. den léčby. Hodnocení MRN bylo prováděno v rámci výzkumné studie, která ukázala, že stratifikace protokolu ALL IC je schopna odhalit většinu pacientů vysokého rizika, ale není schopna spolehlivě identifikovat pacienty s rychlou odpovědí na léčbu (Froňková, Leukemia 2008). Od roku 2007 je pro všechny dětské pacienty s ALL v ČR používán protokol využívající MRN. Novou skupinou definovanou na základě retrospektivních studií jsou pacienti s tzv. „slow early response“ (MRN v den 33 \geq 10⁻³ a pozitivní v týdnu 12), kteří jsou řazeni ke skupině vysokého rizika. Současný protokol AIEOP-BFM 2009 vyžaduje monitoraci MRN pomocí alespoň jednoho Ig/TCR cíle v den 33 a v týdnu 12 a předpokládá úspěšnou stratifikaci podle MRN u 90% pacientů. Zbýlých 10% pacientů je stratifikováno pomocí průtokové cytometrie v den 15. Protokol ALL-REZ-BFM 2002 pro léčbu relapsu dětské

ALL využívá MRN po druhém bloku indukční chemoterapie pro stratifikaci pacientů středního rizika buď k transplantaci kostní dřeně nebo k chemoterapii. Německý protokol GMALL 07-2003 pro léčbu ALL dospělých používá stratifikaci na základě MRN na konci prvního roku léčby (týden 52). U pacientů s negativní MRN týdnů 52, kteří měli v den 71 MRN nižší než 10-4 a setrvaly nízkou hladinu mezi týdny 16 a 52, je léčba ukončena. Pacienti s přetrvávající pozitivitou MRN od dne 71 (více než 10-4 ve dvou odběrech) jsou směřováni k alogenní transplantaci. Podpořeno MSM0021620813.

1908.

Monitorování minimální reziduální nemoci (MRN) na protokolech EsPhALL a Interfant

Zuna Jan, Froňková Eva, Kubričanová Žaliová Markéta, Grecová Veronika, Řezníčková Leona, Mužíková Kateřina, Starý Jan, Trka Jan

(CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2. LF, Praha)

Kojenecké akutní lymfoblastické leukemie (ALL) a ALL s fusním genem BCR/ABL patří mezi prognosticky nejméně příznivé subtypy tohoto onemocnění. Jedná se o relativně vzácné typy ALL a proto je jejich léčba u dětí soustředěna do mezinárodních protokolů - EsPhALL pro pacienty s fusním genem BCR/ABL a Interfant pro kojence s diagnosou ALL. Při stratifikaci pacientů do nevhodnějších léčebných ramen je u obou těchto protokolů využíváno i sledování hladin MRN v průběhu terapie. Strategie sledování MRN se však u těchto protokolů v určitých ohledech liší od monitorování ostatních pacientů s ALL - většina pacientů s kojeneckou ALL nese v leukemických buňkách přestavbu genu MLL a ti to pacienti jsou pak sledováni kombinací metod založených na amplifikaci genomické DNA. Jako cíle jsou standardně použity jednak přestavby genů pro imunoreceptorové geny a jednak genomické místo zlomu v genu MLL. Na protokolu EsPhALL se kromě imunoreceptorových přestaveb monitoruje i exprese fusního genu BCR/ABL na RNA (cDNA) úrovni. Předběžná data z obou mezinárodních protokolů naznačují, že zatímco u leukemií s přestavbou genu MLL je korelace obou cílů velmi dobrá, u BCR/ABL-positivních ALL je situace komplikovanější a každá z metod přináší jiný typ klinicky relevantní informace. Studie byla podpořena granty MSM0021620813 a IGA MZ NS/1000-4.

1986.

Minimální reziduální nemoc průtokovou cytometrií u akutní lymfoblastické leukemie

Mejstříková Ester, Hrdličková Alena, Pelková Vendula, Thürner Daniel, Fišer Karel, Kalina Tomáš, Procházková Daniela, Černá Zdena, Blažek Bohumír, Štěrba Jaroslav, Hak Jiří, Mihál Vladimír, Starý Jan, Hrušák Ondřej (Klinika dětské hematologie a onkologie LF2 UK a FN

Motol, Praha; Masarykova nemocnice, Ústí nad Labem; Dětská klinika, FN, Plzeň; Dětská klinika, FN, Ostrava; Klinika dětské onkologie, FN, Brno; Dětská klinika, FN, Hradec Králové; Dětská klinika, FN, Olomouc)

Detekce minimální reziduální nemoci (MRN) pomocí průtokové cytometrie (FC) je dlouho známou používanou aplikací této metody. V Evropě zlatým standardem MRN detekce jsou metody molekulární genetiky, které jsou ale zpravidla finančně a časově náročné. V rámci FC MRN nehodnotíme jednotlivé exprese antigenů, ale hodnotíme expresní vzorec, podle kterého určujeme odlišnost od nemaligních populací buněk. Řada studií, která používala či používá FC MRN ke stratifikaci pacientů, je zpravidla prováděna v jedné laboratoři. V roce 2010 byla zahájena multicentrická mezinárodní studie AIEOP BFM 2009, kde kromě hodnocení MRN pomocí Ig-TCR v den 33 a týden 12 je používána u všech pacientů i stratifikace pomocí FC MRN v den 15. Doposud se jedná o jedinou studii, která se opírá o výsledky z jednotlivých referenčních národních laboratoří. Zapojení FC do léčebného protokolu umožnila dlouholetá snaha o standardizaci metody. V rámci dětských ALL se dále plánuje zapojení FC u pacientů s relapsem ALL bez dostupných molekulárně genetických cílů. V podstatě identické kombinace monoklonálních protilátek lze použít pro identifikaci léčebné odpovědi a minimální disseminované nemoci lymfoblastického lymfomu. Dostupnost nejrůznějších bioinformatických nástrojů pro analýzu dat umožňuje se na cytometrická data dívat komplexními metodami jako je např. hierarchické shlukování, či analýza principiálních komponent. Očekáváme v budoucnosti menší závislost na expertním hodnocení cytometristy a zapojení automatizovaných algoritmů. Podpořeno granty: P301/10/1877, NS10480-3, PV2B06064, MSM0021620813, MZ0FNM2005

2064.

Technické aspekty stanovení minimální zbytkové nemoci u lymfomů

Tichý Boris, Marečková Andrea, Skuhrová Francová Hanna, Burčková Kateřina, Pospíšilová Šárka, Mayer Jiří (CMBGT IHOK FN a LF MU, Brno)

K monitorování minimální zbytkové nemoci metodou kvantitativní PCR u ne Hodgkinských lymfomů lze použít různé přístupy. Narozdíl od akutních leukemií je u lymfomů pouze zřídka možné využít ke sledování zbytkové nemoci transkripty fúzních genů. Častěji jsou používány klonální přestavby imunoglobulinových genů (nebo genů pro T-buněčný receptor) a sekvence DNA ve zlomových oblastech rekurentních chromozomálních translokací (např. t(14;18) nebo t(11;14)). Některé z těchto přístupů jsou pouze tumor-specifické, což zjednodušuje postup vyšetření a výrazně jej slevňuje, jiné jsou tumor- i pacient-specifické. Všechny metody jsou však vysoce citlivé a umožňují spolehlivou detekci změn počtu reziduálních tumorových buněk v krvi/kostní dřeni.

2002.

Sledování minimální zbytkové nemoci u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií po alogenní transplantaci kostní dřeně

Doubek Michael, Tichý Boris, Stehlíková Olga, Skuhrová Francová Hana, Chovancová Jana, Klabusay Martin, Malinová Karla, Krejčí Marta, Brychtová Yvona, Pospíšilová Šárka, Mayer Jiří

(Interní hematologická klinika LF MU a FN, Brno; Středoevropský technologický institut MU, Brno;)

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je hematologická malignita, která je i přes značný terapeutický pokrok a přes stále zevrubnější poznání biologie onemocnění vyléčitelná pouze alogenní transplantací kostní dřeně. U řady nemocných ale i po alogenní transplantaci onemocnění relabuje. Z tohoto důvodu se ukazuje jako nutnost sledovat po alogenní transplantaci u nemocných s CLL minimální zbytkovou nemoc (MRD) a v případě incipientního relapsu nemoci terapeuticky zasáhnout. Cílem našeho projektu je sledovat MRD u nemocných s CLL po alogenní transplantaci krvetvorných buněk pomocí 2 metod (1/ metoda čtyřbarevné průtokové cytometrie založená na „Rawstronově protokolu“ a 2/ metoda kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RQ-PCR)) a srovnání těchto dvou metod z hlediska citlivosti zachytu molekulárního relapsu nemoci. Od roku 2006 bylo oběma metodami sledováno 14 nemocných s chronickou lymfocytární leukémií transplantovaných po režimu s redukovanou intenzitou (modifikovaný režim FLAMSA-RIC, n = 12) nebo po myeloablativním režimu (režim TBI+cyklofosfamid, n = 2). Sledování probíhalo a probíhá zprvu v měsíčních intervalech z periferní krve těchto nemocných. U 12 nemocných byla po transplantaci MRD opakovaně detekována. U 9 z těchto nemocných byl pozorován molekulární relaps po předchozí negativitě MRD, u zbylých nemocných byla zjištěna přetrvávající MRD pozitivita po transplantaci. Výsledky vyšetření MRD oběma metodami korelují, nicméně molekulární relaps detekovaný metodou RQ-PCR vždy předcházela relapsu detekovanému metodou imunofenotypizační, což prokazuje přibližně o jeden řád vyšší citlivost této metody ve srovnání s vyšetřením imunofenotypizačním. Na základě včasné detekce MRD byla u všech nemocných indikována léčba relapsu onemocnění.

2091.

Využití monitorace minimální reziduální nemoci u mantle cell lymfomu v klinické praxi

Šálek David, Tichý Boris, Marečková Andrea, Janíková Andrea, Klabusay Martin, Michalka Jozef, Mayer Jiří
(Interní hematologická klinika FN Brno a LF MU, Brno)

Úvod: Minimální zbytkovou nemoc (MRN) u mantle cell lymfomu (MCL) lze s využitím polymerázové řetězové reakce (PCR) monitorovat pomocí detekce specifické

chromozomální translokace BCL1/IGH nebo přes klonální přestavbu imunoglobulinového genu. Praktický význam však není dosud přesně zmapován. Metody: Projekt monitorace MRN u MCL byl rozdělen na fázi observační a intervenční. V observační fázi jsme pomocí PCR sledovali u pacientů v klinické remisi kinetiku MRN v periferní krvi a kostní dřeně až do klinického relapsu. Molekulární marker reziduální nemoci je vstupně stanoven ze vzorku periferní krve, kostní dřeně či tkáně pomocí nested PCR. Při vlastní kvantitativní monitoraci se využívá real-time PCR (RQ-PCR). Výsledek je vyjádřen jako počet kopií sledované přestavby na 1 milion buněk. Odběry periferní krve jsou prováděny každé 3 měsíce, při zachytu PCR pozitivitě následuje kontrola s odstupem 4-6 týdnů a přešetření kostní dřeně. Molekulární relaps (MRel) byl definován jako opakovaná či narůstající PCR pozitivita ve dvou konsekutivních vzorcích při současném vyloučení relapsu klinického. Aktuálně probíhající fáze intervenční zahrnuje preemptivní imunoterapii MRel rituximabem 4x 375 mg/m² v týdenním intervalu, monitoraci kinetiky MRN po této intervenci a klinické sledování do progresu. Výsledky: Celkem je MRN sledována u 56 pacientů s MCL, z toho přes translokaci BCL1/IGH se zlomem v oblasti major translocation cluster (MTC) u 28 pac., v oblasti non-MTC u 19 pac. a u 9 pac. přes klonální IgH. Ve fázi observační byl molekulární relaps detekován u 8 pacientů. Všechny 8 pacientů zrelabovalo i klinicky, medián doby od MRel do klinického relapsu byl 5,5 měsíce (1,5-22). Imunoterapie rituximabem byla v rámci intervenční fáze projektu podána u 5 dalších pacientů s MRel, u všech bylo dosaženo opětovné PCR negativity. Molekulární remise trvá bez přerušení u 1 pacienta (22 měsíců), u zbylých 4 trvala 17, 16, 7 a 6 měsíců. Z nich 1 pac. zároveň s relapsem molekulárním zprogreboval i klinicky, u 2 proběhl retreatment rituximabem, přičemž 1 pac. zůstává hraničně PCR+, jeden i přes dosažení PCR negativity rovněž klinicky zprogreboval. V klinické remisi tak zůstávají 3 z 5 pacientů (22, 22 a 19 měsíců od léčby 1.MRel). Závěr: Monitoraci MRN u MCL pomocí PCR lze v běžné praxi velmi dobře využít k predikci klinického relapsu. Při molekulárním relapsu lze preemptivně terapeuticky zasáhnout, a velmi pravděpodobně tak pacientům prodloužit období bez nemoci.

1972.

Klinický význam Bcl2/IgH ve sledování minimální zbytkové nemoci u folikulárního lymfomu

Janíková Andrea, Marečková Andrea, Dvořáková Dana, Bortlíček Zbyněk, Tichý Boris, Pospíšilová Šárka, Mayer Jiří

(Interní hematologická klinika FN Brno a LF MU, Brno; Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, FN a LF MU, Brno; Institut biostatistiky a analýz, Masarykova univerzita, Brno)

Úvod: Přestavba Bcl2/IgH je považována za molekulární znak folikulárního lymfomu (FL). I když se jeví

Bcl2/IGH jako atraktivní cíl pro sledování minimální zbytkové nemoci, jeho význam v prognóze a monitorování chování FL zůstává předmětem diskuzí. Metody: Hodnoceno bylo celkem 71 pacientů s identifikovanou Bcl2/IgH dle PCR s mediánem sledování 44 měsíců (9-102), přičemž 56 pacientů s podtypem přestavby MBR bylo sledováno i kvantitativně (real-time PCR; RQ PCR). V hodnocení jsme se zaměřili na tři oblasti: 1. Vstupní kvantitativní měření v krvi a kostní dřeni byly porovnány s klinickými parametry včetně léčebné odpovědi a doby do relapsu, 2. Stanovení významu dosažení molekulární remise po léčbě, 3. Monitorování minimální zbytkové nemoci v periferní krvi. Výsledky: Množství kopií Bcl2/IgH v periferní krvi a kostní dřeni (n=56) se před léčbou pohybovala v rozmezí 0 až miliony kopií se signifikantně vyššími počty v kostní dřeni (p<0,05). Pokročilé klinické stadium (III a IV) a mikroskopická infiltrace kostní dřene byly sdruženy významně s vyššími počty kopií Bcl2/IgH v obou kompartmentech. Přetrvávání PCR pozitivita v krvi po ukončení léčby bylo sdruženo s významně kratší dobou do progresu (PFS; p 0,0062). PFS byl signifikantně kratší u pacientů s vyššími iniciálními počty kopií Bcl2/IgH. Kritické hodnoty byly pro periferní krev nalezeny v rozpětí 5000-50 000 kopií/10 na 6 CE (p 0,003) a pro kostní dřeň kolem 100 000 kopií. Monitorování Bcl2/IgH v periferní krvi ukázalo (n=71), že u 84% pacientů je dobrá korelace molekulární aktivity a klinického chování FL. V případě molekulárního relapsu byla klinická progresse následně identifikována s mediánem pouze 3 měsíce (0-7). U 16% pacientů však molekulární aktivita neodpovídala klinickému vývoji choroby. Ve většině případů v klinickém relapsu nebyla identifikována molekulární aktivita v krvi, nebo naopak trvalá molekulární aktivita provázela dlouhodobou klinickou remisi.

Závěr: Molekulární aktivita Bcl2/IgH v krvi a kostní dřeni před léčbou koreluje s agresivitou FL. Stanovení molekulární aktivity po ukončení léčby v krvi může být využito jako prognostický parametr. Sledování molekulární aktivity Bcl2/IgH ve smyslu monitorování minimální zbytkové nemoci není spolehlivým nástrojem v rozpoznání relapsu FL.

MYELODYSPLASTICKÝ SYNDROM / ANÉMIE

2039.

Biochemická charakterizace enzymopatií způsobujících vrozenou hemolytickou anémii

Mojzík Renáta, Pospíšilová Pavla, Doležel Petr, Pospíšilová Dagmar, Indrák Karel, Divoký Vladimír (Ústav biologie LF UP, Olomouc; Dětská klinika FN a LF UP, Olomouc; Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc)

Úvod: Defekt glukóza-6-fosfátdehydrogenázy (G6PD) a pyruvátkinázy (PK) patří k častým příčinám vrozené hemolytické anémie u obyvatel ČR. Vyloučením jiných příčin hemolytické anémie diferenciální diagnostikou lze oba

enzymové deficity na rozdíl od ostatních enzymopatií snadněji definovat na základě výskytu Heinzových tělísek, kterými je provázen deficit G6PD, nebo výskytu extrémní retikulocytózy v případě deficitu PK s počty retikulocytů běžně přesahujících 50 %. U ostatních enzymopatií neexistuje žádná jiná morfologická charakterizace, která by napomohla k rozlišení mezi jednotlivými enzymovými defekty, vyjma výrazného bazofilního tečkování typického pro deficit pyrimidin-5'-nukleotidázy (p5'N). U většiny z nich navíc není úplně zřejmý mechanismus hemolýzy. Metody: V naší laboratoři jsme zavedli: A) jednoduché screeningové testy založené na monitorování poměru oxidované/redukované formy glutathionu a adenosintri-/adenosindifosfátu, které mohou primárně přispět k odlišení mezi skupinami enzymopatií spojených s metabolismem glutathionu nebo glykolýzy; B) metody umožňující průkaz snížené kinetické aktivity enzymů nezbytný k určení správné diagnózy. Patří mezi ně kromě deficitu již zmiňovaných enzymů G6PD a PK také deficit glukózafosfátizomerázy, hexokinázy, fosfofruktokinázy, trióza-fosfátizomerázy a fosfoglycerátkinázy. Jedná se o enzymopatie, které jsou nejčastěji spojovány s vrozenou hemolytickou anémií s rozdílným stupněm klinického projevu i četnosti výskytu. Výsledky: V rámci charakterizace enzymopatií jsme popsali ojedinělý případ, kde sekundární deficit glutathionreduktázy je modifikačním faktorem fenotypového projevu nestabilní hemoglobinopatie Hb Haná (Mojzíkova et al., 2010). Ve vybrané skupině 8 nemocných s diagnózou nespecifické hemolytické anémie s podezřením na enzymopatii jsme v jednom případě naměřili sníženou enzymovou aktivitu hexokinázy, ve 2. případě G6PD a ve 3. případě PK. Zda se jedná o skutečný enzymový defekt, potvrdí až charakterizace na molekulárně-genetické úrovni. Závěr: Určení přesné diagnózy enzymopatických hemolytických anémií výraznou měrou přispěje nejen k rozhodování o léčbě (nutnost splenektomie), ale i k pochopení fenotypově-genetických souvislostí u některých anémií a umožní aktualizovat četnost a frekvenci enzymopatií vyskytujících se v české populaci. Podpořeno granty: NT11208 (MZ ČR), MSM6198959205 (MŠMT ČR), LF_2011_011 (LF UP). Mojzíkova R. et al. Blood Cells Mol Dis. 2010. 219-22.

2007.

Výskyt infekce *Helicobacterem pylori* u dětí se sideropenickou anémií

Pospíšilová Dagmar, Sulovská Lucie, Novák Zbyněk, Ludíková Barbora, Karásková Eva (Dětská klinika Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice, Olomouc)

Úvod: Infekce *Helicobacterem pylori* je celosvětově nejrozšířenější infekcí, infikována je asi polovina světové populace. Vyšší prevalence je popisována v rozvojových zemích. U dětí ve vyspělých zemích je incidence udávána méně než 10%. HP kolonizuje žaludek, jeho nejčastější manifestací u dětí je antrální gastritida. Je disku-

tována rovněž etiologická souvislost infekce HP se sideropenickou anémií. V etiologii anémie mohou hrát roli ztráty krve, pokles pH žaludeční šťávy a spotřeba Fe pro metabolismus bakterií. Jednoznačná souvislost infekce HP se sideropenickou anémií u dětí však dosud nebyla prokázána. Soubor pacientů a metody. V letech 1999-2010 bylo ve specializované hematologické ambulanci vyšetřeno 61 dětí se sideropenickou anémií. Jednalo se o 19 chlapců a 42 dívek ve věku 3-18 let. Diagnóza sideropenické anémie byla stanovena na podkladě detailní analýzy krevního obrazu a biochemických markerů metabolismu železa. Po vyloučení gynekologické příčiny u dívek bylo provedeno vyšetření GIT včetně okultního krvácení a stanovení antigenu HP ve stolici. Výsledky Infekce HP byla prokázána u 33 (54%) pacientů (11 chlapců a 22 dívek) ve věku 5-18 let (medián 14 let). Průměrná hodnota Hb byla 83 g/l (rozptyl 49-114 g/l). Hladina feritinu se pohybovala v rozmezí 0,9-18 ug/l. U všech pacientů byl pozitivní nález antigenu HP ve stolici, infekce byla potom verifikována při gastrokopickém vyšetření. 12 pacientů (14%) mělo klinické příznaky infekce v podobě bolestí břicha nebo pocitu plnosti v epigastriu. Pouze u 6 pacientů (8,2%) byl pozitivní nález okultního krvácení. U 31 pacientů došlo po léčbě infekce HP k normalizaci uvedených ukazatelů nejdéle za 3 měsíce od zahájení léčby, u dvou pacientek s refrakterní anémií jsme prokázali recidivu infekce HP s nutností opakované léčby. Závěr Rozdíl mezi výskytem infekce HP udávaným v dětské populaci (do 10%) a výskytem prokázané infekce v souboru pacientů se sideropenickou anémií (54%) je vysoce statisticky významný ($p < 0,00001$), naše nálezy tedy prokázávají infekci *Helicobacter pylori* jako příčinu sideropenické anémie. Infekce *Helicobacter pylori* by měla patřit do diferenciální diagnostiky sideropenické anémie především u dospívajících dívek. Včasným provedením gastrokopie můžeme tak předejít zdlouhavému neúspěšnému léčení preparáty Fe u těchto pacientů, u kterých by později tato diagnóza byla stanovena a onemocnění řádně léčeno. Podporováno výzkumným záměrem MSM 6198959205 a grantem LF-2011-006.

1920.

Molekulární charakterizace beta-talasemií a hemoglobinových variant v české a slovenské populaci

Divoká Martina, Partschová Martina, Mojžíšková Renáta, Piterková Lucie, Horváthová Monika, Kolářková Monika, Kalandrová Eliška, Čermák Jaroslav, Pospíšilová Dagmar, Fábryová Viera, Indrák Karel, Divoký Vladimír (*Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc; Ústav biologie LF UP, Olomouc; ÚHKT, Praha; Hematologie, Nemocnica sv. Michala, Bratislava – SK*)

Úvod: Nejčastější příčinou vrozené mikrocytární anemie v České republice a na Slovensku jsou β -talasemické alely a to i přesto, že jejich výskyt je ve střední Evropě relativně vzácný. Podobně jako v jiných nemalarických oblastech zastoupení β -talasemie odráží historickou i sou-

časnou migraci a demografické změny, které ovlivňují genetickou variabilitu nynější populace žijící v této oblasti. Cíl: Stanovit frekvenci a spektrum mutací v β -globinovém genu u pacientů z ČR a ze Slovenska s klinickými symptomy β - nebo $\delta\beta$ -talasemie. První část této studie byla publikována již téměř před dvaceti lety (Indrák et al., *Hum Genet* 1992; 88: 399-404) a našim cílem bylo rozšířit a doplnit tuto původní práci. Pacienti a metody: Bylo analyzováno téměř 380 vzorků z hematologických center z České republiky a ze Slovenska. U všech vzorků byl vyšetřen krevní obraz, elektroforéza hemoglobinu (Hb) a byla provedena DNA analýza. Výsledky: Bylo identifikováno 22 β -talasemických mutací u více jak 260 heterozygotů ze 152 nepříbuzných rodin českého nebo slovenského původu. Většina mutací (70 % pacientů) byla původem ze Středozeří. Nově objevená inserce L1 retrotranspozonu do intronu β -globinového genu představuje novou etiologii vzniku β -talasemie. Vlivem inserce došlo k umlčení exprese β -globinového genu represivním chromatinem asociovaným s insercí L1 (Piterková et al., *Haematologica* 2010; 95(s2): 417-8, (EHA abstrakt)). Na seznamu abnormálních hemoglobinů je v současnosti 14 β -globinových variant zahrnujících i vzácnou variantu s vysokou afinitou ke kyslíku (Hb Olomouc) asociovanou s familiární polycytemií a dvě unikátní varianty vedoucí k hemolytické anemii s Heinzovými tělísky (nestabilní Hb Hradec Králové a Hb Haná). Závěr: V české a slovenské populaci je β -talasemie vzácná, ale je nutné na ni pomyslet v případech vrozené hypochromní mikrocytární anemie. Všichni pacienti s výjimkou čtyř byli heterozygoti s klinickými příznaky talasemie minor, jen ojedinele se jednalo o dominantně dědičnou formu β -talasemie s fenotypovými projevy závažné talasemie minor nebo talasemie intermedia. Tři ze čtyř homozygotů nebo dvojité heterozygotů β -talasemie byli imigranti z malarických oblastí. Genetický posun a migrace v minulosti i v současnosti jsou zodpovědné za zanesení alel ze středomořských oblastí do naší populace s výjimkou některých mutací vzniklých místně u jednotlivých rodin. Podpořeno granty: IGA NT11208 a IGA NS10281-3/2009; MSM 6198959205; LF_2011_006 a LF_2011_011.

1932.

Úloha transkripčních faktorů Fli1, EKLF, PU.1, p53 a enzymu HDM2 u refrakterní anemie a megakaryopoezy u 5q- syndromu

Neuwirtová Radana, Fuchs Ota, Jonášová Anna, Holická Monika, Vostrý Martin, Kostečka Arnošt, Hájková Hana, Čermák Jaroslav, Vondráková Jana, Hochová Ivana, Šišková Magdalena, Libiger Jiří, Šponerová Dana, Kadlčková Eva, Nováková Ludmila, Černá Olga, Čmejla Radek, Pospíšilová Dagmar, Seifertová Naďa, Březinová Jana, Michalová Kyra

(*I. interní klinika VFN I. LF UK, Praha; ÚHKT, Praha; HOK FN, Olomouc; OKH FN Motol, Praha; OKH Masarykova nemocnice, Ústí nad Labem; HTO Baťova nemocnice, Zlín; Hem.klin. FN Královské Vinohrady, Praha; Děť-*

ská klin. FN, Olomouc; OKH nemocnice, České Budějovice; Centrum onkocytogenetiky VFN I. LF UK, Praha)

Úvod. Přestože erytroidní buňky a megakaryocyty sdílejí společný progenitor (MEP), 5q- syndrom se vyznačuje refrakterní anemií v kontrastu s funkční megakaryopoezou. V diferenciaci MEP hrají úlohu transkripční faktory Fli1 a EKLf vedle celé řady dalších faktorů. Oba uvedené faktory se navzájem expresně potlačují. Zvýšené hladině Fli1, který řídí diferenciaci na megakaryocyty, odpovídá snížená hladina EKLf, který účinkuje v erytroidní diferenciaci. Zvýšení exprese Fli1 u 5q-syndromu se vysvětluje dvojím způsobem. Fli1 je přímým cílem pro mikroRNA145 (miR145), která leží v deletované oblasti chromosomu 5. Haploinsuficience genů pro miR145 a miR146a zvyšuje expresi TRAF6 ("tumor necrosis factor receptor-associated factor-6"), který stimuluje produkci interleukinu 6 (IL6). IL6 zvyšuje hladinu Fli1 mRNA. Refrakterní anemie u 5q-syndromu souvisí s haploinsuficiencí genu RPS14 pro ribozomální protein. Následný ribozomální stres inaktivuje E3 ubikvitin ligázu HDM2, která za fyziologických podmínek odbourává p53. Důsledkem je zvýšení p53 a apoptoza erytroidních buněk. Megakaryocytární buňky by mohly být ochráněny před apoptozou zvýšenou hladinou Fli1, který naopak stimuluje expresi HDM2 a podporuje degradaci p53. Metody. Hladina mRNA pro Fli1, EKLf, PU.1, p53 a HDM2 byla stanovena kvantitativní PCR v reálném čase v celkové RNA izolované z mononukleárních buněk získaných z kostní dřene a krve pacientů s 5q-syndromem, pacientů s MDS s nízkým rizikem a normálním chromosomem 5 a u zdravých kontrol. Relativní hladina specifické RNA byla vztažena na hladinu glyceralddehyd-3-fosfodehydrogenázy. Výsledky. Nalezli jsme zvýšenou hladinu Fli1 mRNA a sníženou hladinu EKLf mRNA u 5q- syndromu. Ve skupině MDS s normálním chromosomem 5 je hladina Fli1 mRNA zvýšena jen ve dřeni a u EKLf mRNA nebyly nalezeny změny. Analýzou metylace promotoru EKLf genu jsme zjistili, že není hypermetylován u 5q-syndromu a metylace tohoto genu není příčinou snížené hladiny EKLf mRNA. Zvýšené hladiny HDM2 mRNA, p53 mRNA a PU.1 mRNA byly také zjištěny u 5q-syndromu a to především v kostní dřeni a v menší míře v krvi. Naše předběžné výsledky u 7 pacientů s Diamond Blackfan anemií ukázaly sníženou hladinu EKLf mRNA, ale ne zvýšenou hladinu Fli1 mRNA oproti kontrolám. Závěr. Potvrdili jsme význam faktorů Fli1 a EKLf v diferenciaci MEP u 5q-syndromu. Analýza ostatních faktorů by mohla objasnit rozdílné chování erythropoezy a megakaryopoezy. Podpora MSM0002160808, VZ00023736 a LC06044

2024.

Effekt rychlé redukce počtu blastů před transplantací na délku přežití u nemocných s pokročilým MDS
Čermák Jaroslav, Vítek Antonín, Marková-Šťastná Markéta, Lukášová Marcela, Cetkovský Petr
(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Význam redukce počtu blastů před transplantací krve tvorných buněk (SCT) u nemocných s pokročilou formou MDS (>10% blastů) na výsledek SCT není stále jednoznačně potvrzen. Ve 2 retrospektivních analýzách provedených ve skupině 69 transplantovaných nemocných s primárním MDS s >10% blastů jsme sledovali efekt předléčení kombinovanou chemoterapií na délku přežití a incidenci komplikací po následné alogenní SCT a prognostický význam různých laboratorních a klinických parametrů na délku přežití nemocných. Analýza provedená v roce 2004 u 26 transplantovaných nemocných prokázala statisticky významný rozdíl v celkové délce přežití mezi nemocnými transplantovanými s ≤10% blastů a nemocnými s >10% blastů v době SCT (33,5 v.s. 11,8 měsíce, p=0.003), stejně významný byl i rozdíl v pravděpodobnosti přežití 3 roky bez známek choroby (55% v.s. 23%, p=0.002). Nebyl přítomný statisticky významný rozdíl mezi počtem relapsů po SCT (25% v.s. 33%), ale byla významná diference v incidenci peritransplantační mortality (19% v.s. 40%, p=0.005). Druhá analýza byla provedena v roce 2010 ve skupině 43 nemocných a opět prokázala signifikantní rozdíl v celkové délce přežití (57,5 v.s. 18,0 měsíce, p=0.001) a v pravděpodobnosti přežití 3 roky bez známek choroby (71,4% v.s. 36,4%, p=0.001) mezi nemocnými transplantovanými s ≤10% a >10% blastů. Opět nebyl přítomen statisticky významný rozdíl v počtu relapsů (14,3% v.s. 22,7%), ale přežití vysoce ovlivňovala peritransplantační mortalita (0% v.s. 27%, p<0.0001). Lineární regresní analýza o jedné nezávislé proměnné ukázala jako nezávislé proměnné ovlivňující délku přežití dosažení kompletní remise (CR) či alespoň pokles počtu blastů v kostní dřeni pod 10% před SCT a časné provedení SCT do 4 měsíců po stanovení dg., regresní analýza o více nezávislých proměnných prokázala jako nezávislé parametry ovlivňující délku přežití dosažení CR, provedení SCT do 4 měsíců po dg. a věk < 50 let. Naše nálezy ukazují, že chemoterapie vedoucí k rychlému poklesu počtu blastů v kostní dřeni následovaná časnou SCT představuje nejefektivnější přístup k léčbě pokročilého MDS u mladších nemocných. Výsledky svědčí o tom, že význam redukce počtu blastů nespočívá pouze v ovlivnění incidence rizika následných relapsů, ale zřejmě i v ovlivnění mikroprostředí kostní dřene, jež má význam pro přijetí štěpu a dalších faktorů ovlivňujících výsledek reakce mezi štěpem a tkáněmi příjemce.

NE-HODGKINSKÉ LYMFOMY 2

2052.

Současné poznatky o patogenezi difúzního velkobuněčného B lymfomu (DLBCL) a jejich přínos pro rutinní prognostickou stratifikaci a cílenou léčbu

Jarošová Marie, Papajík Tomáš, Chytilíková Radka, Urbánková Helena, Kubová Zuzana, Flodr Patrik, Holzerová Milena, Indrák Karel

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

V poslední dekádě byl učiněn významný pokrok k porozumění patogenezi difúzního velkobuněčného B lymfomu (DLBCL). Na základě expresního profilování byly stanoveny prognostické podskupiny DLBCL, které se liší nejen expresí genů, ale i genetickými změnami v nádorové tkáni. Porovnání výsledku genetických změn a změn v expresi genů vedlo k identifikaci cílových genů v oblastech, ve kterých došlo ke změnám v počtu kopií genů. Byly studovány i balancované změny, především translokace zahrnující BCL2, nejčastěji se vyskytující u GCB DLBCL nebo BCL6 translokace, které jsou častěji přítomné u ABC podtypu DLBCL. Všechny tyto výsledky se staly základem studia signálních drah a na jejich základě bylo zjištěno, že u různých subtypů DLBCL dochází k aktivaci rozdílných signálních drah a tím bylo naznačeno, že individualizovaná léčba nemocných by mohla vycházet z těchto rozdílů. Diferencovaný přístup k léčbě byl ukázán i na příkladu nemocných s DLBCL, u kterých byla potvrzena přestavba zahrnující onkogen MYC. Vzhledem k nepříznivé prognóze by měla být zvažována možnost intenzivního léčebného režimu shodného s léčebným režimem pro Burkittův lymfom. Komplex nových poznatků zahrnuje i informace o významu studia mikroprostředí nádoru, které může být také cílem specifické léčby DLBCL. Byly studovány epigenetické změny, především role microRNA v lymfomogenezi a mutace klíčových genů, které vedou k aktivaci signální dráhy NF- κ B a B buněčného receptoru (BCR). Byly navrženy algoritmy pro imunohistochemickou subklasifikaci DLBCL. Prognostický význam této subklasifikace definující CG a non-CG fenotyp byl řadou studií potvrzen před zavedením biologické léčby. V éře biologické léčby jsou výsledky tohoto prognózování poněkud kontroverzní. V přehledném sdělení se soustředíme na současné poznatky o významu a roli chromosomových změn u DLBCL a na příkladech vlastních výsledků budeme prezentovat souhrn současných cytogenetických a molekulárně cytogenetických nálezů od primárních translokací, které již mají jasně stanovený biologický a klinický význam, až po sekundární chromosomové změny, které jsou nejčastěji spojovány s progresí onemocnění. Cílem sdělení je ukázat současné poznatky o molekulární patogenezi B-NHL a o možnostech využití těchto poznatků v rutinní klinické praxi. Práce je podporována granty: IGA NT 11103, MŠMT 6198959205, LF UP 1000-004.

2020.

Moderní léčba rizikových nemocných s difúzním B-velkobuněčným lymfomem – prostor ke zlepšení jejich přežití

Papajík Tomáš, Kubová Zuzana, Procházka Vít, Jarošová Marie, Flodr Patrik, Indrák Karel
(*Hemato-onkologická klinika LF UP, Olomouc; Ústav patologie LF UP, Olomouci*)

Difúzní B-velkobuněčný lymfom (DLBCL) tvoří až 40% ze všech ne-hodgkinských lymfomů v Evropě. Me-

dián věku nemocných při stanovení diagnózy se pohybuje kolem 65 let, až dvě třetiny nemocných mají pokročilé stádium choroby a podle mezinárodního prognostického indexu (IPI) má zhruba stejný počet nemocných přítomno 2 a více rizikových faktorů. Ve skupině mladších nemocných je do skupiny s vyšším rizikem řazeno téměř 50% pacientů. Imunochemoterapie s použitím rituximabu (R) zlepšila léčebné výsledky u všech skupin nemocných, chemoterapie R-CHOP se stala standardem léčby většiny z nich. Tato terapie však u rizikové skupiny nemocných dosahuje suboptimálních výsledků a dlouhodobé přežití se pohybuje jen kolem 50%. Řada prognostických indikátorů (imunohistochemický obraz, identifikace genetických změn, beta-2-mikroglobulin, sérová tymidinkináza) může vhodně doplnit konvenční prognostické ukazatele (IPI) a identifikovat nemocné s vysokým rizikem léčebného selhání. Také funkční vyšetření pomocí 18F-FDG PET/CT indikované časně po zahájení terapie může napomoci vytipovat nemocné, kteří na podanou terapii nereagují optimálně. Intenzifikace léčby u těchto nemocných může překonat rezistenci nádorových buněk a vhodně zvolená terapeutická taktika může vést k dosažení kompletní remise choroby a dlouhodobému přežití. I v éře imunochemoterapie s použitím R má své místo v léčbě 1. linie u mladších nemocných s DLBCL vysoce-dávkované terapie s podporou autologních kmenových buněk. Jak naznačují data francouzských a italských studií, ale i data z českých center je tento postup stále významnou nadějí mladších rizikových pacientů na vyléčení jejich choroby. Práce byla podporována grantem IGA NT 11103, grantem MŠMT 6198959205 a interním grantem UP č. LF-2011-006.

2032.

Význam a přínos metody arrayCGH pro prognostickou stratifikaci difúzního velkobuněčného lymfomu (DLBCL)

Chytilíková Radka, Urbánková Helena, Papajík Tomáš, Kubová Zuzana, Holzerová Milena, Pikalová Zuzana, Flodr Patrik, Indrák Karel, Jarošová Marie
(*Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc; Ústav patologie FN a LF UP, Olomouc*)

Difúzní velkobuněčný B-lymfom (DLBCL) je nejčastějším typem nehodgkinských lymfomů a tvoří více než 30% všech lymfoidních malignit. Vzniká de novo nebo je výsledkem transformace z jiného lymfoproliferativního onemocnění. Akceptovaná prognostická stratifikace založená na výsledcích genové exprese odlišuje tři prognostické podskupiny. Podskupinu GCB-DLBCL s expresí genů buněk germinálního centra, ABC-DLBCL s expresí genů aktivovaných B lymfocytů a PMBL, primární mediastinální B-lymfom. Stratifikace má prognostický význam, protože 5ti-leté přežívání dosahuje 64% PMBL a 59% GCB DLBCL, ale jen 30% ABC DLBCL. Cílem studie bylo zjistit výskyt a frekvenci nebalancovaných chromosomových aberací pomocí metody arrayCGH a doplně-

ním výsledky klasické cytogenetiky, FISH a imunohistochemie se pokusit se o prognostickou stratifikaci nemocných. Vyšetřený soubor 41 pacientů (22 mužů a 19 žen, medián věku 48) tvořilo 35 pacientů s histologickou diagnosou DLBCL a 6 pacientů s diagnosou PMBL. Ve skupině DLBCL byli vyšetřeni 4 pacienti s DLBCL, u kterých byla prokázána Richterova transformace z jiného typu lymfoproliferativního onemocnění. DNA pro array-CGH byla izolována u 29 pacientů z nádorových buněk uzliny, u 2 pacientů z buněk nádorové tkáně, u 2 pacientů z buněk periferní krve a u 8 pacientů z buněk kostní dřeně s prokázanou infiltrací nádorem. Detailní analýza arrayCGH ukázala nejčastější delece na chromosomech 13 a 17p, nejčastější zmnožení genetického materiálu chromosomů 7, 8, 9p a 12q. Metodou FISH byly vedle nebalancovaných aberací nalezeny také reciproké chromosomové translokace, nejčastěji translokace t(14;18). U všech pacientů s diagnosou PMBL bylo provedeno vyšetření FISH pro určení počtu kopií genu JAK2. Výsledky byly doplněny nálezy imunohistochemie (CD10, BCL6, Ki67, MUM1/IRF4, BCL2, CD30, CD23). Navrhli jsme prognostické podskupiny nemocných a vyhodnotili klinický průběh onemocnění. Naše předběžné výsledky ukazují nejen významnou roli metody arrayCGH u prognózování DLBCL nemocných, ale potvrdily nezbytnost doplnění výsledky klasické cytogenetiky a FISH, stejně jako imunohistochemického vyšetření nádorové tkáně. Práce je podporována grantem MZČR IGA NT 11103, MŠMT 6198959205 a studentským grantem Univerzity Palackého LF_2010_004.

2042.

Absolutní počet lymfocytů periferní krve jako jednoduchý prediktivní ukazatel u nově diagnostikovaných nemocných s difuzním B-velkobuněčným lymfomem
Kubová Zuzana, Papajík Tomáš, Obr Aleš, Procházka Vít, Kapitáňová Zuzana, Urbanová Renata, Turcsanyi Peter, Raida Luděk, Jarkovský Jiří, Karel Indrák
(Hemato-onkologická klinika LF UP, Olomouc; Lékařská fakulta UP, Olomouc; IBA MUNI, Brno)

Difuzní B-velkobuněčný lymfom (DLBCL) je nejčastějším typem ze všech ne-hodgkinských lymfomů v Evropě. Většina nemocných bývá diagnostikována v pokročilém stádiu choroby a s přítomností řady rizikových faktorů. Ty jsou indikátorem možného nedosažení kompletní remise (CR) standardně dávkovanou chemoterapií (CHT) nebo krátkosti trvání remise. V průběhu posledních 20 let byla testována řada prognostických faktorů, jen některé z nich si však zachovaly výpovědní sílu i v éře imunochemoterapie s použitím rituximabu (R). Cílem naší práce bylo zhodnocení prognostického významu absolutního počtu lymfocytů (ALC) periferní krve u nově diagnostikovaných nemocných s DLBCL sledovaných na našem pracovišti v letech 1995 – 2009. Soubor tvořilo 429 pacientů (212 žen a 217 mužů) s mediánem věku 61 let (19 – 86 let). 237 nemocných (55%) bylo diagnostiková-

no ve stádiu III a IV (Ann Arbor), hodnotu mezinárodního prognostického indexu (IPI) 2 a 3 mělo 181 pacientů (42%), IPI 4 a 5 pak 82 pacientů (19%). Medián ALC byl $1,38 \times 10^9/l$ (0,03 – 14,1). 124 nemocných (29%) mělo hodnotu ALC nižší než $1,0 \times 10^9/l$. Ve skupině nemocných s ALC pod $1,0 \times 10^9/l$ dosáhlo CR 32% pacientů léčených CHT a 68% léčených R-CHT. Ve skupině nemocných s ALC $\geq 1,0 \times 10^9/l$ dosáhlo CR 69% pacientů léčených CHT a 82% pacientů léčených R-CHT ($p < 0,001$). Podobné rozdíly byly pozorovány i ve skupinách rozdělených podle věku (60 let). 5-leté přežití bez události (EFS) bylo ve skupině s ALC pod $1,0 \times 10^9/l$ a léčených CHT 25%, u léčených R-CHT 75%. Ve skupině s ALC $\geq 1,0 \times 10^9/l$ to bylo 57% pro léčené CHT a 83% pro léčené R-CHT ($p < 0,001$). Podobné rozdíly byly zjištěny i pro celkové přežití (OS). Ve skupině léčených R-CHT byly kombinovány hodnoty IPI s počtem ALC. Nemocní s ALC $\geq 1,0 \times 10^9/l$ měli v kategorii IPI 2 jednoznačně lepší 5-leté EFS 94% vs 65% ($p < 0,001$), stejně jako OS 94% vs 64% ($p < 0,001$). V ostatních kategoriích IPI a aaIPI statistické rozdíly ve skupině léčených R-CHT zjištěny nebyly. V jednorozměrné analýze byl ALC, stejně jako věk, stádium III a IV, hodnota Hb, LDH, beta-2-mikroglobulinu, s-tymidinkinázy, IPI, aaIPI, léčba rituximabem a dosažení CR statisticky významným faktorem pro EFS i OS. Vícerozměrná analýza pro skupinu léčených CHT a R-CHT je připravována. ALC je i v éře R-CHT užitečným prognostickým faktorem. Jeho nezávislou výpovědní hodnotu musí prověřit vícerozměrná statistická analýza. Práce byla podporována grantem IGA NT 11103, grantem MŠMT 6198959205 a interním grantem UP č. LF-2011-004.

1939.

Výsledky léčby B-NHL/ALL u dětí a dospívajících protokolem B-NHL BFM 2004

Kabíčková Edita, Sumerauer David, Mejstříková Ester, Vodičková Elena, Pulejkovič Dejan, Kynčl Martin, Kodet Roman, Starý Jan

(Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF a FN Motol, Praha; Oddělení klinické hematologie, 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: B-buněčné nehodgkinské lymfomy (NHL) tvoří 60% všech NHL a jsou nejčastějším typem NHL v dětském věku. Intenzivní chemoterapie, využívaná v léčbě dětských NHL posledních 20 let, výrazně zlepšila prognózu těchto nemocných. Celkové přežití pacientů s NHL bez ohledu na histologický typ a stadium onemocnění kolísá mezi 70-90%. Cíle: Analýza klinicko – patologických dat, zhodnocení léčebné odpovědi a přežití pacientů s B-NHL. Pacienti a metody: V období 2004-2010 jsme na Klinice dětské hematologie a onkologie v Praze léčili celkem 54 dětí s B-NHL. Burkittův lymfom mělo 37 dětí (69%), DLBCL mělo 11 dětí (20%), 6 pacientů (11%) mělo diagnostikovaný primární mediastinální B-NHL (PMBCL).

Ve skupině je 41 chlapců a 13 dívek s mediánem věku v době diagnózy 12 let (2-18). Onemocnění stadia I (St.Judees Staging) měly 4 děti, stadium II mělo 10 dětí, stadium III 33 dětí, stadium IV mělo 7 pacientů. Protokol B-NHL BFM 2004 stratifikuje do pacienty 4 léčebných skupin v závislosti na rozsahu onemocnění a hladině laktátdehydrogenázy. Pacienti nižšího stupně rizika (skupina R1, R2) absolvují 2 nebo 4 cykly chemoterapie, pacienti s onemocněním vysokého rizika (skupina R3, R4) absolvují 5-6 cyklů intenzivnější chemoterapie. Pacienti s PMBCL absolvují 6-7 cyklů chemoterapie. Výsledky: Indukční chemoterapií dosáhlo kompletní remise 52 pacientů (96 %). S mediánem sledování 3 roky (0,5-7) žije bez známek onemocnění 46 pacientů (EFS 83 %, OS 85 %). Příznivou prognózu měli nemocní s lokalizovaným onemocněním (EFS 91 %), EFS pacientů s pokročilým NHL je 80 % ($p = 0,25$). Na závažné infekční komplikace v průběhu chemoterapie zemřeli 3 pacienti (5 %), 1 pacient zemřel krátce po zahájení léčby na rychlou progresi lymfomu. Po ukončené léčbě relabovali 4 pacienti (5-23 měsíců od stanovení diagnózy, medián doby do relapsu 6 měsíců). Tři pacienti zemřeli i přes záchrannou léčbu zemřeli na progresi lymfomu, 1 pacient zůstává 5 let od stanovení diagnózy bez známek onemocnění. U 1 pacientky jsme 2 roky po léčbě PMBCL diagnostikovali sekundární Hodgkinův lymfom (HL). Závěr: Intenzivními BFM protokoly lze vyléčit více než 80% pacientů s B-NHL. Léčbu provází závažné, život ohrožující infekční komplikace. Nepříznivou prognózu na tomto protokolu mají nemocní s primárním mediastinálním B-lymfomem. Podpořeno granty IGA MZ ČR NS/9997-4, NS/10480-3 a výzkumnými záměry MZOFNM2005.

2038.

Hodnocení terapeutické odpovědi pomocí 18F-FDG PET/CT u nemocných s B-buněčnými ne-hodgkinskými lymfomy léčenými imunochemoterapií s použitím rituximabu

Kapitáňová Zuzana, Mysliveček Miroslav, Papajík Tomáš, Buriánková Eva, Procházka Vít, Koranda Pavel, Rusiňáková Zuzana, Henzlová Lenka, Palová Miroslava, Indrák Karel

(Hemato-onkologická klinika LF UP, Olomouc; Klinika nukleární medicíny LF UP, Olomouc)

18F-FDG pozitronová emisní tomografie kombinovaná s výpočetní tomografií (PET/CT) je v současné době nejspolehlivější zobrazovací metoda v hodnocení léčebné odpovědi u nemocných s ne-hodgkinskými lymfomy (NHL). Pokud je PET/CT indikováno v průběhu terapie, může být cenným ukazatelem citlivosti nádoru na podávanou léčbu. Role a prediktivní síla časného PET/CT vyšetření u pacientů s CD20+ NHL léčenými imunochemoterapií není ještě zcela přesně ověřena. Cílem naší práce bylo zhodnocení výsledku časného (ePET) a konečného PET/CT (fPET) vyšetření u nemocných s CD20+ NHL léčenými pomocí chemoterapie a rituximabu (R). V letech 2006 – 2009 by-

lo pomocí PET/CT vyšetřeno 146 nově diagnostikovaných pacientů s NHL. 98 pacientů mělo diagnózu difuzního B-velkobuněčného lymfomu (DLBCL), 30 pacientů diagnózu folikulárního lymfomu (FL) a 18 mělo lymfom z pláštěových buněk (MCL). Medián věku byl 59 let (28 – 80 let). 105 pacientů bylo diagnostikováno ve stádiu III nebo IV (Ann Arbor). 141 pacientů bylo léčeno imunochemoterapií s použitím antracyklinu, 4 nemocní terapií FCR a 1 nemocný pomocí R-COP. 86 nemocných bylo vyšetřeno po 2. nebo 3. cyklu terapie pomocí PET/CT. 47 nemocných bylo ePET-negativní (55%), 39 (45%) ePET-pozitivní. Jako ePET-pozitivní bylo hodnoceno 10 z 14 (71%) pacientů s MCL, 7 z 18 (39%) nemocných s FL a 22 z 54 (41%) jedinců s DLBCL. 1 pacient s MCL a 1 s FL a ePET-negativním nálezem byli na konci terapie fPET-pozitivní, jinak všichni ePET-negativní zůstali i na konci léčby fPET-negativní. Ze skupiny ePET-pozitivních pacientů bylo po léčbě hodnoceno 20 jako fPET-negativních a 17 jako fPET-pozitivních, 2 nemocní nebyli hodnoceni ($p < 0,0001$). Ze skupiny ePET-negativních zrelabovalo 5 nemocných (11%), ze skupiny ePET-pozitivních zrelabovalo či progredovalo 11 pacientů (28%) ($p=0,04$). 15 ze 107 (14%) fPET-negativních zrelabovalo, 14 z 39 (36%) fPET-pozitivních dále progredovalo ($p=0,06$). 3 fPET-pozitivní nemocní se stali PET-negativními po záchranné terapii, 11 fPET-pozitivních zůstalo PET-pozitivními i po této další linii terapie, 9 z nich mělo ePET-pozitivní. Naše výsledky naznačují, že nemocní s ePET-pozitivním nálezem jsou riziková z hlediska nedosažení kompletní remise, relapsu či progresu jejich onemocnění. Otázkou prospektivních studií zůstává, zda tito nemocní mohou profitovat z cíleně indikované intenzifikace léčby. Práce byla podporována grantem IGA NT 11103, grantem MŠMT 6198959205 a interním grantem UP č. LF-2011-006.

XV. KONFERENCE OSETŘOVATELSTVÍ A ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ (SESTERSKÁ SEKCE)

1885.

Mnohočetný myelom – od Šumavy k Tatrám

Minařík Jiří (III. interní klinika FN, Olomouc)

Mnohočetný myelom (MM) je zhoubné onemocnění krvetvorné tkáně. Je charakterizováno tvorbou monoklonálního imunoglobulinu (M-proteinu, paraproteinu) nebo jeho strukturálních komponent (tj. lehkých řetězců kappa nebo lambda) v séru a/nebo moči a souborem příznaků, mezi něž patří především anémie, myelomová kostní nemoc a postižení funkce ledvin. V České republice je v současnosti výskyt 300-400 nových případů ročně, přičemž se jedná o druhou nejčastější hematologickou malignitu, s mediánem věku kolem 63 let. Klinický obraz může být velmi pestrý. Nejčastějším steskem u jedinců s nově zachyceným onemocněním je dlouhotrvající bolest zejména osového skeletu, způsobená postižením kostní struktury nádorovým proce-

sem, nežádka s přítomností patologických zlomenin. Současně bývají přítomny projevy anemického syndromu s dušností, slabostí a únavou, případně též infekční komplikace v důsledku porušené imunitní odpovědi. Diagnostika se opírá o současné zachycení patologických myelomových buněk v odběru kostní dřevě spolu s přítomností M-proteinu v séru a/nebo moči, a o zhodnocení přidružených příznaků – zejména kostního postižení (pomocí zobrazovacích metodik jako je RTG, CT, MRI, eventuelně PET/CT), anémie, postižení ledvin a případně hyperkalcémie. Léčba mnohočetného myelomu zaznamenala v poslední době nebývalý vývoj, zejména díky zařazení autologní transplantace kmenových buněk u mladších jedinců, a v neposlední řadě též díky novým lékům s tzv. „biologickým mechanismem účinku“, jako je například thalidomid, bortezomib či lenalidomid. Výraznou měrou přispívá též léčba podpůrná a úlevová, spočívající v tlumení bolestivého syndromu, prevenci infekčních komplikací a úpravě funkce postižených tkání a orgánů. Přesto zůstává myelom nevyléčitelným onemocněním s nutností dlouhodobé dispenzární péče jak lékařské, tak i ošetrovatelské. Cílem prezentované práce je seznámit s charakteristikou onemocnění, jeho projevy, možnostmi i úskalími diagnostiky a léčby, a rovněž nastínit některé moderní poznatky přispívající k individualizované cílené léčbě této klinické jednotky. Za podpory VVZ MSM 6198959205.

1944.

Změny prožívání po sdělení onkologické diagnózy

Hromková Magdalena, Onderková Alice

(Interní hematoonkologická klinika FN, Brno; Česká myelomová skupina)

Úvod: Onkologické onemocnění nemá vliv jen na jednu osobu, tedy na pacienta, ale postihuje celé páry, rodiny a přátele. Negativní pocity ze změny životního stylu, které u nemocného následuje po sdělení diagnózy, mohou být téměř stejně zdrcující i pro rodinné příslušníky a přátele. Onkologická diagnóza je pro pacienta jeho rodinu a blízké vždy extrémní zátěží. Metoda: Soubor respondentů tvořilo 100 pacientů a 90 blízkých, kteří navštěvují Hematoonkologickou ambulanci. Informace byly získány pomocí anonymních dotazníků. Oslovením respondentů, jak z řad nemocných, tak ze skupiny jejich blízkých mělo za cíl zjistit rozdíly v psychologickém prožívání pacientů a jejich blízkých po sdělení onkologické diagnózy a identifikovat odlišnosti v adaptačních mechanismech využívaných při vyrovnávání se s onkologickou diagnózou. Dotazníky byly vyhodnoceny pomocí třídění 1. stupně. Výsledky: Výsledky šetření ukázaly, že prožívání negativních emocí po sdělení onkologické diagnózy je ve skupině nemocných a blízkých srovnatelné, tedy 81 % a 90 %. Strach, jako nejsilnější pocit označilo 81 % pacientů a 90 % blízkých. Tento pocit přetrvává u obou skupin respondentů více jak půl roku. Také se ukázalo, že 12 % pacientů a 34 % blízkých vnímá návštěvu Hemato-

onkologické ambulance jako nadměrnou psychickou zátěží. Pro 84% pacientů je tato zátěž minimalizována přítomností někoho z rodinných příslušníků. Dále výsledky šetření ukázaly, že onkologickou diagnózu nejčastěji sděluje lékař na ambulanci. Pomoc psychologa byla nabídnuta pouze 10 % pacientů a 7 % blízkých, ale nikdo této možnosti nevyužil. Závěr: Šetření nám potvrdilo, že období po sdělení onkologické diagnózy je pro nemocné i blízké velmi náročné. Cílem péče na hematoonkologické ambulanci by mělo být vytvoření co nejlepšího záze-
mí, s dostatkem informací a kvalitní komunikací, a to jak pro nemocné tak i jejich blízké.

2013.

Pohled pacientů na kvalitu života 1 rok po transplantaci krvetvorných buněk

Kajaba Václav, Koudelková Lucie, Raida Luděk, Trnková Marie, Vítková Jitka, Uvívzlová Eva, Labudíková Monika (HOK FN, Olomouc; FZV UP, Olomouc; 1. interní klinika VFN, Praha)

Kvalita života vztažená ke zdraví patří dnes mezi respektované ukazatele stavu zdraví a spokojenosti pacientů a má svůj význam při zhodnocení benefitu, v tomto případě velmi nákladné, transplantací léčby. Cílem sdělení je zhodnocení kvality života pacientů na olomouckém pracovišti s odstupem 12 měsíců po auto/alogenní transplantaci krvetvorných buněk. Metodika: Celkem jsme korespondenčně oslovili 50 pacientů se žádostí o spolupráci na tomto hodnocení. Nástrojem hodnocení byl standardizovaný dotazník FACT-G doplněný minidotazníkem s doplňujícími otázkami. Vráceno bylo zpět 41 vyplněných dotazníků (81%). Dotazník zjišťoval otázkami somatickou rovinu (malátnost, nevolnost, bolest, únavu), duševní a sociální rovinu (vztahy s rodinou, citová podpora, nervozita, volnočasové aktivity, zaměstnání), duchovní rovinu (smíření se s nemocí, vyrovnání se, obavy ze smrti). Charakteristika souboru: Mezi respondenty převládali muži (2/3), z diagnóz byly zastoupeny nejvíce nemocní s dg. mnohočetného myelomu a non-hodgkinského lymfomu. Téměř 2/3 pacientů bylo starších 50 let a stejná část nemocných podstoupila autologní transplantaci krvetvorných buněk. Ostatní absolvovali alogenní transplantaci krvetvorných buněk, event. se jednalo o tandemovou/retransplantaci. Závěr a diskuze: Ve shodě se zahraničními prameny se ukazuje dlouhodobý dopad závažného onemocnění spojeného s intenzivním léčebným postupem v oblasti sociální – polovina nemocných je rok po transplantaci krvetvorných buněk omezena ve svých každodenních aktivitách a stejná část nemocných ztratila své zaměstnání. Naopak v subjektivním vnímání fyzického stavu dochází k „restitutio ad integrum“. Podrobnější závěry jsou náplní prezentace a pobídkou k dalšímu sledování této problematiky v delším časovém odstupu po auto/alo transplantaci na pracovištích v ČR. Podpořeno grantem NT 11299-6 a LF-2011-006.

2025.

Výskyt plicních a bronchiálních infekcí u pacientů po transplantaci krvetvorných buněk provedených v pokojích s nebo bez HEPA filtrace vzduchu – zkušenosti po prvním roce sledování

Hartl Pavel, Brandejsová Renata, Bystřická Eva, Vokurka Samuel

(Hematologicko-onkologické oddělení, Plzeň; East forum EBMT - NG)

Úvod: HEPA filtrace vzduchu je doporučována v pokojích pacientů během transplantací krvetvorných buněk, obzvláště alogenních. V některých centrech však není HEPA filtrace dostupná a transplantace mohou být bezpečně prováděny nejspíše i v pokojích bez HEPA filtrace vzduchu. Sesterská skupina East Forum EBMT spolupracuje od 1/2010 na observační studii, která si klade za cíl ověřit výskyt plicních a bronchiálních infekcí u pacientů s ohledem na dostupnost HEPA filtrace v transplantačních pokojích. Metodika a pacienti: Sledovací, prospektivní, multicentrická studie. Každý transplantovaný pacient spolupracujícího centra je chronologicky zařazen do sledování. K záznamům dat jsou připraveny monitorovací karty. Sledování probíhá od dne přijetí pacienta k transplantaci do dne +100 po transplantaci. Definice: Plicní nebo bronchiální infekce = klinická (např. kašel, dušnost) nebo radiologická (RTG, CT) známka plicní nebo bronchiální infekce společně se zvýšenou tělesnou teplotou a/nebo zvýšeným CRP. Výsledky prvního roku: Zatím spolupracují 4 centra (Plzeň, Ljubljana, Katowice, Bukurešť) a do 12/2010 bylo registrováno 135 pacientů (muži 55%, věk 57 (22-69) let). Po transplantaci autologní je 52% a po alogenní 48% pacientů. HEPA filtrace vzduchu byl u 17% autologních a 83% alogenních transplantací. Pneumonie byla u 6/135 (4%) pacientů, bronchitida u 1/135 (0,7%) a HEPA filtrace byla u 3/7 pacientů s komplikací (3 pacienti po autologní a 4 po alogenní transplantaci). Diskuze: Dosavadní průběh studie dokládá dobrou spolupráci center. Výskyt plicních a bronchiálních infekcí je zatím obecně malý a objevuje se jak u pacientů bez HEPA tak i s HEPA filtrací. Pokračování ve studii je nutné pro získání spolehlivějších výsledků. Spolupráce je otevřena dalším centrům.

2009.

Zdravotní sestra - nezastupitelný článek v péči o těhotné s myeloproliferativním onemocněním

Krupová Kateřina, Doležalová Magda

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

Myeloproliferativní onemocnění (MPD) mohou také postihovat ženy v reprodukčním věku a to i takové, které ještě nerodily. První skupinu tvoří ženy, které prodělaly závažnou epizodu VTE (venózní tromboembolismus) jako 1. manifestaci MPD. Trombózy se často vyskytují v abdominální oblasti (trombóza v. portae, Budd – Chiari syndrom aj.). Druhou skupinu tvoří ženy již v terapii MPD (nejčas-

těji vzhledem k věku Thromboreductinem), které plánují graviditu. V čem je sestra důležitým článkem? 1. Edukaci nemocné o plánovaném rodičovství. V obou skupinách ženy užívají Thromboreductin, který je v graviditě kontraindikován. Navíc ženy po VTE jsou na dlouhodobé antikoagulační terapii Warfarinem. Gravidita musí být plánována, protože je nutné vysadit Thromboreductin a ženu převést na Intron. Žena je poučena o časně detekci gravidity, tak aby Warfarin byl vysazen do 6. týdne a zahájen LMWH v dávce, kterou určí lékař. 2. Předvedení vysvětlení aplikace Intronu a LMWH Oba léky jsou podávány podkožně a většina žen si aplikuje léčiva sama. Správná aplikace léků je důležitá jak z pohledu účinnosti, tak bezpečnosti. Sestra naučí těhotnou zacházet s intronovým perem a natahovat přesně dávku určenou lékařem. Tato terapie je spojena zejména na začátku s řadou vedlejších účinků chřipkového charakteru, proto doporučujeme aplikaci večer. To stejné platí o LMWH. 1. aplikaci předvádí a provádí sestra na ambulanci. Těhotná je seznámena s principem podávání, které se skládá z následujících kroků: Očistění místa podání, vytvoření řasy, vlastní aplikace. Některé ženy dávají v graviditě přednost podání LMWH do laterální části stehna před oblastí břicha. Důležité je poučení o nutnosti podání LMWH v 24 h intervalech. 3. plánování kontrol a laboratorní vyšetření Sestra objednává do poradny v termínu, který určí lékař. Žena je zvána do poradny pravidelně, z počátku častěji (kontroly KO při Intronu), pak maximálně 1x za 4 týdny. Při každé kontrole se provádí vyšetření KO, D dimeru, event. stanovení antiXa.

1959.

Analýza spokojnosti pacientov s poskytovanou ošetrovateľskou starostlivosťou

Jarolíková Viera

(Klinika hematológie a transfúziológie, Bratislava – SK)

Pacienti s onkohematologickými ochoreniami krvotvorby prežívajú strach, úzkosť, pocit osamelosti a straty kontroly nad svojim životom. Optimálne liečebné prostredie, milý a trpezlivý prístup zdravotníckych pracovníkov predstavuje filozofiu, ktorá sa snaží u pacientov podporiť pocit pokoja a nádeje spojenú s túžbou po uzdravení. Naším cieľom bolo zistiť dotazníkovou metódou spokojnosť pacientov s manažmentom poskytovanej ošetrovateľskej starostlivosti na jednotke intenzívnej hematologickej starostlivosti a transplantačnom centre Kliniky hematológie a transfúziológie LFUK v Bratislave a získať tak odpoveď na otázku: „Je manažment ošetrovateľskej starostlivosti onkohematologických pacientov správny?“ Súčasťou dotazníka bolo aj hodnotenie spokojnosti pacienta s poskytovanou nielen lekárskou a ošetrovateľskou starostlivosťou, ale aj ďalšími aspektmi hospitalizácie ako úroveň stravovania, ubytovania alebo upratovacích prác. Dotazník bol určený pre pacientov, ktorý absolvovali hospitalizáciu na našej klinike za rok 2009/2010. Bol anonymný a obsahoval 20 položiek. Prieskomu sa zúčastnilo 40 respondentov. Boli to pacienti

s akútnymi a chronickými onkologickými ochoreniami krvotvorby v pomere 58% mužov a 42% žien. Veková kategória respondentov bola od 18 a viac rokov a boli zo všetkých regiónov Slovenska. Odpovede na otázky týkajúce sa časového intervalu prijatia na lôžko, prvého kontaktu sestry-pacient pri prijímaní, organizácie denného režimu, ale aj stravy pacienta boli štatisticky vyhodnotené a výsledky boli použité pre skvalitnenie ošetrovateľskej starostlivosti. Pri konečnej analýze a po vyhodnotení dotazníka sme navrhli a zrealizovali odporúčania pre prax, ktoré viedli k zvýšeniu spokojnosti pacienta. Dojem a subjektívne pocity, ktoré v pacientovi zanechal kontakt s ošetrovateľskou starostlivosťou sú tiež jedným z prvkov hodnotenia kvality poskytovanej starostlivosti. Spokojný pacient vytvára v trhovom prostredí konkurenčnú výhodu a zlepšuje i kredibilitu celého zdravotníckeho zariadenia.

4th SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY I. - LEUKEMIA & LYMPHOMA

Prediction of success or failure of treatment with imatinib and the second-generation tyrosine kinase inhibitors in patients with CML

Milojkovic Dragana (London – UK)

Abstrakt nedodán

2078.

Development of aggressive acute myeloid leukemia represents multistep process of genetic alteration of tumor suppressors and epigenetic upregulation of key oncogenes

Bašová Petra, Vargová Karin, Burda Pavel, Savvulidi Filipp, Nečas Emanuel, Stopka Tomáš
(*Pathological Physiology and Center of Experimental Hematology, First Faculty of Medicine, Center of Experimental Hematology, Charles University, Prague*)

In the hematopoietic system, formation of the earliest myeloid and lymphoid transcriptional networks essentially depends on the transcription factor PU.1. Recently, PU.1 downregulation has been found to associate with oncogenesis (Rosenbauer 2004). We herein used the PU.1 knockdown mice with decreased expression (~20%) that caused a differentiation blockade and development of acute myeloid leukemia (AML) (Rosenbauer 2004). More aggressive behavior and earlier onset of AML was observed in the PU.1 knockdown mice containing p53-deficient background. This was associated with activation of genetic program of key hematopoietic oncogenes whose in vitro inhibition (using siRNA approach) restored PU.1 mRNA levels. This indicated critical importance of manipulating PU.1 level for the transcriptome reprogramming of leukemia cells and consequently for the patho-

genic cell phenotype in AML. Grant support: IGA 10310-3, MSMT 2B06077, SVV-2010-254260507.

2079.

Expression of microRNA miR-155 in lymphoproliferative disorders

Hušková Hana, Bašová Petra, Vargová Karin, Seibertová Katarina, Karban Josef, Trněný Marek, Stopka Tomáš
(*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*)

Lymphoproliferative disorders is heterogenous class of diseases characterized by proliferation of a malignant lymphoid clone. MicroRNA miR-155 was found to be a key molecule that can drive lymphoproliferation in mouse (Costinean 2006) and its levels were found to be elevated in certain leukemia and lymphoma types in humans (Kluiver 2005, Eis 2005, Zhao 2010). MiR-155 downregulates expression of its target genes, among them PU.1, a hematopoietic transcription factor important for hematopoietic differentiation (Vigorito 2007). Expression of the gene encoding miR-155, known as MIR155HG, is controlled by several transcription factors, among them MYB, a member of an oncogenic E-box protein family (Vargova 2011). In our study we measure levels of miR-155, PU.1 and other genes in lymph nodes of patients with chronic lymphocytic leukemia (B-CLL, N=12), marginal zone lymphoma (MZL, N=11), mantle cell lymphoma (MCL, N=7), follicular lymphoma (FL, N=23), diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL, N=24), DLBCL transformation (N=7) and Hodgkin lymphoma (HL, N=22). This study provides first comprehensive study to determine levels of miR-155 among major classes of lymphoproliferative disorders that may provide important implications for their pathogenesis and molecular diagnosis. Grant support: IGA 10310-3, MSMT 2B06077, SVV-2010-254260507.

2077.

Regulation of miR-155 host gene in chronic lymphocytic leukemia

Vargová Karin, Čuřík Nikola, Burda Pavel, Bašová Petra, Kulvait Vojtěch, Pospíšil Vít, Zikmund Tomáš, Klapalová Martina, Obrtlíková Petra, Mráz Marek, Pospíšilová Šárka, Mayer Jiří, Trněný Marek, Stopka Tomáš
(*First Faculty of Medicine and Center of Experimental Hematology, Charles University, Prague; Department of Internal Medicine - Hematooncology, University Hospital, Brno and Medical Faculty, Masaryk University, Brno; First Medical Department - Hematology, General Faculty Hospital, Prague*)

Elevated levels of microRNA miR-155 represent a candidate pathogenic factor in chronic B-lymphocytic leuke-

mia (B-CLL). In this study, we present continuation of the project that identified MYB (v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog) overexpression in a subset of B-CLL patients (Vargova et al 2011). MYB physically associated with the promoter of MIR155 host gene (MIR155HG, also known as BIC, B-cell integration cluster) and stimulated its transcription. This coincided with the hypermethylated histone H3K4 residue and spread hyperacetylation of H3K9 at MIR155HG promoter. Our data, on further extended set of B-CLL patients (NPTS = 169), provide supportive evidence of oncogenic activities of MYB in B-CLL that include its stimulatory role in MIR155HG transcription. Grant support: IGA 10310-3, MSMT 2B06077, SVV-2010-254260507.

2048.

The role of NFkappaB signaling pathway – potential prognostic and predictive factor in diffuse large B-cell lymphoma

Flodr Patrik, Kubová Zuzana, Papajík Tomáš, Tichý Michal, Sedláková E., Šváchová M.

(Department of Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and Faculty Hospital, Olomouc; Department of Hemato-oncology, Faculty Hospital, Olomouc)

DLBCL constitutes app. 30-40% of non-Hodgkinlymphomas Armitage et al. (1998). Few studies used an immunohistochemical detection for a stratification of DLBCL Colomo et al. (2003). Two major patterns of gene expression by gene array technology have been proposed, Alizadeh et al. (2000) dividing into prognostically significant subgroups in a Germinal centre B-cell-like (GCB) and an Activated B-cell-like (ABC) DLBCL. Expected 5-year over-all survival in GCB and ABC DLBCL is app.70%, 39% resp. (WHO 2001). First publication describing NFkappaB pathway is mentioned in 1986 (Sen et al.) and comprises family of transcription factors with an important role in a cell proliferation, antiapoptotic function and differentiation. NFkappaB signaling pathway is referred to as a central mediator of an immune response and controls the expression of many proteins. NFkappaB signaling pathway regulates survival of normal and malignant B-cells by controlling the expression of cell death regulatory genes (Karin et al. 2002). Constitutive activation of NFkappaB signaling pathway may contribute to the lymphomagenesis of DLBCL. The sorting in GC and post-GC DLBCL group from FFPE tissue blocks with an application of indirect immunohistochemistry was carried out according the immunoprofile as detected in GC and non-GC B-cells. So-called “Hans classifier“ encompasses CD10, Bcl6 and MUM1/IRF4. The GC group was signed if detected positive expression of CD10 and BCL6 and negative expression of MUM1/IRF4 and non-GC group sorting in a vice versa manner. During the activation of NFkappaB pathway free NFkappaB monomers translocate to the nucleus and nuclear positivity is observed in particular DLBCL groups.

In our pilot file of DLBCL cases (n=76) we evaluated expression of NFkappaB (p50, p52, p65) in GC (n=14), non-GC (n=15) and “grey-zone” types (n=47) with detected nuclear localization of NFkappaB expression (n=57, 7, 15 resp.) without clear-cut linkage to the three mentioned groups of DLBCL. Currently extended file (n=112) is being sorted according to our design both in conventional tissue blocks and tissue microarray (TMA) and we expect at least analogous heterogeneity of expression NFkappaB of evaluated cases. Described assay is a part of “translation research” in DLBCL which may play an important role in sorting of DLBCL and a potential role in “tailored therapy” in particular cases of the DLBCL disease. Supported by MSM 6198959205 and IGA NT11103.

1867.

Immune profile of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alpha – the clinical context

Rohoň Peter, Kreutzman Anna, Faber Edgar, Indrák Karel, Voglová Jaroslava, Flochová Emília, Porkka Kimmo, Mustjoki Satu

(Dpt. Hemato-oncology University Hospital, Olomouc; Hematology Research Unit, Biomedicum Helsinki, Helsinki University Central Hospital (HUCH), Helsinki – Finland; 2nd Department of Internal Medicine, University Hospital, Hradec Králové; Department of Hematology and Transfusiology, University Hospital, Martin – SK)

Interferon alpha (IFN- α) was the treatment of choice before the era of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and prolonged survival of responding patients. Recent studies suggest that combination of IFN- α with TKI improves therapy outcome. The mechanism of action of IFN- α therapy is incompletely understood; the drug exerts both direct cytotoxic and immunomodulatory effects on leukemic cells. Our study population consisted of CML patients treated with IFN- α monotherapy (n=10) and CML patients who had discontinued IFN- α therapy but remained in remission for >2 years (n=9). None of the patients were previously treated with TKI therapy. Lymphocyte populations in all groups were characterized with comprehensive immunophenotyping panels. The clonality of T-cells was analyzed by a TCR γ/δ rearrangement assay by PCR. Lymphocytes were further sorted into CD3+ TCR $\alpha\beta$ + and CD3+ TCR γ/δ + populations. Additionally, plasma levels of 25 cytokines were measured with a multiplex bead-based cytokine assay (Luminex®). We observed that the proportion of NK-cells from lymphocytes was significantly increased in IFN- α discontinued patients (median 26%, range 18-51%) compared to healthy volunteers (11%, 5-21%) or patients on IFN- α therapy (12%, 6-31%) (P=0.0005). Clonal TCR γ/δ rearrangements were observed in 18 of 19 (95%) In both IFN- α CML patient groups a unique rearrangement pattern was observed: 14/19 (79%) of patients had the V γ 9 gene clonally rearranged. Our results show that IFN- α treatment

induces distinct changes in the immunoprofile of CML patients. Patients who had successfully discontinued IFN- α therapy differed markedly from healthy controls. IFN- α therapy was associated with increased numbers of NK-cells and clonal $\gamma\delta$ + T-cells. These cells possess potent anti-leukemic activity and may contribute to the prolonged therapy responses in this group of patients. This work was supported by student project LF-2011-006 of the Palacky University and MSM 6198959205

EDUKAČNÍ SEKCE MNOHOČETNÝ MYELOM

2085.

Genetic profiling myeloma: prognostic stratification and individualized therapies

Van Ness Brian

(*Institute of Human Genetics, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota – USA*)

The advent of new technologies, such as gene expression profiling (GEP), spectral karyotyping, fluorescence in situ hybridization (FISH), comparative genomic hybridization (cGH), single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping, and micro-RNA profiling, has provided critical tools that define myeloma in details not possible 10 years ago. The goal is to manage and integrate information from individual genomes to direct the process of clinical decisions and drug design. In 2009 the International Myeloma Working group developed a consensus on molecular classification of myeloma. The consensus began with acknowledgement that myeloma is a heterogeneous disease involving interaction between host factors and features intrinsic to each individual's clonal tumor cells. The advent of more refined cytogenetic techniques and high throughput genomics technologies provided a more detailed look at the complexities, with greater appreciation for some of the oncogenic events leading to a disease that shows highly variable outcomes. There are, however, some recurring themes that have led to use of genetic markers in determining likelihood of a better or worse outcome for patients with a new MM diagnosis. The validity of prognostic factors has been tested predominantly in the new diagnosis setting, whereas the inherent genetic instability may shift expression of prognostic factors, especially when considering relapse or highly refractory disease. Thus, genetic factors will be discussed that can form the basis of prognostic stratification of importance to the practicing physician who can use this information to choose from alternative therapeutic approaches. The prognostic classification is also essential for understanding the composition of patients entered into clinical trials, to provide cross comparisons of therapeutic efficacy. As we gain further insight into the pathogenic subgroups, targeted individual therapy becomes more likely. New emerging technologies will be presented, such as whole genome sequencing, and this will create new challenges and opportunities in defining individual treatment options.

Optimizing the use of novel drugs: benefit vs. toxicity

Speaker to be appointed

The new treatment options in multiple myeloma

Benedetto Bruno (*Torino – Italy*)

Abstrakt nedodán.

XV. KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ A ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ (SESTERSKÁ SEKCE 2)

2061.

Experimentálna liečba chronickej myelocytovej leukémie

Rohoň Peter, Faber Edgar, Skoumalová Ivana, Indrák Karel
(*Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc*)

Chronická myelocytová leukémia (CML) je zhubné myeloproliferatívne ochorenie, ktoré má pôvod v kmeňovej pluripotentnej krvotvornej bunke s prevažujúcou proliferáciou myeloidného radu. Typickou a diagnostickou zmenou je prítomnosť chromozómu Philadelphia (Ph), ktorý je výsledkom translokácie t(9;22). V priebehu choroby sú popisované 3 fázy: chronická, akcelerovaná a blastová kríza. Incidencia CML sa pohybuje medzi 1-2/100 000 (priemerný vek pri diagnóze je 50 rokov). V súčasnosti sa v liečbe CML používajú inhibítory tyrozínových kináz, imatinib mesylát a lieky tzv. 2. línie: dasatinib a nilotinib. Cieľom prednášky je ukázať nové (experimentálne) možnosti liečby CML. Z pohľadu možnosti ovplyvnenia rôznych úrovní toku genetickej informácie v leukemickej bunke je možné rozlíšiť molekuly s účinkom na DNA a mRNA (úroveň genómu) a na proteíny. Odlišným prístupom v liečbe je využitie tzv. anti-CML vakcín.

1898.

Sebepéče u nemocných s GvHD po alogénnej transplantácii

Šturmová Adéla, Halmo Renata, Kabátová-Maxová Klára
(*Hemato-onkologická klinika-Transplantačná jednotka, FN, Olomouc; Fakulta humanitných vied, UTB, Zlín; Hemato-onkologické odd., FN, Plzeň*)

Prezentace se zabývá úrovní činností sebepéče u pacientů s GvHD po alogénnej transplantácii. Alogénnej transplantace je moderní léčebnou metodou hematologických malignit, která přináší velkou šanci na úplné uzdravení. Nemocným ale také může přinášet velkou zátěž v souvislosti s komplikacemi, které mohou nastat. Častou a závažnou komplikací je právě GvHD (Graft versus Host Disease, nemoc štěpu proti hostiteli). Prezentace mapuje problémy nemocných s GvHD po alogénnej transplantácii, přehledně představuje projevy, stadia, diagnostiku, léčbu, prognózu a komplexní péči o klienty s GvHD. Jejím ob-

sahem je odvození vlivu GvHD na požadavky sebezpečí Oremové a sestavení situační potřeby sebezpečí u pacientů s GvHD. Těžší práce tvoří dotazníkové šetření ve Fakultní nemocnici Olomouc a Plzeň, které je zaměřené na zjištění kompetencí sebezpečí u pacientů s GvHD v oblasti znalosti onemocnění, výživy a vyprazdňování. Analýza a interpretace získaných dat umožní srovnat sebezpečí pacientů s GvHD v těchto zdravotnických zařízeních. Na základě výsledků z výzkumného šetření je sestaven edukační program na problematiku GvHD a vytvořen informační materiál pro klienty s GvHD. Získané výsledky mohou přispět ke zlepšení péče o klienty s GvHD po alogenní transplantaci.

2001.

Evaluace spirituální péče a potřeb pacientů

Čermáková Markéta, Řehořová Iva, Heiderová Alena
(1. interní klinika VFN a 1. LF UK, Praha)

Úvod: V červnu 2008 byla na 1. interní klinice VFN a 1. LF UK zavedena duchovní péče (klinická pastorační péče). Již od počátku jsme usilovali o to, aby to byla péče profesionální a aby její provádění bylo souladu s evropskými standardy. Jedná se tedy o péči, která je poskytována nejen pacientům a jejich rodinám a blízkým, ale i zdravotnickému personálu. Již od počátku jsme směřovali k začlenění duchovní péče do komplexní péče o pacienta. Abychom si ověřili, že jdeme dobrou cestou, rozhodli jsme se po necelém půl roce fungování této služby udělat dotazníkový průzkum mezi pacienty. Cíl: Zjistit, jak je duchovní péče přijímána a hodnocena pacienty. Získat podněty pro zlepšení případně změny této služby. Metoda: Na podzim roku 2008, zhruba po půl roce fungování duchovní péče, jsme ve spolupráci se všeobecnými sestrami provedli dotazníkový průzkum mezi hospitalizovanými pacienty. Každý pacient vyplňoval dotazník pouze jednou. Výsledky: Dotazník vyplnilo 61 pacientů, 24 žen a 37 mužů. Věk respondentů byl spíše vyšší – zhruba polovina byla starší 60 let. Zjišťovali jsme, jestli pacienti vědí o tom, že je na oddělení poskytována duchovní péče a z jakých zdrojů se o ní dozvěděli. Valná většina nemocných (49 z 61) o duchovní péči věděla. Hlavním zdrojem informací byla návštěva kaplany, dále pak ostatní pacienti a samozřejmě i zdravotníci – jak lékaři tak sestry. Výrazná většina (48 z 49) respondentů byla se službou spokojena. Pacienti dále vyjadřovali subjektivní potřebu duchovní péče - odpovědi: potřebuji 3, vítám 33, nepotřebuji 29, vadí mi 0. Hlavní oblastí, kterou se zabývá duchovní péče, je smysl života, aktuální životní situace atp. O tomto tématu přemýšlí 43 pacientů, 21 uvedlo, že o smyslu nepřemýšlí. Mapovali jsme také, jaké mají nemocní duchovní potřeby: potřeba otevřenosti 26, potřeba přátelství a přijetí 22, potřeba vřelé a klidné atmosféry 25, potřeba účastnit se dění 28, potřeba prožít smutek 2, potřeba sdílení 5, nemám uvedené potřeby 17 respondentů. Dále jsme se ptali na náboženské potřeby pacientů – některou z těchto potřeb uvedlo 18 respondentů, 48 nemoc-

ných tyto potřeby nemá. Závěr: Duchovní péče na naší klinice funguje už bezmála 3 roky a funguje dobře. Průzkum ukázal, že i pacienti, kteří deklarují, že jsou nevěřící a nemají náboženské potřeby, mají duchovní potřeby a duchovní péči vítají. I proto myslíme, že naše úsilí stálo za to a volba zavést tuto službu byla správná a můžeme ji doporučit ostatním pracovištím.

2059.

Srovnání úrovně vzdělání a praxe sester na transplantacích jednotkách v rámci ČR a možnosti vzdělávacího systému oboru ošetrovatelské péče

Labudíková Monika, Koukalová Alena, Kajaba Václav, Kabátová-Maxová Klára, Bystřická Eva, Vylitová Lucie, Pavlicová Vladislava, Zítková Marie, Hrabánková-Navrátilová Darja, Kučerová Marie
(Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; HOO, Plzeň; ÚHKT, Praha; FN, Hradec Králové; IHOK, Brno; VFN, Praha; FNKV, Praha)

Česká republika patří mezi přední evropské země v počtu provedených transplantací krevetvorných buněk. V porovnání s ostatními zeměmi východního bloku vykazuje nejvyšší transplantacní aktivitu vzhledem k počtu obyvatel (rates per 10 mil obyvatel). V roce 2009 se uskutečnilo v ČR 537 transplantací krevetvorných buněk a to v 10 transplantacních centrech. Z tohoto počtu šlo o 210 alogenních a 327 autologních transplantací. Průzkum /3/2011/ předkládá srovnání věku sester, úrovně vzdělání a praxe sester na jednotlivých transplantacních jednotkách v rámci uvedených center v ČR. Soustředí se na analýzu jednotlivých faktorů a srovnává kalendářní věk, dosaženou praxi na dané transplantacní jednotce, úroveň dosaženého vzdělání a pracovní pozice všeobecných sester v jednotlivých zařízeních. Cílem uvedeného průzkumu je popis vzdělávacího systému, jeho nynější transformace a možnosti celoživotního vzdělávání nelékařského personálu na transplantacních jednotkách v České republice. Použitou metodou výzkumu je dotazníkové šetření zdravotnického personálu v jednotlivých transplantacních centrech /TC/. Ve třech případech /UHKT Praha, IHOK Brno a FNKV Praha/ je personál TC spojen s personálem JIP. Celkem v TC ČR pracuje 148 osob nelékařského personálu, z toho 115 sester včetně zdravotnických asistentů. Nejpočetnější věkovou kategorií sester až 50 % tvoří skupina od 23 do 35 let. S poskytováním vysoce specializované péče při výkonech jakou transplantace krevetvorných buněk je, souvisí i stupeň vzdělání všeobecných sester a nyní i transformace na vysokoškolskou úroveň (Bc., Mgr.). Přesto probíhá tento trend vzdělávání stále duplicitně také na vyšších odborných školách (DiS). Do praxe nyní přicházejí i praktické sestry, které pracují v pozicích asistentů všeobecných sester s VŠ a VOŠ vzděláním. Dotazníkovým šetřením jsme také identifikovali problémy, které uvádí vrchní sestry jako největší problémy při nástupu nového nelékařského personálu. Jsou to: nedostatek sester na trhu práce pro tato specializovaná pra-

coviště, vysoká psychická a fyzická zátěž, nedostateční finanční ohodnocení a především nedostatečná pregraduální příprava k nelékařskému povolání v tomto oboru. Pro hematologické obory by se měla příprava k nelékařskému povolání zaměřit na pregraduální přípravu a postgraduální formy celoživotní vzdělání.

2023.

Prevenia nozokomiálních nákaz z pohľadu sestry na KHaT UNB

Kováčová Monika

(*Klinika hematologie a transfuziologie UNB, Bratislava – SK*)

Nozokomiálna nákaza je každá infekcia exogénneho alebo endogénneho pôvodu, ktorá vznikla v príčinnej súvislosti s pobytom osôb v ambulantom alebo lôžkovom zdravotníckom zariadení z diagnostických, terapeutických alebo epidemiologických príčin. Pôvodcom nozokomiálnych nákaz sú baktérie, vírusy, huby a helminty. Na onkohematologickom oddelení je pacient vystavený vysokému riziku vzniku nozokomiálnej infekcie z viacerých dôvodov. Je dlhodobo hospitalizovaný, imunodeficientný, má zavedený centrálny venózy katéter alebo intravenózu kanylou, permanentný močový katéter, absoluuje množstvo invazívnych výkonov, ktoré sú hlavné rizikové faktory pre vznik nákazy. Preto sú veľmi dôležité preventívne opatrenia, ktoré majú za úlohu zabrániť, resp. znížiť na minimum riziko vzniku týchto infekcií. V snahe zlepšiť situáciu na našom pracovisku sme zaviedli štandardné kroky v boji proti nozokomiálnym nákazám. Keďže sestra je v neustálom kontakte s pacientom, má kľúčovú úlohu v tomto boji. Prezentácia sa zameriava na konkrétne kroky smerujúce k zníženiu výskytu nozokomiálnych nákaz na KHaT UNB.

1953.

Využití softwarového programu NutriDan na Hematoonkologickém oddělení

Smolová Lada, Fatková Romana, Müllerová Dana

(*Odd. Klinické dietologie, FN, Plzeň; Odd. Klinické dietologie, FN, Plzeň; Ústav hygieny LF UK, Plzeň*)

Pro práci nutričního terapeuta na Hematoonkologickém oddělení, je důležité zjišťování nutričního příjmu pacientů. Pro tento přehled slouží softwarový program NutriDan, umožňující energetický i biologický rozbor denního příjmu pacienta, možnost porovnání výživových změn v průběhu delšího časového období, nutriční edukace nemocného a vyhodnocování skupin nemocných z hlediska výživy či stravovacích zvyklostí.

**4th SYMPOSIUM ON ADVANCES
IN MOLECULAR HEMATOLOGY
II. - REGULATION
AND DYSREGULATION
OF HEMATOPOIESIS**

What have we learned from the germline and somatic mutation causing polycythemic disorders

Prchal Josef (*Salt Lake City, Utah – USA*)

Abstrakt nedodán

2081.

Iron and heme: their exquisite relationship makes blood red

Poňka Přemysl

(*Lady Davis Institute for Medical Research, Jewish General Hospital and Departments of Physiology and Medicine, McGill University, Montreal, QC - Canada*)

Erythroid cells, which have a capacity to obtain and process iron with astonishing efficiency, are capable of concentrating iron (in the form of heme in the red cell) approximately 7000-fold what is present in the plasma (as diferric transferrin; Fe₂-Tf). The transfer of iron into hemoglobin occurs extremely efficiently, since mature erythrocytes contain about 45,000-fold more heme iron than non-heme iron. Hence, in erythroid cells the iron transport and heme biosynthetic machineries are fully integrated and are part and parcel of one metabolic pathway. The delivery of iron (Fe) to erythroid cells occurs following the binding of Fe₂-Tf to its cognate receptors on the cell membrane. The Tf-receptor complexes are then internalized via endocytosis, and Fe is released from Tf by a process involving endosomal acidification. Iron, following its reduction to Fe²⁺ by Steap3, is then transported across the endosomal membrane by the divalent metal transporter, DMT1. The post-endosomal path of Fe within cells remains elusive or is, at best, controversial. In erythroid cells, more than 90% of iron must enter mitochondria since ferrochelatase, the final enzyme in the heme biosynthetic pathway that inserts Fe²⁺ into protoporphyrin IX, resides on the matrix side of the inner mitochondrial membrane. In erythroid cells, strong evidence exists for a specific targeting of Fe toward mitochondria: when protoporphyrin IX synthesis is suppressed iron continues to flow into mitochondria. Based on this, we have formulated the hypothesis that in erythroid cells a transient mitochondrion-endosome interaction is involved in Fe translocation to its final destination and have collected experimental support for this proposition (Zhang et al. *Blood* 105:368, 2005; Sheftel et al. *Blood* 110: 125, 2007).

2058.

HIF2-alpha G537R mutation is associated with in vitro hypersensitivity of erythroid progenitors to erythropoietin in patients with familial erythrocytosis

Kučerová Jana, Pospíšilová Dagmar, Horváthová Monika, Naušová Jitka, Divoký Vladimír

(Dpt. of Biology and Dpt. of Pediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc)

Polycythemia/erythrocytoses in childhood are rare and may be a result of various pathophysiological conditions. Primary polycythemia was reported in children with congenital mutations in erythropoietin receptor (EPOR) and rarely with acquired mutations in JAK2. Homozygous recessive mutations in von Hippel-Lindau (VHL) gene lead to polycythemia, which exhibits features of both primary and secondary polycythemia. Recently described polycythemic patients with mutations in PHD2 and HIF2-alpha (HIF2A) were reported to have elevated serum EPO levels; the information on in vitro sensitivity of their erythroid progenitors to EPO is missing or incomplete. We studied a group of 8 children diagnosed in Czech Republic in years 1990 – 2010 with signs of primary polycythemia. Three patients were clinically asymptomatic, five patients had plethora. Hematopoietic colony assay using H4531 media (StemCell Technologies) was performed to determine in vitro sensitivity of erythroid progenitors to EPO. Mutation analysis included sequencing of JAK2, EPOR, HIF2A, HIF1A, VHL and PHD2 genes. All patients exhibited in vitro hypersensitivity of erythroid progenitors to EPO, seven samples were also positive for the growth of endogenous erythroid colonies (EECs). A known heterozygous 5967insT EPOR mutation [1] was found in two unrelated patients. Other two unrelated and clinically asymptomatic patients had previously reported heterozygous mutation in HIF2A, causing G537R substitution [2]. Apart from hypersensitivity to EPO, one HIF2A-mutant patient was also EEC-positive. Their EPO levels were not elevated. The remaining four patients were negative for a mutation in all analyzed genes. The presence of the same G537R HIF2A mutation in two of our patients in combination with independent cases reported by others confirm the suggested mutational hotspot in HIF2A gene. We show for the first time that in addition to VHL-associated polycythemia also erythroid progenitors of patients with HIF2A mutation are in vitro hypersensitive to EPO. We hypothesize that endogenous erythroid EPO production is stimulated by this activating G537R HIF2A mutation leading to augmented activation of EPO/EPOR pathway and excessive erythroid proliferation. Grant Support: The Czech Grant Agency (GACR) P305/11/1745 and LF_2011_011. [1] Kralovics R et al. *Blood*. 1997; 90:2057-61. [2] Percy MJ et al. *Blood*. 2008; 111:5400-2.

2071.

Single dose of cyclophosphamide transiently moves long-term hematopoiesis from bone marrow to the spleen

Šefc Luděk, Sýkora Viktor, Ko-Tung Chang, Savvulidi Filipp, Nečas Emanuel

(Institute of Pathophysiology and Center of Experimental Hematology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague)

Spleen is primarily a lymphoid organ but it produces hematopoietic cells in adult mice as well. Spleen does not contain osteoblastic niches which are considered to be essential for long-term hematopoiesis, and splenic hematopoiesis is assumed to originate mainly from progenitors with low long-term repopulating ability. There can be a considerable increase in extramedullary hematopoiesis in spleen under pathological conditions. We have studied the effect of mobilization with cyclophosphamide on trafficking of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC) from the bone marrow to the spleen, and dependence of normal splenic hematopoiesis on a supply of HSPC from the bone marrow. Mouse congenic models Ly5.1/Ly5.2 were used in the experiments. Kinetics of HSPC in the bone marrow and the spleen after a sublethal dose of cyclophosphamide was measured by clonal assays (CFU-GM and CFU-S – progenitors) and by competitive repopulation assay (short- and long-term repopulating cells, STRC and LTRC). Bone marrow HSPC rapidly but transiently recovered early after cyclophosphamide damage. Secondary decrease in HSPC between 5 and 7 days after cyclophosphamide in the bone marrow was accompanied with significant reduction of SDF-1 mRNA expression, mobilization of HSPC into peripheral blood and their rapid accumulation in the spleen. Spleen thus transiently became the main hematopoietic organ in the mouse by containing 69% of total body progenitors (CFU-S), and also contained significantly more LTRC compared to femur. Selective irradiation of either spleen or bone marrow demonstrated that expansion of extramedullary hematopoiesis in spleen during recovery from cyclophosphamide was fully dependent on supply of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) from the bone marrow. In contrast to bone marrow, homing of hematopoietic cells in spleen was not accompanied with SDF-1 mRNA upregulation. Experiments on parabiotic mice demonstrated rapid colonization of spleen by circulating hematopoietic cells, and contribution of circulating cells to bone marrow hematopoiesis in a smaller but still significant extent. Our results suggest that the spleen has a significant number of niches available to accommodate circulating HSPCs. Beside progenitors it can, at least transiently, support LTRC of bone-marrow origin. Support: Projects LC06044 and MSM 0021620806 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

2073.

5-azacytidine mediates *in vitro* differentiation in myelodysplastic syndrome

Čuřík Nikola, Burda Pavel, Vargová Karin, Pospíšil Vít, Hájková Hana, Bašová Petra, Savvulidi Filipp, Nečas Emanuel, Beličková Monika, Haškovec Cedrik, Čermák Jaroslav, Trněný Marek, Jonášová Anna, Stopka Tomáš
(*First Faculty of Medicine and Center of Experimental Hematology, Charles University, Prague; Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague; First Medical Department - Hematology, General Faculty Hospital, Prague*)

Myelodysplastic syndromes (MDS) represent a group of heterogeneous disorders characterized by ineffective hematopoiesis often progressing into acute myelogenous leukemia (AML) that is strikingly refractory to current therapeutic approaches. DNA demethylation agents such as 5-azacytidine (AZA) represent promising epigenetic therapies in MDS the molecular effects of which are not fully understood. MDS-derived transformed cell lines were treated with AZA and transcriptional program of key hematopoietic factors were monitored. We herein present evidence that AZA while inducing efficiently cell cycle arrest and apoptosis of MDS tumor cells it also stimulates their differentiation commitment by mediating transcriptional derepression of myeloid differentiation program. This is associated with chromatin modification at regulatory regions of the molecular targets of AZA. Significant proportion of primary MDS CD34+ cells is sensitive to AZA-mediated *in vitro* differentiation and display similar chromatin changes observed in model cell lines. Our data collectively support importance of the chromatin structure state and response to AZA as a major factor that regulates differentiation outcome of myelodysplastic cells. * N.C., P.B. K.V. and V.P. contributed equally to this study and are considered as first co-authors. Grant support: IGA 10310-3, MSMT 2B06077, SVV-2010-254260507.

MNOHOČETNÝ MYELOM

1960.

Aktuální stav RMG a navazujících projektů České myelomové skupiny

Maisnar Vladimír, Klimeš Daniel, Pelcová Jana, Kaisarová Petra, Hájek Roman
(*II. interní klinika - OKH, FN a LF UK, Hradec Králové; Institut biostatistiky a analýz, MU, Brno; IHOK, FN a LF MU, Brno*)

Registr monoklonálních gamapatií – RMG a projekt časné diagnostiky mnohočetného myelomu – CRAB v současnosti představují dva hlavní projekty České myelomové skupiny. Důvodem pro vytvoření RMG 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. Sběr dat do registru byl zahájen v roce 2007 a dnes máme k dispozici rozsáhlou databázi, které snese srovnání i ve světovém měřítku, a která nám začíná pomáhat plnit náš hlavní cíl a to další zlepšování péče o nemocné s monoklonálními gamapatiemi. Nově byl od minulého roku systém sběru dat rozšířen o původní tzv. datové lišty, které slouží ke sledování účinnosti „nových léků“ mnohočetného myelomu. Sdělení podává informaci o aktuálním stavu registru v roce 2011, tj. po 4 letech jeho existence. Aktuální stav databáze a počty nemocných zadaných jednotlivými spolupracujícími centry jsou dostupné na webových stránkách CMG – České myelomové skupiny (). Celkový počet evidovaných nemocných již přesáhl 3000, z toho je k datu 25.3.2011 1350 nemocných s MGUS a 1890 nemocných s mnohočetným myelomem. Na zadávání dat do registru se dnes podílí již 15 center v České republice a 2 centra ze Slovenské republiky. Nejdéle sledovanými nemocnými v základních skupinách je žena s MM sledovaná již 30 let a muž sledovaný pro MGUS dokonce již více než 35 let. RMG 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. Sdělení podává přehled dosavadních a současných společných projektů CMG realizovaných s využitím databáze RMG. Pravidelné analýzy databáze RMG mohou být dnes využívány v rámci argumentace při jednání se zdravotními pojišťovnami, farmaceutickými firmami, SÚKL i Ministerstvem zdravotnictví

1995.

Analýza klonality u monoklonálních gamapatií s využitím 8-barevné průtokové cytometrie

Kovářová Lucie, Varmužová Tamara, Zarbochová Pavla, Suská Renata, Štossová Jana, Muthu Raja Karthick Raja, Hanáková Božena, Penka Miroslav, Hájek Roman
(*Oddělení klinické hematologie, PMDV-FN, Brno; Babákův výzkumný institut, LF MU, Brno*)

Úvod Monoklonální gamapatie (MG) se vyznačují přítomností klonálních plazmatických buněk (PC), jejichž zastoupení je odlišné u osob s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS) ve srovnání s pacienty s mnohočetným myelomem (MM). Rozlišení normálních polyklonálních (N-PC) a abnormálních klonálních (A-PC) PC je důležité pro stanovení diagnózy a zejména při sledování pacientů po prodělané léčbě. Analýza exprese povrchových markerů CD19 a CD56 na CD38+CD138+ PC

pomocí průtokové cytometrie umožňuje toto rozlišení již ve 4-barevném nastavení, nicméně tento přístup v některých případech není dostačující. Cíl Zavedení a ověření 8-barevného protokolu pro posouzení klonality plazmocytů a B lymfocytů u vybraných případů monoklonálních gamapatií pomocí průtokové cytometrie. Pacienti a metody Celkem byla analyzována kostní dřev 23 osob s MG (14 pacientů se suspekci na MGUS/MM, 6 MM pacientů po léčbě a 3 MM pacienti s podezřením na relaps/progresi onemocnění). K detekci klonality subpopulací PC a B lymfocytů byla využita 8-barevná průtoková cytometrie kombinující povrchovou a cytoplazmatickou expresi znaků CD38/CD45/cykappa/cylambda/CD138/CD19/CD56/CD27. Výsledky Medián zastoupení CD38+CD138+ PC byl 0,4% (0,04-13,40). U 4 pacientů (2x nová dg., 1x progresse a 1x po léčbě) byly nalezeny pouze N-PC (CD19+CD56-), naopak pouze klonální A-PC (CD19-CD56+/-) byly detekovány u 3 pacientů (1x nová dg., 1x progresse a 1x po léčbě), což potvrdila i analýza cytoplazmatických lehkých řetězců. Zbývající případy byly charakterizovány směsí N-PC a A-PC, nicméně podrobnější analýzou těchto subpopulací pomocí cykappa/cylambda bylo zjištěno, že ve všech CD19-PC a/nebo CD56+PC jsou klonální. Takováto analýza by tedy mohla být velmi užitečná při sledování minimální reziduální nemoci (MRN) a detekci stringentní kompletní remise (sCR). Simultánní analýza 8 znaků navíc ukázala v 5 případech (4x nová dg., 1x po léčbě) přítomnost klonálních zralých naivních i paměťových B lymfocytů a u těchto pacientů by tedy měla být ověřena i případná přítomnost lymfoproliferativního onemocnění. Shrnutí/Závěr Flowcytometrická analýza s využitím 8-barevné kombinace povrchových a intracelulárních markerů může napomoci detekci i malého klonu patologických PC a spolu s analýzou B lymfocytů může být velmi důležitá pro stanovení správné diagnózy a pro případné sledování po léčbě. Podpořeno granty GAČR 301/09/P457, MŠMT LC06027, MSM0021622434, IGA 10408-3, IGA 10406-3 a GAČR P304/10/1395.

2084.

Hladiny párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu u IgG a IgA monoklonálních gamapatií

Pika Tomáš, Heřmanová Zuzana, Lochman Pavel, Zapletalová Jana, Minařík Jiří, Bačovský Jaroslav, Ščudla Vlastimil

(III. interní klinika FNOL, Olomouc; Ústav imunologie, LF UP a FN, Olomouc; Oddělení klinické biochemie a imunogenetiky, FN, Olomouc; Ústav lékařské biofyziky, LF UP, Olomouc)

Úvod: Typickým projevem monoklonálních gamapatií (MG) je přítomnost molekul monoklonálního imunoglobulinu (MIG) v séru a/nebo v moči. Nejnovější metodou pro detekci MIG je systém HevyLiteTM, principiálně založený na užití dvojice specifických protilátek proti junkčním epitopům mezi doménami těžkých a lehkých řetězců (HLC) imunoglobulinu v oblasti konstatních re-

gionů. Cíl: Cílem studie je porovnání hladin MIG vyšetřených pomocí systému HevyLiteTM a elektroforézy séra, s korelací výsledků k aktivitě onemocnění ve skupině IgA a IgG monoklonálních gamapatií. Metody: Skupina MG s IgA izotypem čítala 24 nemocných s mnohočetným myelomem (MM) (18 aktivní, 6 v remisi onemocnění) a 7 jedinců s monoklonální gamapatií nejistého významu (MGUS). Skupina MG s IgG izotypem se sestávala z 30 nemocných s MM (27 aktivní, 3 v remisi onemocnění) a 1 jedince s MGUS. Pro stanovení sérových hladin IgA κ , IgA λ , resp. IgG κ a IgG λ bylo použito systému HevyLiteTM (The Binding Site, UK) a platformy nefelometru BN II (Siemens Healthcare Diagnostics). Výsledky: Nemocní v aktivní fázi onemocnění vykazovali vysoce patologické hladiny dominantního MIG se supresí hladiny alternativního imunoglobulinu a se signifikantní změnou poměru Ig κ /Ig λ . Při srovnání výsledků stanovení MIG pomocí systému HevyLiteTM a elektroforézou séra, Spearmanova korelační analýza potvrdila velmi těsnou korelaci hladin MIG IgA κ ($r=0.946$, $p=0.0001$), IgA λ ($r=0.872$, $p=0.0001$) a stejně tak i IgG κ ($r=0.970$, $p=0.00001$) a IgG λ ($r=0.998$, $p=0.00001$). 8 z 9 nemocných v remisi onemocnění mělo normální hodnoty poměru Ig κ /Ig λ . Závěr: Systém HevyLiteTM slibně doplňuje soubor vyšetření běžně využívaných v diagnostice a sledování MG, zejména v případech velmi nízkých hladin či jen pouhé imunofixační pozitivity. Jeví se i jako vhodná metoda pro potvrzení kompletní léčebné odpovědi MM. S podporou LF 2010013, VZ MSMT CR 6198959205.

2090.

Aktivní klinické studie s udržovací léčbou lenalidomidem organizované Českou myelomovou skupinou v rámci kooperace s European Myeloma Network

Hájek Roman

(Interní hematologická klinika FN Brno a LF MU, Brno)

Naše léčebné strategie byly změněny a nejlepší klinické léčebné protokoly dnešní doby dosahují celkového přežití v 5 letech 80 %, přičemž intenzita léčby ve srovnání s koncem minulého století je menší a tolerance léčby vyšší. Dalším zásadním pokrokem na základě výsledků randomizovaných studií (IFM 2005-2; CALGB 100104) je použití lenalidomidu jako udržovací léčby. Téměř dvojnásobné prodloužení doby do následného relapsu onemocnění nelze vysvětlit protinádorovým účinkem léku. Je to jev pravděpodobně související s imunomodulačními vlastnostmi lenalidomidu. Po ujasnění bezpečného intervalu pro podání udržovací léčby půjde o další skokový pokrok v léčbě mnohočetného myelomu. Česká myelomová skupina ve spolupráci s Fondazione Neoplasie Sangue a European Myeloma Network a italskou koordinuje v oblasti Víšegrádu dvě randomizované klinické studie fáze III. určené nově diagnostikovaných nemocných s mnohočetným myelomem. Třetí randomizovaná

studie je v přípravě s plánovaným zahájením v září 2011. Všechny studie obsahují i udržovací léčbu lenalidomidem. Studie určena pro nemocné vhodné k provedení autologní transplantaci (CMG 2008 junior; protokol RV-MM-EMN-441) srovnává přínos autologní transplantace s přínosem režimu na bázi lenalidomidu. Druhá studie pro nemocné nevhodné k provedení autologní transplantace (CMG 2010 senior; protokol EMN 01) řeší problematiku optimalizace indukčního režimu na bázi lenalidomidu. V obou studiích je provedena i druhá randomizace a je testována udržovací léčba lenalidomidem v monoterapii nebo v kombinaci s prednisonem. Oba léčebné protokoly nabízejí nemocným s nově diagnostikovaným myelomem vysoce účinnou léčbu, v současnosti již s jasným průkazem významného účinku lenalidomidu použitého v udržovací léčbě.

2087.

15 let autologních transplantací u mnohočetného myelomu – zkušenosti jednoho centra

Radocha Jakub

(II. interní klinika – oddělení klinické hematologie LFUK a FN, Hradec Králové)

Úvod: Na našem pracovišti je autologní transplantace standardním postupem v léčbě mladších pacientů s mnohočetným myelomem (MM) již od roku 1996. Pacienti a metody: Retrospektivně jsme analyzovali data všech 286 provedených transplantací u 186 pacientů s MM od roku 1996 do konce roku 2010. Data celkového přežití a doby dogrese byla analyzována s ohledem na stadium, použitý conditioning režim, dosaženou léčebnou odpověď, přítomnost známek renálního selhání a fakt, zda byly použity při léčbě nové léky či nikoli. Výsledky: 271 transplantací bylo autologních (254x Mel200, 17x Mel100), 15 alogenních (13x RIC Bu-Flu-ATG nebo Flu-Cy, 1x myeloablativní Bu-Mel, 1x syngenní dvojče). 10-leté přežití celé kohorty pacientů je téměř 40%. Pacienti s renálním selháním neměli signifikantně kratší přežití ($p=0,22$). Pacienti s režimem Mel100 měli také stejné celkové přežití, stejně jako pacienti, kteří dosáhli kompletní remise, a pacienti léčení signle nebo double transplantací ($p=0,55$, $p=0,31$). Jednoznačně delší celkové přežití bylo dosaženo u pacientů, kteří byli léčeni novými léky ($p=0,0014$). Závěr: Transplantace kmenových buněk zásadně zlepšila prognózu pacientů s mnohočetným myelomem. Je možné říci, že nové léky i v retrospektivní analýze jednoznačně prodlužují celkové přežití pacientů s MM, a to bez ohledu na to, v jaké fázi onemocnění jsou použity.

1975.

Výsledky modifikované „risk-adapted“ autologní transplantace u pacientů s AL amyloidózou – zkušenosti jednoho centra

Špička Ivan, Vacková B., Ryšavá R., Straub J., Kořen J., Trněný Marek

(1st Medical Department – Clinical Department of Haematology, First Faculty of Medicine, Charles University and General Teaching Hospital, Prague; Department of Nephrology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague)

Summary: AL amyloidosis is the most frequent form of amyloidosis in western countries. The prognosis is the worst among plasma cell dyscrasias but it appears to have improved over the last decade - currently reported survival is approximately 4 years. High-dose therapy with stem cell support (ASCT) could yield a high rate of complete remission, however, transplant-related mortality (TRM) was high in the early studies. Moreover, a multicenter randomized trial did not confirm the superiority of ASCT and thus the role of this approach still remains unclear. Fourteen consecutive patients with AL amyloidosis were treated using our “strict risk-adapted” dosed melphalan conditioning in the last 10 years in our center. TRM was 7.1%, organ response was 57%, including 21% complete remission. Hematologic response was 58% in twelve evaluable patients. Median overall survival was 77 months, median progression-free survival 31 months. We conclude that ASCT with reduced dose melphalan is an effective and relatively safe treatment option for AL amyloidosis.

2055.

Zkušenosti s používáním bortezomibu v České republice od roku 2004

Sandeká Viera, Špička Jan, Straub Jan, Gregora Evžen, Pavlíček Petr, Ščudla Vlastimil, Minařík Jiří, Maisnar Vladimír, Radocha Jakub, Adam Zdeněk, Krejčí Marta, Pour Luděk, Zahradová Lenka, Hájek Roman
(Interní hematoonkologická klinika, FN, Brno; I. Interní klinika VFN, Praha; Oddělení klinické hematologie FN Královské Vinohrady, Praha; III. Interní klinika FN, Olomouc; II. Interní klinika- Oddělení klinické hematologie FN LF, Hradec Králové)

Úvod: Bortezomib (Velcade), první lék ze skupiny inhibitorů proteasomu, představuje zcela nový a jedinečný léčebný postup v léčbě mnohočetného myelomu (MM). Tato analýza shrnuje zkušenosti s léčbou bortezomibem včetně dlouhodobých výsledků u nemocných s MM léčených v referenčních centrech CMG v České republice (ČR). Metodika a soubor nemocných: Od roku 2004 do června 2010 bylo v ČR bortezomibem léčeno 753 nemocných. V době analýz léčbu ukončilo 96% nemocných. Do statistické analýzy bylo zahrnuto 424 pacientů, z toho 223 (52,6%) mužů a 201 (47,4%) žen. Z analýzy bylo vyřazeno 43,7% (329/424) nemocných pro nekompletní údaje, změnu léčebného režimu, pro opakovanou léčbu bortezomibem, pro kombinaci s thalidomidem, pro léčbu v rámci klinických studií, nebo pro pokračování v léčbě. Medián sledování od zahájení léčby byl 12,4 měsíců. Průměrný věk byl 66 let (34,1- 86,5). Jednalo se především o nemocné s relabujícím MM. Celkem 48,3% (205/424)

nemocných mělo bortezomib v rámci druhé léčebné linie. Až 73,4% (311/424) nemocných bylo léčených trojkombinací. Léčebné odpovědi byly hodnoceny dle IMWG kritérií v roce 2009. Toxicita bortezomibu byla hodnocena dle NCI kritérií. Výsledky: Průměrný počet podaných cyklů bortezomibu byl 5,1, průměrná jednorázová dávka byla 2,3 mg. Léčebné odpovědi ($\geq 50\%$ pokles Mlg) bylo dosaženo u 52,7% (186/353): u 4,2% (50/353) kompletní remise, u 15,9% (56/353) velmi dobrá parciální remise, u 22,7% (80/353) parciální remise, dále u 4,2% (15/353) nemocných minimální odpověď, u 43,1% (152/353) nemocných stabilní onemocnění či progresse. Medián doby do progresse byl 20 měsíců, medián celkového přežití od zahájení terapie byl 41,1 měsíců. Nejzávažnější toxicitou byla periferní neuropatie, stupně 3 a vyšší byla u 14% (49/358) nemocných. Trombocytopenie stupně 3 a vyšší byla u 28,8% (103/357) nemocných. Infekční komplikace stupně 2 a vyšší byly u 33,6% (121/359) nemocných. V průběhu léčby bortezomibem nedošlo v našem souboru nemocných k zvýšení frekvence výskytu trombembolických komplikací. Detailní analýza bude předmětem sdělení. Závěr: Naše výsledky dokazují, že bortezomib patří mezi vysoce účinné léky u nemocných s MM, který zásadně prodlužuje jejich přežití. Všechny nežádoucí účinky se daří zpravidla zvládat pomocí vhodných profylaktických opatření, případně krátkodobým přerušáním a následným snížením dávky na základě platných doporučení.

TRANSFUZNÍ SEKCE

2088.

Terapeutické hemaferézy

Gašová Zdenka (*ÚHKT, Praha*)

Terapeutické hemaferézy jsou léčebné extrakorporální výkony, jejichž cílem je snížit obsah krevních elementů v cirkulaci nebo obsah patogeneticky aktivních komponent v plazmě nemocných. Výkony se provádějí pomocí separátorů krevních komponent, které využívají centrifugační princip. Terapeutické hemaferézy nemohou ovlivnit příčinu onemocnění. Jsou však schopné upravit klinický stav nemocného, zlepšit kvalitu jeho života a oddálit závažné komplikace základního onemocnění. Uplatňují se v léčbě hematologických, nefrologických, neurologických, metabolických a revmatologických onemocnění. Terapeutické hemaferézy lze rozdělit na: a) depleční výkony, u nichž se z cirkulace nemocných odstraňují zmnožené složky krve, např. leukocyty, erytrocyty a trombocyty. Objem odebrané složky obvykle nepřevyšuje 1000 ml a lze jej nahradit vhodnými roztoky krystaloidů nebo koloidů. b) Výměnné výkony s výměnou plazmy nebo s výměnou erytrocytů (výměnná plazmaferéza, výměnná erythrocytaferéza). V průběhu výkonů se odebírají velké objemy plazmy (1-2 násobky plazmového objemu) nebo erytrocytů (1-2 násobky celkového objemu erytrocytů). Odebraný objem je nutné nahradit vhodnými náhrad-

ními roztoky – plazmou, albuminem, koloidními roztoky nebo erytrocyty. c) Postupy, při nichž se separují mononukleární buněčné frakce pro léčebné využití: přípravky pro transplantaci a hemopoetickou rekonstituci (PBPC) a přípravky pro imunomodulaci a genovou terapii (DLI nebo extrakorporální fotochemoterapie). Přestože se terapeutické hemaferézy považují za bezpečné výkony, mohou v jejich průběhu nastat závažnější nežádoucí reakce. Během separací dochází k přesunům tekutin mezi intravaskulárním a extravaskulárním prostorem, ke změnám v hladinách minerálů v plazmě, ke změnám hladin koagulačních faktorů a imunoglobulinů. Ve zvýšeném riziku nežádoucích reakcí se nacházejí pacienti s poruchami kardiopulmonálního systému s nestabilními vitálními funkcemi, v intenzivní péči, s anémií a s trombocytopenií, s krvácivými komplikacemi, léčení ACE inhibitory, s alergií, s potransfuzními reakcemi v anamnéze a gravidní ženy. V indikacích terapeutických hemaferéz se doporučuje využívat poznatků medicíny založené na důkazech, vycházet z prokázaných patofyziologických mechanismů jednotlivých onemocnění a z posouzení očekávaného přínosu terapie ve srovnání s možnými riziky.

2072.

Regulované dárcovství krve a krevních složek

Blahutová Šárka, Čermáková Z., Hrdličková R., Kořístka M., Furková J.

(*Krevní centrum Fakultní nemocnice, Ostrava*)

V průběhu skladování transfuzních přípravků dochází k nežádoucím metabolickým změnám (reverzibilním/irreverzibilním), a proto je v zájmu ZTS a KB i klinických pracovišť aplikovat pacientům transfuzní přípravky v co nejkratším termínu od odběru. Ročně expedujeme z Krevního centra (KC) cca 25 000 TU erytrocytových transfuzních přípravků (EBR, ERD, ERD-PED). Změnou organizace objednávání dárců krve na KC v roce 2010 jsme dosáhli toho, že od druhého pololetí 2010 je do 28. dne od dne odběru expedováno z expedice KC (prodej + výdej na pacienta) 99 % EBR a 95 % ERD. Za 12 M v roce 2010 nám proexspirovalo celkem 185 erytrocytových TP (0,77%), přičemž v 5-12/2010 v důsledku důslednější regulace objednávání dárců podle krevních skupin byla expirace erytrocytových TP nulová. V roce 2010 jsme vydali téměř 1300 TD trombocytových TP (cca 80 % TAD a 20 % TBSD), expirace TAD byla 2,8 %, expirace TBSD 22,4 %. Dovolujeme si podělit se o naše zkušenosti ze strategie a plánování odběrů krve a krevních složek na Krevním centru Fakultní nemocnice Ostrava.

2037.

Upgrade informačního systému na transfuzním oddělení FN Olomouc

Galuszková Dana, Mazal Jakub, Žáková Alexandra, Doleželová Kateřina

(*Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice, Olomouc*)

Cíl: Představení nového informačního systému, popis jednotlivých fází upgradu, zhodnocení provozu z pohledu uživatele. Úvod: Pro každé transfuzní oddělení je kvalitní informační systém jedním z nejdůležitějších pomocníků. Výběr systému je důležitým článkem pro bezpečnost při výrobě transfuzních přípravků a zároveň i pro rychlost a plynulost provozu. Informační systém musí pokrývat všechny úseky oddělení - od evidence dárců krve až po distribuci transfuzních přípravků, laboratoře pacientů a výkaznictví zdravotním pojišťovám. Důvodem pro změnu systému na našem oddělení byla zastaralost původního, končící podpora ze strany dodavatele a zlepšení technického vybavení. Metodika: Na začátku byl stanoven přesný harmonogram prací. První proběhla instalace Hardwaru a Softwaru, vytvoření zkušební databáze a naplnění řady číselníků. Následovala definice práv pro jednotlivé zaměstnance a jejich proškolení. Ihned poté byla zpřístupněna zkušební databáze, kde si zaměstnanci mohli práci opakovaně vyzkoušet. Po vlastním upgradu následovala fáze napojení analyzátoru, validace on-line převodů dat a validace definovaných kritických míst. Hodnocení: Realizace upgradu informačního systému trvala asi šest měsíců. Toto období bylo velmi náročné zejména pro zaměstnance, kteří museli zvládnout při běžném provozu nový program, a to současně na několika úsecích. Mezi nesporné výhody nového systému patří nahrazení terminálů plnohodnotnými počítači, snadnější práce s textem – nahrazení DOS systému systémem Windows, možnost využití šablon, oprav v textu, nové grafické prostředí (barevné zvýraznění patologických hodnot), v patientské části možnost vyhodnocování kvality došlých krevních vzorků a nahlédnutí klinických pracovišť na počty nakřížených transfuzních přípravků, včetně au-

tologických odběrů v krevní bance. Nevýhodou ISTO je mnohonásobné klikání myší a pomalejší převody dat z analyzátorů. Závěr: Celý proces přechodu proběhl dle plánu a bez zásadních komplikací. Nezbytností bylo přesné definování kroků a plynulá komunikace dodavatele s personálem. Informační systém nám nabízí řadu nových uživatelských aplikací, které dále průběžně zdokonalujeme a přizpůsobujeme našim potřebám.

1991.

Hemovigilance ve Fakultní nemocnici Brno

Tesařová Eva

(*Transfuzní oddělení a krevní banka Fakultní nemocnice, Brno*)

Úvod Hemovigilance představuje soubor systematických postupů pro dohled nad transfuzními přípravky a surovinami z krve a jejich složek pro další výrobu týkající se nežádoucích nebo neočekávaných událostí nebo reakcí u dárců nebo příjemců a epidemiologické sledování dárců. Hemovigilanční data, byť zpracovávána retrospektivně, jsou velmi důležitá pro správné prospektivní nastavení procesu výroby transfuzních přípravků a hemoterapie. Metoda Pro prospektivní nastavení procesu hemoterapie autorka v prezentaci analyzuje tříleté období sledování (2008 – 2010) závažných nežádoucích reakcí. Výsledky V průběhu tříletého sledování bylo ve Fakultní nemocnici Brno hlášeno 15 případů závažných nežádoucích reakcí, z toho čtyři případy byly hlášeny u žen a devět u mužů. V jednom případě se jedná o podezření na přenos HAV u dítěte ženského pohlaví. Ve třech případech byla souvislost s podáním transfuzního příprav-

Tabulka

Pohlaví pacienta	Věk pacienta (roky)	Typ reakce	Typ transfuzního přípravku	Stupeň přisuzovatelnosti	Klinický závěr
2008					
Žena	52	HBV	Plazma	1	Úplné uzdravení
Muž	21	HCV	Erytrocyty, trombocyty	0	Není znám
Muž	52	HBV	Plazma	1	Úplné uzdravení
Žena	72	Hypotenze	Plazma	1	Úplné uzdravení
Muž	70	Hemolýza jiná než AB0	Erytrocyty	2	Lehké následky
Žena	4	HAV	Erytrocyty		Dosud neuzavřeno
Muž	65	Hemolýza AB0	Erytrocyty	3	Úplné uzdravení
2009					
Muž	62	HBV	Erytrocyty, trombocyty	0	Není znám
Muž	50	HBV	Plazma	1	Lehké následky
Muž	60	Hemolýza AB0	Erytrocyty	2	Závažné následky
2010					
Muž	67	Alergická	Trombocyty	2	Úplné uzdravení
Muž	35	TRALI (neimunní)	Erytrocyty	1	Úplné uzdravení
Žena	72	Plicní embolie	Erytrocyty	0	Umrtil
Muž	57	TRALI (minor)	Erytrocyty	2	Úplné uzdravení
Muž	18	TRALI (major)	Plazma	3	Úplné uzdravení

ku s určitostí vyloučena (stupeň přisuzovatelnosti – 0), ve dvou případech definována jako jistá (stupeň přisuzovatelnosti – 3). viz tabulka Závěr Podrobná analýza a zpracování hemovigilančních dat pomáhá zajistit správné nastavení procesů výroby transfuzních přípravků a procesu hemoterapie. Konkrétní výstupy ze zpracovaných hemovigilančních dat ve Fakultní nemocnici Brno představují následující procesy: • Plazma pro klinické použití výhradně od dárců krve – mužů (od roku 2006) • Výhradně online přenos výsledků všech prováděných testů v souvislosti s odběrem krve nebo krevní složky (od roku 2007) • Použití výhradně prestorage deleukotizovaných trombocytů (od roku 2008) • Výroba trombocytů výhradně v náhradních roztocích, včetně léčby dětí (od roku 2010) • Implementace screeningového testování dárců krve pomocí PCR metody (od října 2009).

1977.

Ozařování transfuzních přípravků ve spolupráci s oddělením radiační onkologie

Kuřková Dagmar, Richter Jiří

(*Transfuzní oddělení Krajské nemocnice, Liberec; Oddělení radiační onkologie Krajské nemocnice, Liberec*)

Ozařování transfuzních přípravků validovanými systémy je doporučovanou procedurou pro prevenci GvHD. Existují dva druhy ozařovacích procesů: záření gama vycházející z radioaktivního zdroje nebo ozařování elektrony o vysoké energii produkovanými lineárním urychlovačem. Autoři prezentují alternativu s využitím přístrojové techniky Oddělení radiační onkologie Krajské nemocnice Liberec a.s. (dále ORO). Pro ozařování nebyl použit radioaktivní zdroj, jehož pořízení bylo nereálné vzhledem k malému počtu ozařovaných transfuzních přípravků. Nebylo ale možné použít ani elektronové pole z důvodu nevhodných geometrických podmínek. Proto ORO ve spolupráci s Transfuzním oddělením Krajské nemocnice Liberec a.s. (dále TO) vypracovalo metodiku pro ozařování svazkem X lineárního urychlovače o nejnižší dostupné energii. Vstupní požadavek procesu, specifikovaný TO: všechny body transfuzního přípravku musí obdržet absorbovanou dávku v rozmezí 25 – 40 Gy. Limitující požadavek vyplývající z technických parametrů přístroje: vak s transfuzním přípravkem včetně výpusť nesmí překročit svými rozměry plochu 30x30 cm² a tloušťku 3,5 cm. Správnost dávky pro nastavenou konfiguraci systému byla validována měřením Markusovou komorou v PMMA fantomu. Validace byla provedena jak pro erytrocytární, tak trombocytární transfuzní přípravky. Obě oddělení mají vypracovány SOP, ORO pro vlastní proces ozařování, TO pro výběr transfuzních přípravků, transport, zpětný příjem a skladování ozářených přípravků a dokumentaci, jasně jsou stanoveny odpovědnosti za jednotlivé části procesu. Způsob zajištění byl akceptován i inspekci SÚKL. Smluvně ošetřená činnost, která byla zahájena v září 2009, probíhá v denní pracovní době pondělí až pátek po domluvě s ohledem na kapacitní možnosti ORO. Výsledkem je tak cca 100 ozářených pří-

pravků a zajištění odpovídající hemoterapie pro indikované nemocné

4TH SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY – MOLECULAR PATHOGENESIS AND TARGET THERAPY IN MULTIPLE MYELOMA

2086.

Inherited and tumor specific genetic variations affecting therapeutic response

Van Ness Brian

(*Institute of Human Genetics, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota – USA*)

Myeloma tumor cells show an incredibly heterogeneity in deregulated genetics, and patients show no less heterogeneity in sensitive and resistant cell lines that show unique cell cycle and gene expression patterns that may reveal mechanisms of emerging resistance in myeloma. These results will be presented with discussion of future directions in developing characterizations leading to individualized therapies.

2026.

Recent developments in the understanding of the pathogenesis and therapeutic targeting of multiple myeloma: clinical implications

Mitsiades Constantine, Laubach J., McMillin D.W., Delmore J., Jakubikova J., Jacobs H., Ooi M.G., Klippel S., Kastiris E., van de Donk N., Hayes C.A., Lawasut P., Dhimolea E., Richardson P.G., Anderson K.C.

(*Dept. of Medicine, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts – USA*)

Despite recent progress in clinical management of multiple myeloma (MM), substantial therapeutic challenges remain. A sizeable proportion of newly diagnosed MM patients remain at high risk for early relapse or death, despite the use of new drugs and their combinations. There are limited therapeutic options for patients with advanced multi-drug resistant MM. To address these challenges, it will be critical to identify new classes of anti-MM agents, incorporate them into safe and effective combination regimens, and develop efficient individualized treatment that will help select the most appropriate therapeutic options for clinical and molecular features of patients during their disease. To facilitate the effort to individualize MM therapy, ongoing preclinical studies have been characterizing genomic, epigenetic and proteomic profiles of MM cells and delineating different molecularly defined subtypes of MM. Renewed emphasis is placed on identifying driver molecular lesions on which different MM subtypes depend. In order to remain informative, preclinical models for identification of driver molecular lesions should be further fine-

tuned to optimize their relevance to clinical setting(s) in which potential clinical trials will be conducted. For example, the interactions of MM cells with bone marrow stromal cells and other non-malignant accessory cells of the microenvironment can confer drug resistance to diverse drug classes and may contribute to suboptimal clinical translation of otherwise exciting preclinical results. Therefore, preclinical in vitro and in vivo MM studies should ideally be orthotopic, i.e. take into account the microenvironmental niches with which MM cells interact in patients. Translation of these preclinical results into clinical progress will likely become more complex because novel molecular profiling techniques are expected to identify more clinically and biologically discrete subsets of MM patients with recurrent lesions. This molecular heterogeneity, coupled with increasing numbers of candidate therapeutic targets and respective agents, could create formidable challenges for the effective application of personalized medicine in MM. Addressing such challenges will require a balanced approach that may include large studies of uniformly treated patients of multiple MM subtypes, but also careful evaluation in smaller patient subgroups of highly selective therapies against targets driving the aggressive clinical behavior of these cases.

2082.

IGH-involving interstitial deletions of chromosome 14 hallmark the cyclin D-negative (“NONE”) subgroup of multiple myeloma

Wlodarska Iwona, Ross Fiona M., Lemmens Heidi, Russell Lisa J., Tousseyn Thomas, Ferreira Julio Finalet, Chicchio Laura, Dagrada GianPaolo, Urbankova Helena, Jarošová Marie, Michalová Kyra, Ilencikova Denisa, De Paep Pascale, De Wolf-Peeters Christiane, Harrison Christine J., Vandenbergh Peter

(Center for Human Genetics, Catholic University, Leuven – Belgium; LRF UK Myeloma Forum Cytogenetic Database, University of Southampton, Salisbury – UK; Leukemia Research Cytogenetics Group, University of Southampton, Southampton – UK; Department of Morphology and Molecular Pathology, Catholic University of Leuven, Leuven – Belgium; Department of Hemato-oncology, Palacky University, Olomouc –CZ; Center of Oncocytogenetics, Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Prague – CZ; Department of Clinical Genetics, National Cancer Hospital, Bratislava – SK; Department of Pathology, St Jan AV, Brugge – Belgium)

IGH-involving interstitial deletion of chromosome 14q (del(14q/IGH) is a novel aberration identified by us in several subtypes of B-NHL, including multiple myeloma (MM) (Pospisilova et al, 2007). To better characterize MM cases with this aberration, we screened database of 5 cytogenetic laboratories and collected 54 cases of plasma cell malignancies with FISH-proven del(14q/IGH). The incidence of del(14q/IGH) in series of >1500 MM patients analyzed in Leuven was 1,4%, thus similar to t(14;20). There

were 26 female and 28 male patients ranging in age from 31 to 89 years (median 7,4). Diagnoses were as follows: MM (n=42), MGUS (n=11) and smoldering MM (n= 1). Further FISH mapping of del(14q/IGH) in these cases allowed to narrow down proximal breakpoints to 4 regions: (i) centromeric to ZFP36L1/14q24.13 (18 cases); (ii) within the ZFP36L1 region (23 cases); (iii) flanked by ZFP36L1 and TRAF3/14q32.33 (5 cases), and (iv) bordered by TRAF3 and IGH/14q32.33 (4 cases). The size of del(14q) could not be determined in 4 cases. In 8 cases (1,3%) biallelic deletion of TRAF3 was found. Our studies showed the del(14q/IGH) was predominantly associated with non-hyperdiploid (NHRD) tumors and frequently accompanied by del(13q)/RB1, del(16q)/CMAF and gain of 1q21/CKS1B (considered as poor prognostic factors). All analyzed cases were negative for major known IGH primary translocations. Of particular interest, 11 out of 13 cases analyzed by immunohistochemistry showed lack of expression of any cyclin D. In summary, we provided evidence that del(14q/IGH) is a rare but recurrent primary event in pathogenesis of MM. It hallmarks the cyclin D-negative (“NONE”) subgroup of MM that comprises approximately 2% of all MM cases (Bergsagel et al, 2005). MM cases with del(14q/IGH) revealed similar genetic features as MM with the known primary IGH-related translocations: a predominant association with NHRD karyotype, similar secondary genomic imbalances and occurrence in symptomatic MM as well as in pre-malignant conditions (MGUS, SMM). To check whether del(14q/IGH) targets an unknown tumor suppression gene, mutation analysis of the smallest deleted region (TRAF3-IGH; app. 2.5Mb) is currently ongoing in three available cases.

2021.

Genetics and epigenetics of multiple myeloma

Bártová Eva, Legartová Soňa, Šustáčková Gabriela, Jugová Alžběta, Stixová Lenka

(Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, v.v.i., Brno)

Multiple myeloma (MM) represents example of tumour cell transformation characterized by multiple genetic abnormalities and epigenetic changes. Karyotypic abnormalities of MM correlated with the stage of this disease and drug response. Here, we focused on genetics and epigenetics in MM cell lines. Using ChIP-PCR (chromatin immunoprecipitation) and MeDIP (methylated DNA immunoprecipitation), we have analyzed epigenetic profiles such as H3K9 acetylation and H3K9 di-methylation at promoters and coding regions of selected genes, important from the view of MM pathophysiology. Our analyses should provide information how histone signature and DNA methylation in MM cells can be affected by cytostatic treatment used in clinics. As example, analyzing H3K9 acetylation at selected promoter regions, we observed interesting differences between control and melphalan treated myeloma cells (Krejčí et al., Leuk. Res., 2009).

Additionally, our results showed that cytostatic drugs, including melphalan and vorinostat, have ability to change not only histone signature, but also protein kinetics in multiple myeloma cells. This work was supported by Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic. Grant Nos.: LC06027.

2060.

Chromosomal abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance patients analyzed by fluorescence in situ hybridization and oligonucleotide based array comparative genomic hybridization

Mikulášová Aneta, Smetana Jan, Kuglík Petr, Grešliková Henrieta, Kupská Renata, Němec Pavel, Zaoralová Romana, Burešová Ivana, Štossová Jana, Pour Luděk, Křivanová Andrea, Krejčí Marta, Adam Zdeněk, Zahradová Lenka, Klincová Mária, Hájek Roman
(Babak Research Institute, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno; Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno; Internal Hematooncological Clinic, Faculty Hospital, Brno)

Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) is a precancerous permanently associated with higher risk of progression into malignant disease. Similarly to MM patients samples, specific chromosomal aberrations in bone marrow plasma cells (BMPCs) in MGUS patients were reported, especially del(13)(q14), del(17)(p13), IGH rearrangement, 1q21 gain and hyperdiploidy (+5, +9 and +15). Some of them are considered to be prognostic factors determining potential risk of MGUS progression. However, due to low percentage of BMPCs, cytogenetic studies are complicated. In our work, we analyzed 103 samples of bone marrow obtained from 95 MGUS patients. Three strategies were used for BMPCs identification. Eleven samples were sorted by neither magnetic activated cell sorting (MACS) nor fluorescence activated cell sorting (FACS), thus further cIg FISH was done. Total of 27 % (3/11) samples were successfully analyzed by cIg-FISH, remaining 8 samples were not analyzed due to insufficient BMPCs amount on slides. Twenty-nine bone marrow samples were sorted by MACS using CD138+ selection. Sufficient CD138+ purity (>70 %) was reached by 45 % (13/29) samples, thus only 13 samples were suitable for further FISH analysis. Total of 64 samples were sorted by FACS using CD138, CD19 and CD56 markers and 63 of them (98 %) were further successfully analyzed by FISH. We demonstrated that FACS is the optimal strategy for BMPCs sorting for further cytogenetic analysis of chromosomal aberrations in MGUS patients. Taking together, 62 samples from MGUS patients were included in FISH analysis. Del(13)(q14) was found in 20 %, del(17)(p13) was found in 2 % (1/61), IGH rearrangement was found in 68 % (27/40), 1q21 gain was found in 17 % (9/52) and hyperdiploidy (+5, +9 and +15) was found in 11 % (6/55) cases. To better understand the genetic background of MGUS and to find suitable gene-

tic markers of progression of MGUS to MM, we have to introduce whole genome screening using oligonucleotide based array comparative genomic hybridization (Agilent Microarray Platform). Our preliminary experience with optimization of array-CGH performed from small number of BMPCs in MGUS patients is presented. Support: The study was supported by grants MSMT LC06027, MSM0021622434, MSM0021622415 GACR P304/10/1395, IGA NS10406-3, NS10387-3.

2027.

Association of aneuploidy and centrosome abnormalities in myeloma genesis

Dementyeva Elena, Kryukov Fedor, Sevcikova Sabina, Nemeč Pavel, Smetana Jan, Greslikova Henrieta, Kuglík Petr, Hajek Roman
(University Research Centre, Czech Myeloma Group, Babak Research Institute, Masaryk University, Brno; Laboratory of Molecular Cytogenetics, Department of Genetics and Molecular Biology, Institute of Experimental Biology, Masaryk University, Brno)

Centrosome amplification (CA) may lead to genomic instability of malignant plasma cells in multiple myeloma (MM). Loss of centrosome duplication control will often create multipolar spindles that in turn could be responsible for incorrect segregation of whole chromosomes leading to aneuploidy. But no correlation between centrosome aberrations and aneuploidy in MM has ever been found. The objective of our study was to evaluate association of MM ploidy category with CA in both B and plasma cells subpopulations and to investigate gene expression changes in genes controlling centrosome numbers. Centrin number was used to define presence of CA in PCs (CD138+) of MM patients: more than 4 signals were considered to be positive. Samples with $\geq 10\%/11\%$ of PCs/B cells with >4 fluorescence signals of centrin were considered CA positive. A total of 140 patients were evaluated for CA in PCs and/or B-cells, including 50 patients where both cell types were analyzed. cIg FISH and qRT-PCR (6 CA positive vs 12 CA negative patients) were performed on plasma cells. qRT-PCR were focused on chosen list of mitotic genes, according to their role in normal centrosome duplication process. Hyperdiploidy analysis was done using Multi-Color Probe Panel (LSI D5S23/D5S721, CEP 9 and CEP 15) for chromosome 5, 9 and 15. Only cells with three or more signals from at least two of three investigated chromosomes were classified as hyperdiploid. Significant correlation of centrosome amplification in PCs with hyperdiploidy was not found. But association of CA in B-cells with PCs hyperdiploidy was proven using Fisher's exact test ($p=0.025$). In group of newly diagnosed patients, this association was much stronger ($p=0.013$). Gene expression analysis showed significant increase in relative quantification coefficient R of following genes (data presented as median [range]): AURKA 0.11 [0.02-0.26] vs 0.34 [0.11-0.9], PCNT 0.51 [0.11-1.52] vs 1.84 [0.51-3.20] and TACC3 0.2 [0.03-0.45]

vs 0.82 [0.04-2.63] for CA negative vs CA positive patients, resp. ($p < 0.03$). Also, coefficient R of genes PCNT, AURKB, AURKA, CCNB2, PLK4, HMMR, TACC3 was strongly correlated with percentage of CA positive PC ($rs > 0.5$, $p < 0.05$). In our study, we show association of CA in B-cells with PCs hyperdiploidy. This finding relates to the role of B-cell mitotic disruption in MM aneuploidy and cell carcinogenesis. This work was supported by grants NT11154, NS10207, NS10406, NS10408, LC06027, MSM00216-22434, GAP304/10/1395.

1907.

Induction by lenalidomide plus dexamethasone elevates regulatory and total lymphocyte populations in newly diagnosed multiple myeloma patients:

A single center study

Muthu Raja Karthick Raja, Plasil Martin, Kovarova Lucie, Stossova Jana, Hajek Roman

(Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno; Department of Clinical Haematology, Faculty Hospital, Brno; Department of Internal Medicine-Hematoonology, Faculty Hospital, Brno)

Multiple myeloma is a plasma cell proliferative disorder and the second common hematological malignancy standing next to lymphoma. Elevated frequencies of T regulatory cells (Tregs) were well documented in MM as similar to other hematological malignancies. This study focus on how induction with lenalidomide and dexamethasone (Len-Dex) influences various regulatory populations (CD4 Tregs, CD8 Tregs and CD8 suppressor cells) and lymphocytes in MM patients. In this study after obtaining informed consent 13 newly diagnosed patients were included. International staging system characterization of the patient cohort was: ISS1- 4/13 (31%), ISS2- 7/13 (54%), and ISS3- 2/13 (15%). All patients were induced by Len-Dex combination for 4 cycles at 28 days interval [lenalidomide (25 mg/1-21 days) and dexamethasone (40 mg on days 1,8,15, 22); oral administration]. Using 5 color flow cytometry peripheral blood Tregs, Ts cells and

total lymphocytes were analyzed. Ten age-matched healthy volunteers were also analyzed for comparison. Phenotypically, CD4 Tregs were characterized as CD4+CD25hi+FoxP3+, CD8 Tregs were identified as CD8+FoxP3+ and CD8 suppressor (Ts) cells were identified as negative expression for CD28 (co-stimulatory molecule) CD8+CD28-. Lymphocyte population was characterized based on forward and side scatter properties. Our findings showed frequencies of CD8 Tregs (median%-0.32 vs. 0.15; $P = 0.009$) and Ts cells (median%- 54.38 vs. 30.36; $P = 0.031$) were substantially elevated in MM patients when compared to healthy cohort. In contrast, the CD4 Tregs frequencies were similar between MM patients and healthy volunteers (median%- 2.9 vs. 3.0; $P = 0.78$). As expected, total lymphocyte population was reduced in MM patients than healthy volunteers (median%-14.2 vs. 36.26; $P < 0.001$). In comparison analysis between pre and post induction cycles, CD4 Tregs showed significantly increased frequencies inline with increase in induction cycles (Table:1). Similarly, a increasing trend was observed for CD8 Tregs and Ts cells in post induction cycles, but it did not reach statistical significance (Table:1). With regard to total lymphocytes frequencies an increasing trend was observed in post induction cycles when compared to pre induction ($P = 0.45$). Our observation concludes that elevated regulatory cells after Len-Dex induction might influence the tumour immune responses in MM. This work was supported by MSM0021622434, IGA NS10406 and GACR GAP304/10/1395.

XV. KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ A ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ (LABORANTSKÁ SEKCE 1)

1862.

Myelodysplastický syndrom z pohledu nové WHO klasifikace 2008

Mikulenková Dana (ÚHKT, Praha)

Myelodysplastický syndrom je velmi heterogenní skupina klonálních onemocnění jak z pohledu klinika, tak i z pohledu morfoloického vyšetření. Příčina je u většiny onemocnění neznámá, i když stejně jako u akutní leukemie jedním z důvodů vzniku může být předchozí cytotoxická či radiační terapie, nezářka toto onemocnění doprovází i solidní tumory. Syndrom je charakterizován různě intenzivně vyjádřenou periferní cytopenií při ineffektivní hematopoeze, přítomností dysplastických změn v jedné či více myeloidních liniích (v nátěru periferní krve a aspirátu kostní dřevě), v některých případech cytogenetickými a molekulárně genetickými změnami a rozdílnou potencí v přechodu do akutní myeloidní leukemie. Autoři nové WHO klasifikace z roku 2008 využili data pacientů z národních registrů (prognostické znaky) a rozčlenili jednotlivé podskupiny dle nálezu v periferní krvi a kostní dřevě v souvislosti s typickými cytogenetickými

Table 1: Comparison of regulatory and suppressor cells between pre- and post-induction by lenalidomide and dexamethasone

Pre-induction	Post-induction cycles	P value
CD4 Tregs in median% (range%)		
2.90(0.97-5.42)	1st	4.03 (1.99-7.71) 0.38
	2nd	5.91 (2.57-10.81) 0.001
	3rd	6.14 (1.42-7.60) 0.001
	4th	6.73 (1.81-8.88) 0.045
CD8 Tregs in median% (range%)		
0.32(0.01-1.21)	1st	0.53 (0.16-0.96) 0.02
	2nd	0.44 (0.26-1.33) 0.75
	3rd	0.40 (0.12-1.26) 0.9
	4th	0.38 (0.16-1.37) 0.72
Ts cells in median% (range%)		
54.38(19.68-71.25)	1st	39.04 (23.96-65.04) 0.75
	2nd	53.27 (25.34-75.99) 0.75
	3rd	51.53 (32.35-80.04) 0.75
	4th	49.24 (30.47-62.97) 0.72

změnami do 8 podtypů. Vstupní data z hodnot krevního obrazu a morfologické zhodnocení periferní krve a kostní dřeně včetně pomocných cytochemických metod (vyšetření myeloperoxidázy a přítomnosti železa v kostní dřeně) umožní ve většině případů diagnózu myelodysplastického syndromu stanovit, v kombinaci s cytogenetickým výsledkem a výsledkem histologického vyšetření kostní dřeně pak určit prognózu a terapeutický postup. Morfologické hodnocení buněk periferní krve a aspirátu kostní dřeně tedy patří u myelodysplastického syndromu mezi základní diagnostické metody.

1863.

Přínos popisu erytrocytů v nátěru periferní krve pro diagnostiku hematologických onemocnění

Novotová Elena, Kalašová J., Letenská M., Mikulenkova Dana (*ÚHK, Praha*)

Pro hodnocení číselných a morfologických normálních i patologických parametrů červené řady používáme v naší laboratoři analyzátor Sysmex XE – 5000. Nátěr a barvení provádí automat SP-1000i. Číselné hodnoty (celkový počet erytrocytů (RBC), množství hemoglobinu (Hgb), střední objem erytrocytu (MCV), střední obsah hemoglobinu v erytrocytu (MCH), v litru erytrocytů (MCHC) a v retikulocyty (MCH reti), distribuční šíře velikosti erytrocytů (RDW) a hematokrit (Hct)) a mikroskopický obraz zobrazující a charakterizující tvar, zbarvení, event. přítomnost granul, hustotu a rozložení erytrocytů v nátěru a možnou přítomnost i mladších vývojových stádií, jsou hlavními prvky popisu. Při hodnocení neopomínáme na spojitost suspektní nebo již existující nemoci se získanými parametry červené řady – například v rámci myelodysplastického syndromu či aplastické anémie (erytropoeza je poškozená či snižovaná a dochází k defektní či snížené tvorbě erytrocytů) nebo při myeloproliferativních onemocněních (při pravé polycytemii se tvoří nadměrné množství erytrocytů a nátěr je hustý). Správně provedené zhodnocení erytrocytů (z mikroskopického rozboru nátěru periferní krve a z naměřených hodnot krevního obrazu) nám zásadně pomáhá v diferenciální diagnostice hematologických a hematonekologických onemocnění

1896.

Srpkovitá anémie

Hrubá Petra, Špiříková Ivana, Veselková Jana (*OKH, FN u sv. Anny, Brno; FN Bohunice, Brno*)

Prezentace poukazuje na problematiku anémií, konkrétně na srpkovitou anémii. Věnuje se historii, rozebírá klinické symptomy a laboratorní vyšetření, které jsou nedílnou součástí její diagnostiky. Onemocnění je v našich zeměpisných šířkách vzácné, a proto také neopomenutelnou součástí této prezentace je léčba, která je v těchto případech velice problematická. V závěru je uvedena zajímavá kasuistika, která rozebírá konkrétní případ pacient-

ky. Srpkovitá anémie je dědičné onemocnění, které se projevuje změnou tvaru červených krvinek z tzv. promáčknutých piškotů na protažené srpky neboli drepanocyty. Tato změna tvaru červené krvinky snižuje její schopnost procházet periferními cévami, omezuje přenos kyslíku a snižuje životnost krvinek ze 120 dnů na 10 – 20 dnů. Změna tvaru je způsobená mutací genu pro hemoglobin, při níž je na 6. pozici v β -řetězci je valin místo kyseliny glutamové (vzniká hemoglobin označovaný jako „HbS“). Valin je hydrofobní aminokyselina, zatímco kyselina glutamová je hydrofilní. Takto vzniklá molekula HbS vykazuje odlišné vlastnosti a ve své deoxygenované podobě (tzn. není na ní navázán kyslík) se molekuly hemoglobinu shlukují a deformují krvinku. To snižuje flexibilitu buňky a má za následek mnoho různých komplikací. Průměrná délka života lidí postižených srpkovitou anémií je 42 let u mužů a 48 let u žen. Při přenosu dědičné informace mohou nastat tři možnosti: 1. Potomek je srpkovitou anémií nakažen 2. Potomek ji pouze přenáší 3. Potomek srpkovitou anémií nakažen není. Existují dvě formy anémie: homozygotní - HbSS heterozygotní - HbSA – u tohoto stavu obsahují červené krvinky 40% HbS a 60% HbA. K srpkovatení krvinek dochází jen za extrémních situací – hypoxie, námaha nebo chlad. V současné době je srpkovitá anémie nevyléčitelné onemocnění. Jediným lékem je pravidelné podávání krevních transfuzí, které pacientům, alespoň do určité míry, zkvalitní a prodlouží život.

1988.

Malárie v hematologické laboratoři

Trnavská Irena, Matýšková M., Snopková S., Šlechťová M., Hoblová J., Fišárková H. (*OKH FN, Brno; KICH FN, Brno*)

Malárie je jednou z nejrozšířenějších infekčních nemocí. V endemických oblastech malárie žije více než 40% světové populace, každým rokem onemocní více než 300 milionů lidí a více než 2 miliony lidí na malárii zemře. V nemalariických oblastech se výskyt importované malárie stále zvyšuje. Na světě ročně onemocní importovanou malárií více než 30 tisíc lidí, z toho asi 10 tisíc v Evropě. Etiologickým agens malárie jsou čtyři druhy prvoků rodu Plasmodium, které přenáší komár rodu Anopheles. Všechny druhy plasmodií se množí v erytrocytech a způsobují tři základní formy onemocnění. Charakteristickým symptomem je horečka, která je v prvních dnech nepravidelná objeví pravidelně se opakující malarické záchvaty. U tropické malárie může být horečka kontinuální. Laboratorně počet leukocytů může být normální, nárůst je ale trombocytopenie a postupně i anémie z rozpadu infikovaných erytrocytů. Klinickou symptomatologií může malárie imitovat nejrůznější horečnatá onemocnění, a naopak malárii může připomínat mnoho jiných nemocí. Pro diagnostiku má stěžejní význam mikroskopický průkaz plasmodií v erytrocytech periferní krve. Závažnost parazitémie se nejčastěji hodnotí procentem napadených erytrocytů. Jedním z laboratorních kritérií malig-

ní malárie je parazitémie vyšší než 5%. Nám se podařilo náhodně zařadit nátěry od pacienta s projevy maligní malárie (infekce *Plasmodium falciparum*) do cyklu externí kontroly kvality. Masivní výskyt parazitárních inkluzí zaznamenalo pouze 77% hodnotících. Pět laboratoří uvedlo, že je červená řada beze změn. Odhad diagnózy byl poměrně překvapující, pouze 68 % udalo parazitární infekci, přestože se v tomto případě jedná o zcela unikátní masivní parazitémii. Řada pracovišť (21%) se spokojila s údajem o některém typu anémie. A co bychom měli v mikroskopu vidět? U této infekce jsou při standardním MGG barvení paraziti viditelní v nezvětšených erythrocytech bez Schüfnerova tečkování. Časné formy vypadají jako jemné bazofilní kroužky některé s jednou, často ale i dvěma azurofilními chromatinovými tečkami; zralé trofozoa jsou hutnější kroužky opět s chromatinovou tečkou/tečkami. Schizonti se nalézají zřídka a indikují těžkou infekci. U pacientů s febrilním stavem po návratu z endemické oblasti výskytu malárie je nutné vždy myslet na možnost tohoto onemocnění. Včasná diagnostika může zabránit přechodu onemocnění do závažných klinických forem i případnému úmrtí pacienta.

1963.

Laboratorní vyšetření dárců krve

Trhlíková Petra, Häutlerová Tereza, Holusková Iva, Sláviková Margita, Galuszková Dana
(*Transfuzní oddělení, Olomouc*)

Úvod: Důležitou součástí při výrobě transfuzních přípravků je laboratorní vyšetření dárců krve. Cílem našeho sdělení je přiblížit problematiku vyšetřování dárců na našem TO (transfuzním oddělení), včetně vyhodnocení počtu provedených vyšetření za rok 2010. Metodika: Laboratorní vyšetření dárců krve probíhá ve dvou laboratořích - Laboratoři imunohematologie dárců a Laboratoři infekčních markerů. V laboratoři imunohematologie pracujeme s nesrážlivým krevním vzorkem na analyzátoru Techno Twin Station. Zde je vyšetřena krevní skupina v AB0 a RhD systému, dále fenotyp v Rh a Kell systému na mikrotitračních plotnách, screening antierytrocytárních protilátek pomocí poolovaných erythrocytů na ID-kartách LISS/Coombs. Zkumavkově došetřujeme D weak/variant, hemolysiny u univerzálních dárců krve a rozlišení antigenu K a k, ručně pomocí mikrotitračních desek vyšetřujeme titry protilátek anti-A a anti-B u trombocytaferéz krevních skupin 0. V laboratoři infekčních markerů vyšetřujeme HBsAg Qual, anti-HCV, HIV 1+2, Syphilis IA na analyzátoru Architect i2000 a Architect i2000SR ze srážlivého vzorku. Tyto metody slouží k odhalení krví přenosných infekčních chorob: žloutenky typu B a C, HIV a syfilis. V případě reaktivity daného testu zopakujeme vyšetření dvakrát a při opakované reaktivitě zašleme vzorek na přešetření do NRL pro hepatitidy, HIV a syfilis. Výsledky: Za rok 2010 bylo v Laboratoři imunohematologie-dárci a v Laboratoři infekčních markerů vyšetřeno 31.871 krevních vzorků. V laboratoři infekčních marke-

rů bylo reaktivních 15 dárců na HIV (z NRL pro HIV 3x nejasný výsledek, 12x negativní výsledek). Do NRL pro syphilis bylo z naší laboratoře odesláno 15 reaktivních vzorků (1x byl uzavřen jako pozitivní, 4x jako nejasný výsledek a 10x jako výsledek negativní). HCV reaktivních dárců bylo 66 (z NRL pro hepatitidy 1x uzavřeno jako pozitivní, 18x jako nejasný výsledek a 47x jako negativní výsledek). HBsAg reaktivních dárců bylo 20 a všichni byli v NRL pro hepatitidy uzavřeni jako negativní. V Laboratoři imunohematologie-dárci byl pozitivní screening protilátek zjištěn u 9 dárců z celkového počtu 31.871. Závěr: Laboratorní vyšetření je nezbytnou součástí celého procesu při výrobě transfuzních přípravků. Laboratoř musí garantovat správnost výsledků a zaručit bezpečnost transfuzních přípravků.

1946.

Zajištění hemoterapie pro chronicky substituované pacienty

Vodičková Marta, Andrášková Anna, Holusková Iva, Sláviková Margita, Galuszková Dana
(*Transfuzní oddělení, Olomouc*)

Cíl: Cílem našeho sdělení je přiblížení problematiky testů slučitelnosti u pacientů s komplikovaným imunohematologickým nálezem, včetně zajištění hemoterapie, která bývá u této skupiny pacientů často dosti obtížná, a to včetně kazuistik a srovnání počtu vydaných erytrocytárních transfuzních přípravků pro pacienty chronicky substituované, s počtem erytrocytárních transfuzních přípravků vydaných pacientům s akutní krevní ztrátou v roce 2010. Naše výsledky: V roce 2010 vyexpedovalo naše transfuzní oddělení celkem 21.036 TU erytrocytárních TP (transfuzních přípravků). Do FN Olomouc bylo vydáno 13.417 TU erytrocytárních TP (t.j. 64 %, 13.417/21.036). Na Hemato-onkologickou kliniku, kde se koncentruje největší počet chronicky substituovaných pacientů, jsme vydali 2.324 TU erytrocytárních TP (t.j. 17 %, 2.324/13.417). Pravděpodobnost rozvoje aloimunizace těchto pacientů roste s objemem podaných transfuzí, s prodlužující se dobou pravidelného podávání transfuzí, s věkem a klinickým stavem pacienta (např. AIHA). Zajištění hemoterapie proto vyžaduje vhodný výběr TP dle typu antierytrocytární aloprotilátky a fenotypu pacienta. U některých pacientů je nutné otypování vhodných erytrocytárních TP, event. cílené zvaní dárců krve k odběru v době požadavku na transfuzi. K tomuto tématu budou představeny tři kazuistiky. Mezi pacienty vyžadující akutní podání transfuzních přípravků řadíme nejčastěji polytraumatizované pacienty, ženy s poporodními komplikacemi, pacienty, u kterých byl proveden velký výkon v cévní chirurgii, či kardiochirurgická operace. Pro tyto pacienty v roce 2010 vydalo naše oddělení 7.890 TU erytrocytárních TP (t.j. 59 %, 7.890/13.417). U těchto pacientů je pravděpodobnost aloimunizace nižší. Závěr: V literatuře se uvádí, že 2 % - 3 % pacientů vytváří aloprotilátky po expozici antigenům z transfundovaných erythrocytů, a to velmi často

již po podání prvních transfuzí, proto zajištění hemoterapie, která respektuje minimálně Rh a Kell genotyp pacienta, výrazně snižuje riziko aloimunizace. I přesto je na našem pracovišti toto číslo vyšší - okolo 5 %, a to z důvodu koncentrace komplikovaných pacientů, neboť naše pracoviště je referenční laboratoří pro širokou spádovou oblast.

1954.

Koagulačný faktor VIII a jeho úloha v hemostáze

Tupý Jaromír, Klukošová Štefánia, Tupá Miriam
(FZ KU Ružomberok, ÚHaT ÚVN SNP Ružomberok – FN, Ružomberok – SK)

Faktor VIII (antihemofilický faktor), izolovaný v roku 1937 z krvnej plazmy, je syntetizovaný prevažne endotelovými a sinusoidálnymi bunkami. Biochemicky ide o plazmatický glykoproteín (B-globulín) o MW 330 kDa, s biologickým polčasom rozpadu 8-12 hodín. Je veľmi citlivý k enzymatickej degradácii, a preto v plazme koluje naviazaný nekovalentnou väzbou na von Willebrandov faktor (vWf), ktorý slúži ako nosič F VIII a zároveň ho chráni pred proteolytickou degradáciou faktora Xa a aktivovaného proteínu C. Gén, izolovaný v r. 1984, je na dlhom ramienku chromozómu X - Xq28, DNA je dlhá 186 kba a obsahuje 26 exónov, čo robí tento gén jeden z najväčších. Štruktúra FVIII sa skladá z troch rôznych A-domén, jednej B-domény, dvoch C-domén a dvoch regiónov peptidov, ktoré oddeľujú jednotlivé domény. Degradácia FVIII prebieha hlavne v pečeni. Z cirkulácie je odstraňovaný pinocytózou, fagocytózou alebo prostredníctvom interakcií s receptormi imunokompetentných buniek. Aktivácia FVIII: Aby bol FVIII plne funkčný, musí sa najprv uvoľniť z väzby s vWf. Reakciu zahajuje (iniciálna fáza) expozícia tkanivového faktora (TF) s následnou väzbou na FVII – vytvorenie komplexu TF/FVIIa a aktiváciou FX a FIX. Komplex TF/FVIIa/FIXa taktiež aktivuje FX. Výsledkom fázy iniciácie je aktivácia FX, vytvorenie komplexu TF/FVIIa/FX (označovaný ako vonkajšia tenáza) a následne vznik malého množstva trombínu. Trombín nie je hemostaticky dostatočne účinný, aktivuje však FV, FVIII, FXI a trombocyty, zohrávajúce kľúčovú úlohu v ďalšej generácii trombínu (amplifikačná fáza). Uvoľnený trombín štiepi FVIII v lokusoch Arg372, Arg740 a v Arg1689. Vzniká VIIIa - kovalentne spojený heterotrimer zložený z A1/A2/A3-C1-C2 domén (chýba B doména). Systém vnútornej tenázy: V propagačnej fáze komplex FVIIIa/FIXa, označovaný ako vnútorná tenáza (FVIIIa-IXa-PI-Ca²⁺), aktivuje FX. Následne FXa vytvára s FVa komplex označovaný ako protrombináza, ktorá na povrchu záporne nabitých fosfolipidových membrán vedie ku generovaniu vysokých koncentrácií trombínu. Reakcia v komplexe tenázy je v prítomnosti všetkých zložiek výrazne urýchlená. Systém aktivovaného proteínu C: Dôležitým regulačným mechanizmom je inaktivácia FVIII rozštiepením ťažkého reťazca systémom proteínu C - jeho prirodzenej antikoagulačnej aktivity. Re-

akcie prebieha pri vzájomnej interakcii a aktivácii proteínu C, receptora trombínu - trombotomodulínu, proteínu S a solubilného endotelového receptora proteínu C.

AKUTNÍ LEUKEMIE

1937.

Léčba dětí s akutní lymfoblastickou leukémií v České republice ve studii ALL IC-BFM 2002

Starý Jan, Štěrba Jaroslav, Mihál Vladimír, Blažek Bohumír, Jabali Yahia, Černá Zdena, Procházková Daniela, Hak Jiří, Sedláček Petr, Mejstříková Ester, Zuna Jan, Janotová Iveta, Hrušák Ondřej, Trka Jan

(Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF a FN Motol, Praha; Klinika dětské onkologie FN, Brno; Dětská klinika LF UP a FN, Olomouc; Klinika dětského a dorostového lékařství FN, Ostrava; Dětské oddělení, Nemocnice, České Budějovice; Dětská klinika FN, Plzeň; Dětská klinika IPVZ, Masarykova nemocnice, Ústí nad Labem; Dětská klinika FN, Hradec Králové)

V letech 1996-2002 byly děti s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) léčeny v České republice podle protokolu ALL-BFM 95. Pravděpodobnost přežití do selhání (EFS) byla 73,1% a celkového přežití (OS) 80,8%. V období 1.11. 2002 – 15.11. 2007 byla Česká republika hlavním koordinátorem mezinárodní, léčbu ALL optimalizující studie ALL IC-BFM 2002, které se zúčastnilo 14 národních leukemických skupin ze 3 kontinentů. Pacienti byli řazeni do tří rizikových skupin podle časné odpovědi na léčbu, věku, iniciálního počtu leukocytů a přítomnosti Ph chromozomu či fúzního genu MLL-AF4. Všichni pacienti se zúčastnili hodnocení různých variant pozdní intenzifikace formou randomizované studie. Do mezinárodní studie se společnou databází bylo zařazeno více než 5 000 dětí a dospívajících do 18 let. V České republice jich bylo ze 314 dětí diagnostikovaných s ALL v tomto období do studie zařazeno 293 (dva pacienti byli vyřazeni pro finální analýzu). Zbývajících 21 pacientů bylo léčeno jinými protokoly určenými pro kojence, děti s Ph1+ALL či děti s hybridní leukémií. Do standardního rizika bylo zařazeno 104 dětí (35,7%), do středního 156 (53,6%) a kritéria vysokého rizika splnilo 31 (10,7%) pacientů. Úspěšnost v dosažení remise činila 97,6%, v remisi zemřelo 1,1% dětí. Randomizaci podstoupilo 70,8% pacientů. S mediánem sledování 5,7 r prodělalo 31 dětí (10,6%) relaps leukemie – 24 izolovaný relaps v kostní dřeni, 1 (0,4%) izolovaný relaps v CNS, 4 (1,4%) kombinovaný relaps v CNS a dva chlapci prodělali izolovaný testikulární relaps. Sekundární malignita se vyskytla u 6 (2,1%) dětí (AML: 2, MDS: 1, glioblastom: 1, EBV-LPD: 1, retikulohistiocytóza: 1). Pravděpodobnost 5-letého EFS/OS je pro celou skupinu 291 dětí 84/91,5%. Děti standardního rizika dosáhly EFS/OS 89,2/99%, středního rizika 83,1/89,9% a vysokého rizika 71/75%. Děvčata měla významně vyšší pravděpodobnost přežití bez selhání než chlapci (89,4% vs. 79,3%), děti mladší 10 let význam-

ně vyšší EFS/OS než děti starší (89,1/94,6% vs. 71,5/80,8%). Ve srovnání s předchozím protokolem ALL-BFM 95 (n=54; EFS 64,8%) došlo k významnému zlepšení výsledků léčby u pacientů s T-ALL (n=45, EFS 82%), jejichž prognóza se tak nelišila od dětí s BCP-ALL (n=246, EFS 84,4%). Další optimalizaci léčby zajišťuje v současné době používaná stratifikace pacientů do rizikových skupin dle výše minimální zbytkové nemoci měřené v jedné referenční laboratoři pro všechna centra molekulárními metodami 1 a 3 měsíce od zahájení léčby.

1877.

Alterace genu Ikaros (IKZF1) a jejich vliv na prognózu dětí s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL)
Volejníková Jana, Mejstříková Ester, Švojgr Karel, Starý Jan, Trka Jan, Froňková Eva
(Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha)

Ikaros je transkripční faktor exprimovaný ve více izoformách, který je klíčový pro vývoj lymfoidní linie. Nedávné studie prokázaly špatnou prognózu pacientů s ALL s delecemi v tomto genu. Dosud ale není jasný vliv IKZF1 na zařazení do léčebných rizikových skupin v současných protokolech ani optimální způsob jeho vyšetření. Diagnostické vzorky kostní dřeně (KD) 182 dětí s BCR/ABL-negativní ALL léčených protokolem ALL IC-BFM 2002 jsme vyšetřili dvěma metodami: 1. na úrovni DNA pomocí MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) a 2. na úrovni genové exprese pomocí RT-PCR a čipové elektroforézy (Agilent). Na základě analýzy krve zdravých dárců, remisních vzorků KD a sortovaných vývojových stádií lymfocytů jsme stanovili fyziologické rozmezí exprese izoform IKZF1. Podíl exprese krátkých nefunkčních izoform (Ik4, Ik4del, Ik4A, Ik6, Ik6del, Ik8) z celkové exprese všech izoform (včetně funkčních Ik1, Ik2) byl signifikantně zvýšen (>80%) u 13/182 (7%) pacientů. Tito pacienti měli horší 5-leté přežití bez relapsu (RFS; 69±13% vs. 90±2%; p=0,02). Mnohem významnějším prognostickým faktorem v rámci expresních dat však byla zvýšená exprese (>50%) samotné izoformy Ik6 (relaps u 5/10 pacientů; RFS 50±16% vs. 91±2%; p<0,0001). Metodou MLPA jsme detekovali delece v genu IKZF1 u 12/182 (7%) pacientů, kteří měli rovněž významně horší prognózu (RFS 46±15% vs. 91±2%; p<0,0001) a vyšší leukemické postižení kostní dřeně ve 33. dni léčby (p=0,008). Výsledky obou metod spolu překvapivě zcela nekorelovaly: pouze u 5/12 pacientů s genovou delecí byla změněná exprese IKZF1 a naopak, 6/10 pacientů se zvýšenou expresí Ik6 nemělo delece, což svědčí pro odlišnou příčinu změněné exprese. Spojené kritérium delece a/nebo zvýšená exprese Ik6 odhalilo oproti samotné MLPA další 2 pacienty, kteří následně zrelabovali a celkem identifikovalo 8/20 všech relapsů. Závěr: Oproti předchozím studiím jsme prokázali, že delece v genu IKZF1 nemusí nutně vést ke změně genové exprese. Na druhou stranu, změna genové exprese nemusí být nutně způsobena

delecí v genu. Oba typy alterací definují zčásti odlišné skupiny pacientů a oba měly negativní prognostický význam u dětí s BCR/ABL-negativní ALL léčených protokolem ALL IC-BFM 2002. Nejvíce ohrožených pacientů by pravděpodobně bylo možné odhalit kombinací obou metod. Pokud není současná aplikace obou metod možná, analýza DNA pomocí MLPA zřejmě identifikuje více rizikových pacientů než vyšetření genové exprese. Podpora: MSM 0021620813, NS/10472-3 a GAUK 363011.

2049.

Mutácie v génoch IDH1/2 u akútnych myeloidných leukémií s normálnym karyotypom: naše skúsenosti
Katrincská Beáta, Smutná Veronika, Sztokowski Tomáš, Divoká Martina, Sičová Kateřina, Holzerová Milena, Hubáček Jaromír, Pikalová Zuzana, Novák Martin, Galuszková Dana, Mužík Jan, Dušek Ladislav, Indrák Karel, Jarošová Marie
(Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc; Transfúzní oddělení, FN, Olomouc; Institut biostatistiky a analýz MU, Brno)

Akútne myeloidné leukémie s normálnym karyotypom (AML s NK) zahŕňajú heterogénnu skupinu akútnych leukémií. Pri klasifikácii a prognostickej stratifikácii tejto skupiny AML je významné určenie mutačného profilu génov NPM1, CEBPA, FLT3 a MLL. Mutácie v génoch izocitrátdehydrogenázy 1 a 2 (IDH1/2) predstavujú ďalšie kandidátne molekulárne markery, ktorých prognostický význam a potenciál pri monitorovaní minimálnej reziduálnej choroby sa u AML intenzívne študuje. V tejto práci sme sledovali výskyt mutácií IDH1/2 v skupine de novo AML s NK. Naším cieľom bolo zhodnotiť, či mutačný profil IDH1/2 súvisí s klinickými charakteristikami v dobe diagnózy, prognózou ochorenia a mutáciami v génoch NPM1, CEBPA, FLT3, WT1 a MLL, ktoré sledujeme u AML s NK. Analyzovali sme súbor 80 pacientov (vek 22 až 72) diagnostikovaných a liečených v období 1997 až 2011 na HOK FNOL. Leukemické blasty z doby diagnózy boli podrobené analýze mutácií v hore uvedených génoch metódou fragmentačnej analýzy a/alebo priameho sekvenovania. Na detekciu bodových mutácií IDH1 v kodóne R132 sme zaviedli metódu alelovo-špecifickej PCR s citlivosťou ~ 1%. Celkom 26 % (21/80) pacientov nieslo heterozygotné mutácie v génoch IDH1/2. Z nich sa u 8 pacientov (10 %) vyskytli mutácie v IDH1 (R132H resp. R132C) a u 13 pacientov (16 %) sme detekovali mutácie v IDH2 (R140Q resp. R172K). U 11 pacientov (14 %) sa v IDH1 vyskytoval synonymný (GGC/GGT) jednonukleotidový polymorfizmus rs11554137. U jedného pacienta sme v IDH1 identifikovali zatiaľ nepopísanú variantu T106M (ACG/ATG). Súčasne sa mutácie v IDH1 aj IDH2 v našom súbore nevyskytovali. Mutácie génov IDH1/2 koexistovali s mutáciami v NPM1 (11/21) a/alebo FLT3 (8/21) génoch; v ojedinelých prípadoch bola mutácia v IDH2 (typ R140Q) sprevádzaná mutáciou v CEBPA (1/21) resp. MLL (1/21) génoch. Mutačný pro-

fil IDH1/2 v našom súbore významne nekoreloval s klinickými parametrami s ohľadom na vek, pohlavie, počet leukocytov, či zastúpenie blastov v kostnej dreni alebo periférnej krvi. Prognostický význam mutačného profilu IDH1/2 a stabilitu mutácií IDH1/2 vo vzorkách pacientov po alogénnej transplantácii krvotvorných kmeňových buniek budeme komentovať v našom príspevku. Naše dáta potvrdzujú opakovaný výskyt mutácií v génoch IDH1/2 u AML s NK. Tieto mutácie sa v našom súbore navzájom vylučujú a majú tendenciu sprevádzať iné prognosticky významné mutácie. Grantová podpora: MSM 6198959205 a LF-2011-006.

1890.

Liečba molekulárnych relapsov u pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou

Tošková Martina, Dvořáková Dana, Ráčil Zdeněk, Bajerová Monika, Procházková Jiřina, Mayer Jiří
(*Interní hematologická klinika, FN a LF MU, Brno; Centrum molekulární biologie a genové terapie IHOK, FN a LF MU, Brno*)

Úvod: Dôkazy, že monitorácia minimálnej reziduálnej choroby (MRD) a skorá intervencia (tzv. preemptívna terapia) u pacientov (pac.) s non-APL akútnou myeloidnou leukémiou (AML), sú obmedzené. Metódy: Retrospektívna analýza molekulárnych relapsov u pac. s AML s molekulárnym markerom (RUNX1-RUNX1T1, CBFMYH11, MLL fúzny gén a NPM1) a ich terapie. Na monitoráciu MRD sme použili RQ-PCR. Molek. relaps bol definovaný ako znovu sa objavenie fúzneho transkriptu mutovaného génu alebo jeho 10-násobný vzostup u pac. s perzistentnou pozitivitou, zatiaľ čo cytologické, flowcytometrické a cytogenetické vyšetrenie kostnej drene zostáva negatívne. Výsledky: V období od 1/1/2003 do 31/12/2010 sme liečili 30 molekulárnych relapsov u 19 pac. Medián dĺžky sledovania bol 24 mesiacov (8-95 mesiacov). Pac. relabovali molekulárne s mediánom 5,6 mesiaca (0,3-31 mesiacov). Na liečbu sme použili v 20% konvenčnú chemoterapiu (CHT, najčastejšie „5+2“), v 30% clofarabin, v 17% gentuzumab ozogamicín (GO) a v 30% imunomoduláciu po alogénnej transplantácii hematopoetických kmeňových buniek (alo HSCT). Celková odpoveď na liečbu v našom súbore bola 66% (celková molek. remisia – CMoR – 53%, parciálna molek. remisia – PMoR – 13%, stabilná choroba – SD – 13%, progresia – 20%). Najlepšiu odpoveď dosiahli pac. liečení clofarabinom – 88% (CMoR – 66%, PMoR – 12%, SD – 0%, progresia 22%) a CHT – 84% (CMoR – 50%, PMoR – 34%, SD – 16%, progresia – 0%). Odpoveď na liečbu GO bola 60% a na imunomoduláciu po alo HSCT 44%. Neutropénia a trombocytopénia gr. III-IV sa vyskytla v 100% prípadov liečených clofarabinom, CHT a GO a v 11% a 0% prípadov po imunomodulácii po alo HSCT. Závažné komplikácie sa vyskytli u 17% prípadov liečených CHT (1 úmrtie na toxicitu) a u 11% prípadov liečených clofarabinom, u ostatných prípadov sa závažné kom-

plicácie nevyskytli. 30% pac. následne po liečbe molekulárneho relapsu podstúpilo alo HSCT. Nový relaps v sledovanom období sa vyskytol v 58% s mediánom 7 mesiacov (3-18 mesiacov). Z pac., ktorí po liečbe molekulárneho relapsu dosiahli CMoR, zrelabovalo 50% (8/16), zatiaľ čo u tých, čo boli v PMoR to bolo 100% (3/3). 1-ročné prežitie bez choroby v našom súbore bolo 56% a jednoróčné celkové prežitie 74%. Záver: Naše výsledky ukazujú vhodnosť monitorácie MRD a pre-emptívneho prístupu používajúc molekulárne markery u pacientov s AML. Tento prístup má primeranú toxicitu a vedie k 2/3 odpovedí. Aj napriek použitiu alo HSCT pri liečbe molekulárneho relapsu sa u 58% objavil nový relaps.

2041.

Nekrotická alterácia nádorového infiltrátu akútnej leukémie v kostnej dreni: možnosti a limity výpovednej hodnoty bioptického nálezu v korelácii s prietokovo-cytometrickými a genetickými vyšetreniami

Plank Lukáš, Gyarfás Ján, Mistrík Martin, Demečková Eva, Copáková Lucia, Balhárek Tomáš, Szépe Peter, Marcinek Juraj, Kviatkovská Zuzana, Farkašová Anna, Hudeček Jan
(*ÚPA a Konzultačné centrum bioptickej diagnostiky ochorení krvotvorby JLF UK a UNM a Martinské bioptické centrum, s.r.o., Martin – SK; Oddelenie klinickej hematológie, Národný onkologický ústav Bratislava – SK; Klinika hematológie a transfuziológie UN, Bratislava – SK; Oddelenie lekárskej genetiky, Národný onkologický ústav, Bratislava – SK; Klinika hematológie a transfuziológie JLF UK a UN, Martin – SK*)

Úvod: Nekróza infiltrátu akútnej leukémie (AL) v bioptickom obraze kostnej drene (KD) nie je častá a býva neúplná, so zachovaním časti „viabilných“ nádorových buniek. Totálna nekróza infiltrátu AL je zriedkavá a ak absentujú známky leukemizácie, tak stanovenie diagnózy môže byť problematické. Materiál a metodika: Z biopsií KD z obdobia 2010-11 sme vybrali prípady nekrózy nádoru pacientov, u ktorých sa aspoň jedným z vyšetrení (bioptické, prietokovo-cytometrické /FC/ alebo genetické) potvrdila diagnóza AL. Výsledky: sú prezentované na modeli vyšetrení 3 zo 7 pacientov: A) 59-ročná žena s nálezom pancytopenie, v „suchom“ aspiráte nájdené nádorové bunky viedli k otázke AL (AML alebo L3) versus rhabdomyosarkóm. V biopsii KD bola difúzna nekróza masívneho infiltrátu, viditeľné boli len „tiene“ buniek s profilom MPO+ a CD34+. Pacientka bezprostredne po stanovení diagnózy zomrela. B) 20 ročný muž v stave po alogénnej transplantácii pre T-ALL (s vysokým rizikom) prijatý pre susp. relaps ochorenia. V biopsii KD bol obraz difúznej nekrózy nádoru, jeho bunky mali profil CD3-, TdT-, CD43+, MPO+ a dg. sekundárnej AML potvrdil aj nález FC a genetických vyšetrení. C) 51 ročný muž biopsizovaný pre útlm krvotvorby s nálezom nekrózy difúzneho infiltrátu morfológicky bez vitálnych buniek. Zrejme bola pozitívna PAX5+, TdT+ a CD10+, FC vyšetrenia boli opakovane negatívne a opakované biopsie vždy obsahovali

vali len nekrotický infiltrát. Postupne dochádzalo k vyplavovaniu blastov do periférnej krvi a dg. zrelej ALL B-radu bola verifikovaná FC aj genetickým vyšetrením. V biopsii KD po indukčnej liečbe bola v 1/2 bioptického valca aplázia krvotvorby a difúzna fibróza, v 1/2 bol identický nekrotický infiltrát s profilom CD10+ a TdT+ (pri „strate“ PAX5). FC vyšetrenie dokázalo len 0.3% CD19+ buniek. Diskusia a záver: Modelové príklady nútia zvážiť výpovednú hodnotu imunohistochemickej pozitivity antigénov AL v nekroticky alterovaných bunkách. Tieto nálezy bez podpory FC a/alebo genetického vyšetrenia budia rozpaky. Patogenéza nekrózy infiltrátu AL v preterapeutickú fázu je nejasná. Nekróza infiltrátu AL v postterapeutickom období by mohla mať vzťah k indukčnej liečbe, otázny je jej klinický význam pre ďalší manažment pacienta. Uvedené modelové situácie poukazujú aj na význam dobrej tímovej spolupráce v diagnostike a sledovaní zhubných nádorových ochorení. Podporené Centrom excelentnosti CEPV I (ITMS kód 26220120016), CEPVII (ITMS kód 26220120036) a RKM (ITMS kód 26220220113).

1996.

Plasma cytokine and growth factor levels in acute myeloid leukemia patients

Horáček M. Jan, Jebavý Ladislav, Vašatová Martina, Kupsa Tomáš, Žák Pavel, Tichý Miloš, Malý Jaroslav (Department of Internal Medicine, University of Defence, Faculty of Military Health Sciences, Hradec Králové; Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, University Hospital and Charles University, Faculty of Medicine, Hradec Kralove; Department of Medicine 2 – Clinical Hematology, University Hospital and Charles University, Faculty of Medicine, Hradec Kralove; Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, University Hospital and Charles University, Faculty of Medicine, Hradec Kralove)

Introduction: Cytokines and growth factors have been studied as markers of immune system activation in various diseases including hematological malignancies. The aim of our study was to analyze plasma levels of multiple cytokines and growth factors by biochip array technology in acute myeloid leukemia (AML) patients. Methods: A total of 15 AML patients (mean age 48.7±12.1 years, median 51, 8 males) treated with cyclic chemotherapy (3+7, 2+5, HiDAC) alone or in combination with high-dose chemotherapy (preparative regimen Bu/Cy2 or Cy/TBI) followed by autologous stem cell transplantation were studied. We evaluated plasma levels of the following cytokines: interleukin-1 alpha (IL-1 alpha), interleukin-1 beta (IL-1 beta), interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interleukin-10 (IL-10), vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interferon-gamma (IFN-gamma), epidermal growth factor (EGF), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1). All biomarkers were measured by biochip array technology on

Evidence Investigator analyzer (Randox) at the diagnosis of AML (active leukemia) and at 6 months after completion of chemotherapy (durable complete remission /CR/ in all patients). Results: Comparing cytokines levels in active leukemia and in durable CR, we found significant decrease in plasma IL-1 beta (2.56±3.27 ng/L vs. 1.63±2.17 ng/L; p<0.05), IL-6 (46.24±83.14 ng/L vs. 2.49±2.51 ng/L; p<0.05), IL-8 (104.99±167.30 ng/L vs. 11.72±4.34 ng/L; p<0.05), IL-10 (7.58±14.15 ng/L vs. 2.22±4.78 ng/L; p<0.05) and TNF-alpha (4.65±4.27 ng/L vs. 2.19±1.13 ng/L; p<0.05). On the other hand, we found significant increase in VEGF (63.93±67.85 ng/L vs. 114.39±54.90 ng/L; p<0.01) and EGF (16.48±33.50 ng/L vs. 64.42±35.33 ng/L; p<0.001). Plasma levels of other cytokines were without significant differences. Conclusions: Our preliminary results indicate that plasma levels of some cytokines and growth factors (EGF, VEGF, IL-1 beta, IL-6, IL-10, TNF-alpha) could serve as useful diagnostic and prognostic parameters for AML patients, showing activity of the disease. Further studies in a larger number of patients and comparing cytokine levels with established prognostic factors (cytogenetics, molecular genetics) will be needed to define the potential role of these and additional markers in the risk stratification of AML patients. The work was supported by research projects MO 0FVZ0000503 and MZO 00179906.

LABORATORNÍ SEKCE

1927.

Faktory ovlivňující kvalitu vyšetření v laboratořích CLIP

Grecová Veronika, Valová Taťána, Řezníčková Leona, Bozová Miroslava, Čejková Štěpánka, Thürner Daniel, Hrdličková Alena, Semerák Pavel, Trka Jan, Mužíková Kateřina

(CLIP- molekulární genetika, Childhood Leukaemia Investigation Prague, Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2. LF a FN Motol, Praha; CLIP- cytometrie, Childhood Leukaemia Investigation Prague, Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2. LF a FN Motol, Praha)

V laboratořích CLIP, jež jsou součástí Laboratorního centra Kliniky dětské hematologie a onkologie 2. LF UK a FN Motol, provádíme diagnostiku a sledování pacientů s akutními leukemiemi pomocí průtokové cytometrie a molekulárně genetických metod. Abychom dosáhli dostatečně spolehlivých výsledků, je třeba dodržovat pracovní postupy, které neohrozí kvalitu vyšetřovaného vzorku. Kritickými preanalytickými body, jež mohou mít zásadní vliv na výsledek vyšetření, jsou odběr (antikoagulans, kvalita odběru, objem odebraného materiálu), množství leukocytů ve vzorku a transport vzorku (teplota vzorku a doba transportu). Odběr: Antikoagulans - nevhodnější k molekulárně genetickým vyšetřením jsou K2EDTA, NA3Citrát nebo ACD roztok. V žádném případě nelze zpracovat materiál bez protisrážlivého činidla.

Diskutabilní je použití heparinu pro jeho inhibici polymérazové řetězcové reakce (PCR), jenž je jednou ze základních metod molekulární genetiky. Objem odebraného materiálu - pro diagnostické účely je nutné, aby bylo z primárního vzorku získáno alespoň 20 milionů blastických elementů. Pro zajištění tohoto množství je žádoucí, aby objem odebraného materiálu byl v případě kostní dřene minimálně 2 ml. Počet leukocytů: Ovlivňuje výsledek (při leukopenii hrozí u některých metodik falešně negativní výsledek). Transportu a teplota: Transport - nejzazším termínem pro zpracování vzorku je 24 hodin od odběru. V pokusech s expresí mRNA v čase, testované na fúzním genu TEL/AML1 a genu WT1 bylo prokázáno, že při zpracování vzorku déle než 24 hodin od odběru významně klesá množství mRNA. Po 48 hodinách od náběru periferní krve kleslo množství mRNA genu WT1 o 65%, v kostní dřeni kleslo množství mRNA genu TEL/AML1 o 82%. Teplota - optimální je laboratorní teplota. Ze zmražených vzorků kostní dřene, periferní krve, mozkomíšního moku není možné živé buňky a/nebo mRNA extrahovat a provést vyšetření. Ostatní faktory: Léky – u pacientů zaléčených kortikoidy je velmi obtížné provést diagnostiku základního onemocnění. Vzhledem k tomu, že výsledky molekulárně genetického vyšetření a vyšetření průtokovou cytometrií jsou jedním ze základních stratifikačních parametrů, které ovlivňují léčbu pacientů, je velmi důležité, aby materiál, který putuje do laboratoří CLIP, byl správně odebraný a včas dodaný. Kvalita a včasnost doručení dostatečného množství biologického materiálu z klinických pracovišť jsou důležitými faktory ovlivňující naše vyšetření.

2074.

Molekulární odpověď po 3 měsících léčby imatinibem predikuje léčebnou odpověď u pacientů s chronickou myeloidní leukémií – zkušenosti jednoho centra

Rožmanová Šárka, Rohoň Peter, Zapletalová Jana, Divoká Martina, Marešová Ivana, Jarošová Marie, Indrák Karel, Faber Edgar

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

Úvod: Imatinib (IM) navozuje kompletní cytogenetickou odpověď (CCyR) u většiny pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) v chronické fázi. Navzdory tomu přibližně u 30% nemocných dochází k selhání léčby a progresi onemocnění. Proto narůstá potřeba definice biologických parametrů, které by predikovaly (buď v době diagnózy, nebo během prvních měsíců) léčebnou odpověď na IM. Tím by bylo možno odlišit pacienty s menší nadějí na

dosažení optimální léčebné odpovědi na IM, které je nutno dále bedlivě sledovat a v případě potřeby zvážit alternativní léčebný přístup. Cíl: Zhodnotit význam molekulární odpovědi v definovaném čase jako prognostický faktor odpovědi na IM. Metody: Molekulární odpověď byla sledována pomocí RQ-PCR za použití EAC protokolu. Léčebná odpověď byla při retrospektivní analýze hodnocena podle kritérií ELN. Tyto byly hodnoceny po 18 měsících léčby IM u 45 pacientů; 9 pacientů bylo hodnoceno v intervalu kratším s minimem 7 měsíců. Charakteristika souboru: Byl analyzován soubor 54 pacientů s CML v CP (36 mužů, 18 žen), kteří byli léčeni v 1. linii IM. Medián věku v době zahájení léčby IM byl 52 let (rozmezí 19-76). Celková délka sledování byla 11 až 95 měsíců (medián 37). Výsledky: Odhadovaná PFS, EFS a OS celého souboru nemocných v 5 letech je 85%, 71% a 89%. Celkový výskyt CCyR a MMR po 18 měsících léčby byl 81% a 56%. Podle ELN kritérií, 59% pacientů dosáhlo optimální odpovědi, 24% mělo suboptimální odpověď a u 17% nemocných došlo k selhání léčby. Pacienti byli dále rozděleni dle hodnoty exprese BCR/ABL (IS) po 3 měsících léčby IM do 3 skupin: $\leq 1,0\%$ (12 nemocných), rozmezí $>1,0\%$ až $\leq 10\%$ (26 nemocných) a $>10\%$ (16 pacientů). Všechny tři skupiny byly srovnatelné; co se týká Sokalova ($p=0.520$) nebo Hasfordova ($p=0.154$) skóre. Při porovnání skupin bylo prokázáno, že pacienti s nižšími hladinami BCR-ABL (IS) po 3 měsících léčby IM mají signifikantně vyšší pravděpodobnost následného dosažení CCyR ($p<0.0001$) a MMR ($p<0.0001$) než nemocní s vysokými hladinami. Pokud byla hodnocena odpověď na léčbu dle ELN kritérií, bylo prokázáno, že úroveň molekulární odpovědi po 3 měsících identifikuje rychle odpovídající nemocné, kteří mají pravděpodobně lepší prognózu v důsledku brzkého dosažení optimální léčebné odpovědi (Tab 1.). Závěr: Naše výsledky potvrzují, že hlubší molekulární odpověď po 3 měsících je spojena s rychlejším nástupem optimální léčebné odpovědi pacientů na léčbu IM. Práce je podporována grantem MSM 6198959205 a LF-2011-006.

1958.

Porovnání různých cílů pro sledování minimální residuální nemoci (MRN) u pacientů s přestavbami genu MLL

Řezníčková Leona, Grecová Veronika, Mužíková Kateřina, Froňková Eva, Trka Jan, Zuna Jan

(CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2. LF, Praha)

Leukemie s přestavbami genu MLL jsou považovány za vysoce rizikové, jejich prognosa patří k nejhorším me-

BCR/ABL (IS) v 3 m		$\leq 1,0\%$	$> 1,0$ až $\leq 10\%$	$> 10\%$
		> 2 log redukce	1-2 log redukce	< 1 log redukce
n = 54		n = 12 (22%)	n = 26 (48%)	n = 16 (30%)
hodnocení dle ELN	optimální	12 (100%)	14 (54%)	6 (38%)
	suboptimální	0	7 (27%)	6 (38%)
p=0.013	selhání	0	5 (19%)	4 (24%)

zi dětskými leukemiemi. Monitorování minimální residuální nemoci (MRN) se v současných léčebných strategiích akutní lymfoblastické leukemie (ALL) stala z experimentální metody klíčovou součástí protokolů a hraje významnou roli při stratifikaci pacientů. Nejcitlivější metody monitorování MRN založené na polymerasové řetězové reakci (PCR) se liší podle cíle, který je použit ke kvantifikaci. U ALL standardně používané cíle - přestavby genů pro imunoglobuliny a T-buněčné receptory (Ig/TCR) u MLL+ ALL někdy selhávají (jde často o velmi nezralé leukemie s malým počtem přestaveb), jako universální cíl lze použít přímo přestavbu genu MLL a to na RNA (cDNA) i DNA úrovni. Komplexní vzájemné porovnání kvantifikace různých cílů nebylo dosud ne větším souboru provedeno. Publikovaná data a naše vlastní výsledky ukazují, že u různých typů ALL mohou mít jednotlivé metodiky různou informativní hodnotu - zatímco u TEL/AML1+ ALL ukazují různé cíle vynikající korelace, u leukemií s fusí BCR/ABL je tato korelace nedostatečná. Pro naši studii jsme měli k dispozici materiál 16 pacientů s MLL+ ALL (MLL/AF4 n=6, MLL/ENL n=5, MLL/AF10 n=3, MLL/AF9 n=2). Vyšetřili jsme celkem 243 vzorků těchto pacientů a určili v nich metodou kvantitativní PCR (qPCR) hladiny MRN. Jako cíle qPCR jsme použili přestavby Ig/TCR,

1866.

K asynchronii při diferenciaci a zrání buněk krevních malignit

Smetana Karel

(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

„Maturační asynchronie“ je velmi častým nálezem při diferenciaci a zrání buněk krevních malignit. Nejčastěji je pozorováno opožděné vyzářování chromatinové struktury buněčného jádra ve srovnání s cytoplasmou, případně je tomu naopak. Méně časté je pomalé, či naopak urychlené „vymizení“ jáderka ve srovnání s nezralou strukturou jádra a cytoplasmy včetně její bazofilie. Tyto typy maturační asynchronie jsou viditelné i při běžném panoptickém barvení roztěrových preparátů. Při užití ultrastrukturálních a cytochemických metod je patrná nejen morfologická podstata a mechanismy uvedených asynchronií, ale dochází i k detekci dalších poruch, které při užití panoptického barvení nejsou zjevné. Světelně mikroskopická i ultrastrukturální cytochemie odhalila v leukemických blastech rozdíly ve zrání, tj. strukturální expresi transkripcí RNA mezi jednotlivými nukleoly v jedné buňce. Ultrastrukturální charakteristika některých myelomových buněk svědčila pro nezralost jáderka, či jádra při současně plně zralosti cytoplasmy s bohatě vyvinutým až dilatovaným hrubým endoplasmatickým retikulem. Pomocí počítačové obrazové RNA denzitometrie na úrovni jedné buňky je možné zachycení maturační asynchronie podmíněné „zmrazením“ odsunu RNA z jáderka do cytoplasmy v leukemických blastech. Pomocí počítačové obrazové denzitometrie bylo také zjištěno přetrvá-

vání nízké kondenzace heterochromatinu při jaderné membráně ve zralých leukemických lymfocytech a leukemických myelocytech s hodnotami blízkými časným vývojovým stádiím obou buněčných řad. Cytochemické metody pro průkaz klíčových nukleolárních proteinů na úrovni světelného i elektronového mikroskopu také ukázaly předčasné „stárnutí“ leukemických myeloblastů. Uvedené „diferenční a maturační asynchronie přispívají k dysplastickým změnám leukemických a myelomových buněk. Není pochyb, že některé přispívají k existenci buněčné rezervy pro aktivaci choroby a pravděpodobně i k rezistenci buněk k působení cytostatik (klidový a restimulovatelný stav jaderek v jádrech leukemických blastů, perzistence nízké kondenzace heterochromatinu ve zralejších stádiích vývoje leukemických buněk lymfocytární a granulocytární řady, nezralost nukleolů a chromatinu v myelomových buňkách s rozvinutým hrubým endoplasmatickým retikulem). Jiné pak mohou souviset se ztrátou proliferativní schopnosti avšak s přetrvávající přítomností leukemických blastů v kostní dřeni a periferní krvi (translokace klíčových nukleolárních proteinů) *S částečnou podporou Výzkumného záměru 000237360 Min zdrav. ČR.

1948.

Identification of novel molecular markers for the follow-up of minimal residual disease in hematological disorders

Hardekopf D, Warren, Jančušková Tereza, Jarošová Marie, Plachý Radek, Žejšková Lenka, Čmejla Radek, Vydra Jan, Kozák Tomáš, Karas Michal, Koza Vladimír, Zavelová Alžběta, Žák Pavel, Peková Soňa

(Chambon, Inc., Laboratory for Molecular Diagnostics, Prague; Faculty Hospital Olomouc, Department of Clinical Hematology and Oncology; Faculty Hospital Královské Vinohrady, Department of Clinical Hematology, Prague; Faculty Hospital Hradec Králové, Department of Clinical Hematology, Hradec Králové)

Modern molecular diagnostic techniques allow the detection of minimal residual disease (MRD) in hematological malignancies with high sensitivity, allowing patient-specific assays of MRD levels over the course of treatment. One challenge for these techniques is finding appropriate MRD marker targets. For instance, PCR-based MRD analysis requires unique sequence-specific information for the malignant clone of interest. In many acute leukemias, such detailed information is lacking, either because no abnormality is detected (e.g. in 40-50% of adult Acute myeloid leukemia-AML), or the resolution of cytogenetic methods is too low to precisely define newly-found abnormalities. We have used multicolor-FISH (mFISH) and related mBAND molecular cytogenetic techniques to perform mFISH karyotyping on 58 patients, including MDS/AML (28 cases), ALL (1 case), CML (2 cases), and B- and T-cell lymphomas (16 cases). Using this approach we have identified chromosomal abnormal-

lities in about 35% of analyzed cases. The aberrations found involved the recurrent aberrations t(15;17), t(8;21), inv(16), t(9;22), -5q, -7, +8 but also an array of unique abnormalities, such as der(15)t(5;15)(q15;q24), t(6;12)(p22;q13), and der(17)t(12;17)(q14;pter), which may serve as possible targets for molecular MRD follow-up. To characterize such targets, we seek to bridge the gap from cytogenetic resolution down to higher-resolution molecular techniques. For this, we employ multicolor FISH using DNA probes with known cytogenetic location. These probes are drawn from a human genomic library of over 25,000 bacterial artificial chromosome (BAC) clones with human DNA inserts, covering almost 100% of the genome and therefore allowing us to develop probes to almost any conceivable target breakpoint. Starting with breakpoint information from mFISH/mBAND, we perform consecutive multi-color/multi-BAC hybridizations around the region of interest, looking for breakpoint-spanning probes. Thus, we can define novel breakpoints with resolution down to the level of individual BAC clones (around 150-300 kbp). The next step comprises higher-resolution FISH mapping using molecular combing of target DNA, which stretches and linearizes individual DNA molecules. The final goal is to map genomic abnormalities to a resolution amenable to long-range PCR, yielding specific targets for MRD detection, and allowing clone-specific Real-Time PCR assays for sensitive and specific monitoring of MRD in hematological patients.

**XV. KONFERENCE
OŠETŘOVATELSTVÍ A ZDRAVOTNÍCH
LABORANTŮ
(LABORANTSKÁ SEKCE 2)**

1902.

Význam hygieny rukou v laboratorním provozu

Čiklová Lada

(Oddělení nemocniční hygieny, Fakultní nemocnice, Olomouc)

Hygieny rukou je často diskutovanou problematikou především v přímé péči zdravotníků o pacienta. Zde význam zejména hygienické dezinfekce rukou sehrává obrovskou roli ve vzniku a šíření nemocničních nákaz. V laboratorních provozech však tato problematika není tolik zjevná ve vztahu k pacientovi, ale má zásadní význam při ochraně zaměstnanců před vznikem profesionálních nákaz. Jsou laboratorní provozy kde dobře/špatně provedená dezinfekce rukou může mít velký vliv na kvalitu výsledku vyšetření. Cílem tohoto sdělení je osvětlit základní orientaci v problematice hygienické dezinfekce rukou a zásad správného používání rukavic v laboratorních provozech; poskytnutí několika užitečných tipů k další edukaci zaměstnanců v této oblasti.

1878.

Diagnostika lymfadenopatií průtokovou cytometrií

Šauerová Renata, Korecká K., Karban J., Vondráčková B., Bušiková L., Skálová M., Kvasniška J.

(UKBLD Centrální hematologická laboratoř a Trombotické centrum VFN, Praha)

Úvod: Zvětšené lymfatické uzliny jsou ve VFN vyšetřovány histologicky, imunohistochemicky a cytologicky z otiskových preparátů. Tyto metody jsou vždy doplněny imunofenotypizací lymfoidních buněk uzliny. Cílem imunofenotypizace lymfatických uzlin je průkaz nebo vyloučení T a B lymfoproliferací. Cíl: Cílem naší studie bylo srovnání výsledků imunofenotypizace s histologickým vyšetřením uzlin, které bylo provedeno na Ústavu patologie 1. LF UK a VFN. Soubor a metody: Byla provedena analýza údajů 144 pacientů, kterým byla exstirpována uzlina pro podezření na maligní lymfom. K vyšetření byl použit široký panel monoklonálních protilátek, který umožňuje detekci neoplastické lymfoidní populace: CD45/CD14/CD19, NK/NK/CD19, CD23/CD5/CD19, CD10/CD20/CD19, CD10/CD38/CD19, FMC7/CD79b, CD19, CD43/CD22/CD19, CD20/CD11c/CD19, -/CD123/CD19, KAPPA/LAMBDA/CD19, CD4/CD8/CD3, CD2/CD30/CD3, CD7/CD1a/CD3, CD16/HLA DR/CD3 K měření byl použit průtokový cytometr FACSCalibur™ fa BD a analýza výsledků byla provedena pomocí softwaru CellQuest™. Výsledky: Ze souboru mělo 65 pacientů výsledky histologie a průtokové cytometrie negativní, u 79 pacientů byla prokázána diagnosa non-Hodgkinova lymfomu jako např. FCL, MCL, MZL, LPL, SLL/CLL, kde se naše výsledky shodovaly v 94%, u 3 pacientů (6%) se výsledky lišily (1 pacient měl histologicky potvrzen B-NHL(FCL), dle imunofenotypizace byl výsledek negativní, 1 byl histologicky uzavřen jako B-NHL(MCL), dle průtokové cytometrie se jednalo o B lymfoproliferaci blíže neurčenou a další byl uzavřen jako B-NHL(MZL), avšak imunofenotypizace poukazovala na B-NHL(LPL). Největší diskrepance výsledků (negativní průtoková cytometrie, pozitivní histologie) byla zjištěna u difúzních velkobuněčných B lymfomů (DLBCL) (91%) a u periferních T lymfomů (50%). 100% neshoda byla v případě Hodgkinova lymfomu, kde jsme ve sledovaném souboru flowcytometricky neprokázali žádný pozitivní výsledek. Diagnosa byla potvrzena jenom dle histologie. Závěr: Z našich výsledků vyplývá, že imunofenotypizace lymfatických uzlin je rychlá vyšetřovací metoda, spolehlivá zejména v diagnostice B-NHL, krom DLBCL. Její výhodou je znalost výsledku v den odebrání uzliny. Dle imunofenotypu je možné většinou určit přesný typ non-Hodgkinova lymfomu, ale k úplnému závěru diagnózy je histologické vyšetření uzliny nevyhnutelné. Zvláště pak v případech Hodgkinova lymfomu, kde je imunofenotypizace diagnosticky nepřínosná. Podpořeno: VZ MZO 00064165

2056.

Cytogenetické vyšetření u difúzního velkobuněčného B lymfomu

Hanzlíková Jana, Prekopová Ivana, Kropáčková Jitka, Holzerová Milena, Mičková Pavla, Chytilíková Radka, Jarošová Marie

(Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Difúzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL) je difúzně rostoucí nádor z velkých B lymfocytů. Vzniká de novo nebo transformací lymfomů nižšího stupně malignity, jako je například folikulární lymfom (FL). Jde o nejčastější typ ne Hodgkinských lymfomů (NHL), tvoří asi 30% všech lymfomů a patří mezi agresivní typy lymfomů. DLBCL se vyskytuje v každém věku a zpočátku proliferuje v místě svého vzniku, tj. převážně v uzlinách, infiltrace kostní dřeně bývá pouze ve 22%. Heterogenní skupinu DLBCL je možné na základě genové exprese rozdělit do tří prognostických podskupin: na GC DLBCL, ABC DLBCL a PMBL (primární mediastinální B lymfom). Každá tato skupina má nejčastější chromosomové změny v karyotypu a jejich nálezy tak může upřesnit zařazení nemocného do prognostické podskupiny. Určování chromosomových změn je založeno na klasickém cytogenetickém vyšetření nádorových buněk získaných převážně excizní lymfatické uzliny nebo vyšetřením kostní dřeně při infiltraci nádorem. Klasická cytogenetika je doplněna i vyšetřením metodami molekulární cytogenetiky. V našem sdělení budeme demonstrovat na několika příkladech metodiku cytogenetického vyšetření buněk lymfatické uzliny a ukážeme zajímavé cytogenetické nálezy u nemocných s DLBCL. Práce je podporována grantem IGA NT11103, MŠMT 6198959205, studentským grantem University Palackého LF-2011-006

1904.

Příprava protinádorových vakcín pro pacienty s mnohočetným myelomem s využitím autologních dendritických buněk a monoklonálního imunoglobulinu jako nádorového antigenuVidláková Petra, Macková Klára, Zahradová Lenka, Očadlíková Darina, Kyjovská Drahomíra, Hájek Roman
(OKH-LEHABI FN, Brno; IHOK FN Brno)

V letech 2006 – 2008 probíhala na našem pracovišti ve FN Brno klinická studie, kdy byla 7 pacientům s mnohočetným myelomem (MM) se stabilním onemocněním nebo s pomalou progresí nevyžadující léčbu podávána protinádorová vakcína. Každému pacientovi bylo intradermálně podáno 6 individualně připravených vakcín s odstupem 1 měsíce. Vakcína obsahovala autologní dendritické buňky (DB) naložené autologním Id-proteinem jako nádorovým antigenem. Příprava vakcíny probíhala podle podmínek správné výrobní praxe (SVP). DB byly získány z periferní krve (PK) pacientů a kultivovány po dobu 9 dnů za přítomnosti cytokinů IL-4 a růstového faktoru GM-CSF. Po 5 dnech kultivace byly DB naloženy

autologním monoklonálním imunoglobulinem (MIg), tzv. Id-proteinem, který produkují MM buňky. Po přidání maturacního faktoru TNF- α došlo k úplnému dozrání DB. Funkční charakteristika DB byla sledována pomocí imunofenotypizace na průtokovém cytometru. Imunologická odpověď na vakcínu byla hodnocena metodou ELISpot. Klinická odpověď byla hodnocena měřením koncentrace MIg v séru pacientů. Po ukončení vakcinace byli pacienti sledováni ještě dalších 6 měsíců. Bylo připraveno celkem 42 vakcín vyhovujících kritériím podání. Ze 60×10^6 mononukleárních buněk PK bylo získáno $7,40 \times 10^6$ DB ($0,89 \times 10^6$ - $36,96 \times 10^6$), medián (min - max). Funkční charakteristika DB byla prokázána pomocí imunofenotypizace na průtokovém cytometru, v den podání bylo 92,90 % HLADR/CD86 pozitivních DB (32,10 % - 99,30 %), medián (min - max). V průběhu dosavadní doby sledování 31 měsíců (15 - 31 měsíců), medián (min - max), byla zaznamenána stabilizace onemocnění ve fázi plató u 4 pacientů, u 3 pacientů trvá pomalá progresse bez nutnosti léčby. Pacienti vakcínu snášeli velmi dobře, bez závažných vedlejších účinků. Tato práce byla podpořena grantem MSMT LC 06027, MZCR NR8945-4

1892.

Automatizace procesu HLA-SBT (sequence-based typing) v HLA laboratoři ČNRDD: vyšší kapacita, vyšší standardizace a časnější výsledek HLA typizaceBlažek Jan, Kůsová Jana, Halová Kateřina, Jindra Pavel, Venigová Petra
(HLA laboratoř ČNRDD, Plzeň)

HLA geny jsou nejpolymorfnějšími geny lidského organismu vůbec (popsáno > 6000 alel). Právě pro transplantaci krvetvorných buněk (TKB) je HLA typizace klíčová, neboť co nejpřesnější shoda v HLA genech je pro její výsledek klíčová. Původní nejrozšířenější metodika PCR se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP) je již v současnosti zcela nedostačující. S ohledem na velký počet popsaných alel jsou nutné stovky PCR reakcí a současně musí být stále průběžně rozšiřován počet sekvenčně specifických primerů, tak aby byly detekovány všechny nově popisované alely. PCR-SSP je tudíž metodikou velmi pracnou s minimální možností alespoň částečné automatizace, navíc v určitých případech neposkytuje dostatečně podrobné výsledky. Za zlatý standard pro HLA typizace u nepříbuzenských TKB je proto v současnosti považována přímá sekvenace HLA genů (SBT-sequence based typing), kterou stanovíme přímo nukleotidovou sekvencí exonů kódujících aloreaktivní část HLA molekul. HLA laboratoř ČNRDD typizuje pacienty a potenciální nepříbuzné dárce pro česká i zahraniční transplantáční centra. Standardně provádíme typizaci genů HLA-A,B,C,DRB1,DQB1 na úrovni vysokého rozlišení (tzv. 4-digits). Dříve byla používána metodika PCR-SSP, od roku 2007 jsou typizace primárně prováděny zmiňovanou přímou sekvenací-HLA-SBT. U této metodiky je nezby-

ná purifikace amplifikačních a sekvenčních produktů před vlastní analýzou a tento proces je opět časově i personálně velmi náročný – pro 1 typizovaného jedince jde o purifikaci desítek reakcí. Původní kolonková manuální metodika byla s nárůstem požadovaných vyšetření limitujícím prvkem pro včasné výsledky SBT HLA typizace. Proto byla koncem roku 2009 implementována metodika purifikace „Solid Phase Reversible Immobilization“ (SPRI) využívající magnetických částic AgenCourt CleanSEQ (Beckman-Coulter) a tato purifikace byla plně automatizována pomocí robotického pipetovacího zařízení Biomek 300 (Beckman-Coulter). Validace i následné průběžné vyhodnocování výsledků prokázaly vyšší kvalitu a standardizaci purifikovaných produktů oproti původní kolonkové metodě. Od roku 2010 je takto průměrně měsíčně kompletně HLA typizováno 30-40 jedinců. Celkově tak již bylo purifikováno a následně analyzováno více než 60 000 vzorků. Automatizace procesu HLA-SBT umožnila (1) zvýšit kapacitu HLA-SBT vyšetření a tak vyhovět rostoucím požadavkům transplantacních center i registru dárčů, (2) zkrátit dobu do získání výsledku a (3) více standardizovat vlastní proces HLA-SBT

1956.

Zpracování štěpů krvetvorných buněk uzavřeným systémem - zkušenosti z jednoho centra

Dvořáková Zdenka, Kamínková Jitka, Koupilová Milena, Sečkařová Martina, Horálková Lenka, Skoumalová Ivana, Faber Edgar
(*Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc*)

V roce 2008 vstoupil v platnost zákon číslo 296/2008 Sb. O zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka. V souvislosti s tímto zákonem jsme začali v našem centru zpracovávat štěpy určené k transplantaci nově uzavřeným systémem. Tkáňová banka HOK (TB HOK) zpracovává štěpy odebrané naší separační jednotkou, a to pro autologní a allogenní příbuzenské transplantace periferních kmenových buněk (PKB) a dárčevských lymfocytů (DLI). Dále jsou zpracovány štěpy od nepříbuzenských dárčů, jak z českého, tak mezinárodního registru dárčů PKB, DLI a kostní dřevě (KD). K 31.3.2011 bylo tímto způsobem zpracováno 193 štěpů, z toho 174 štěpů PKB, 6 štěpů KD, 13 štěpů DLI. V rámci kontroly kvality těchto štěpů byla provedena kultivace progenitorů a kontrola mikrobiální kontaminace. V loňském roce proběhla úspěšně v celé TB HOK inspekce SÚKLu, na jejímž základě TB obdržela Povolení činnosti tkáňového zařízení. Na OHD 2011 bychom rádi prezentovali postup zpracování štěpů, výsledky kontroly kvality a první zkušenosti se zpracováním z pohledu zdravotní laborantky.

1897.

Mikropipety - kontrola způsobilosti

Hrubá Petra, Špiřířková Ivana, Veselková Jana
(*OKH, FN u sv. Anny, Brno; FN Bohunice, Brno*)

Prezentace popisuje postup údržby mikropipety, výpočet přesnosti, správnosti nejistoty měření typu A, B a standardní rozšířenou nejistotu. Nejčastější pracovní činností laboranta v hematologické laboratoři je odměřování biologického materiálu a roztoků spojených s prací v laboratoři. Mikropipety se používají k napipetování velmi malých objemů – mikrolitrů, které nám umožní po stlačení pístu nabrat a posléze napipetovat mikrolitrové objemy. Jsou velmi přesné a patří mezi nejčastěji používaná měřidla v laboratořích. Při správné manipulaci nedojde k žádnému styku pacientova vzorku s laborantem, tím pádem jsou velmi bezpečné. Mikropipety patří mezi měřidla, a proto se na ně vztahují všechna pravidla o metrologii. Mikropipety jsou pracovní měřidla, která se musí kalibrovat. Tuto kalibraci provádějí příslušné kalibrační laboratoře nebo ČMI. Interval této kalibrace si určí metrolog sám. Všechny pipety musí být testovány: na přesnost CV - sledování náhodné chyby správnost BIAS - sledování systematické chyby. Tato kontrola probíhá v intervalu 1x za šest měsíců. Kontrolu provádí erudovaná laborantka, která je seznámená s postupem a způsobem hodnocení výsledku. V laboratorním provozu může dojít při pipetování ke kolizi např. upuštění mikropipety na zem, proto je nutné otestovat mikropipetu ihned. Kdyby se tomu tak nestalo, je možné, že mikropipeta nebude nabírat požadovaný objem a výsledky vyšetření pacienta by mohly být zkresleny. Pro každou pipetu musí být uvedeno na protokolu: datum testování, výsledky – přesnost, správnost a nejistota měření a podpis pracovníka, který kontrolu provedl. Správný servis pipet snižuje chyby obsluhy a nepřesnosti v pipetování.

SOBOTA 25. ČERVNA 2011

CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE / MYELOPROLIFERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ

2067.

Význam monitorování exprese WT1 a jeho transkripčních variant u pacientů s CML

Lopotová Tereza, Nádvoříčková Sylvie, Klamová Hana, Moravcová Jana
(*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*)

Imatinib, selektivní inhibitor BCR-ABL kinázy, která hraje zásadní roli v patogenezi chronické myeloidní leukemie (CML), je velmi účinný v léčbě CML. Přesto existuje 20 až 30% pacientů s rezistencí k imatinibu. Rezistence může být způsobena mutacemi v kinázové doméně BCR-ABL, další mechanismy jsou zatím neznámé. Ukazuje se ale, že v řadě případů mohou být nezávislé na BCR-ABL, jejíž roli přejímají další kinázy. V těchto případech monitorování transkriptu BCR-ABL neodráží dobře stav pacientů a nemůže predikovat relaps jasně a včas. Nalezení dalšího markeru by umožnilo zlepšení monitorování pacientů s CML. Naším cílem bylo pro ty-

to účely otestovat expresi genu Wilmsova tumoru (WT1) a jeho čtyř hlavních sestřihových variant vznikajících sestřihem exonu 5 a KTS sekvence (-5/-KTS, -5/+KTS, +5/-KTS, +5/+KTS). Expresi WT1 jsme sledovali pomocí real-time RT-PCR dle Cilloni et al., 2004, pro expresi sestřihových variant WT1 jsme použili vlastní real-time PCR vyvinuté v naší laboratoři (odesláno k publikaci). Třicet sedm pacientů bylo sledováno v průběhu léčby. Pacienti byli charakterizováni odpovědí ve 12. měs. léčby: 14% - optimální odpověď (OR), 22% - suboptimální odpověď (SR) a 64% - selhání léčby (TF); 36% pacientů v SR a 70% pacientů v TF hematologicky zrelabovalo. 64% a 30% naopak zůstalo bez relapsu, zde v hematologické remisi, 30 - 80 měsíců léčby (medián 45,5 měsíce). Kinetika exprese WT1 v průběhu onemocnění je významná pro včasnou signalizaci relapsu. Hladina WT1 narůstala v období před hematologickým relapsem u 60% pacientů výrazněji (v mediánu o 1 řád) a u 45% pacientů i časněji (medián 2 měsíce) než BCR-ABL. V porovnání s výsledky analýz mutací v kinázové doméně BCR-ABL WT1 predikuje relaps časněji u zhruba 1/3 pacientů. Další hodnocení ukázalo významnost hladiny WT1 ve 12. měsíci léčby pro predikci hematologického relapsu. 90% pacientů se SR a TF s hladinou vyšší než 0,1 v dalším průběhu léčby hematologicky zrelabovalo. V rámci analýzy sestřihových variant jsme zjistili, že majoritní variantou v CML diagnóze je +5/+KTS. V relapsech se pak obvykle nejvýrazněji prosazuje -5/+KTS, jejíž nárůst v některých případech předchází nárůst celkové WT1. Naše data potvrzují význam monitorování WT1 u pacientů s CML. Celková exprese WT1 umožňuje včasnou predikci relapsu u pacientů s CML. Varianta -5/+KTS je dle našich dat novým kandidátem na časný marker relapsu. Podpořeno MZO MZČR 000230763 (MZOUHKT2005).

2066.

CML: HSP90 – potenciální kandidát na marker sledování progresu u chronické myeloidní leukemie

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

Heat shock protein HSP90 patří mezi chaperony a hraje důležitou úlohu ve stabilitě i funkčnosti mnoha proteinů. HSP90 společně s HSP70 je 2-10 krát více exprimován v nádorových buňkách a mezi jeho klientské molekuly patří mnoho kináz. Mezi ně patří také BCR-ABL kináza, hlavní hybatel chronické myeloidní leukemie (CML). Komplex BCR-ABL/HSP90 stabilizuje BCR-ABL kinázu a snižuje senzitivitu buněk vůči apoptóze (Shiotsu Y. Blood 2000; 96:2284-2291, Wu, L.X. Leukemia 2008; 22:1402-1409). U HSP70 bylo prokázáno, že hraje roli v rezistenci CML k léčbě imatinibem. Další klientskou molekulou obou HSP je Src kináza, která se účastní progresu CML a patří mezi faktory zodpovědné za rezistenci na léčbu. Cílem práce bylo sledovat změny exprese HSP70 a 90 v průběhu CML, při různých odpo-

vědích na léčbu a v různých fázích onemocnění a zjistit možnou roli těchto HSP jako prognostických markerů průběhu onemocnění. Expresi HSP70 i HSP90 jsme sledovali metodou western blot (vztaženo k aktinu) u 48 pacientů s CML léčených imatinibem v různých fázích onemocnění a v různých odpovědích. Zatímco proteinová exprese HSP70 nevykazovala rozdíly mezi jednotlivými fázemi nemoci a odpověďmi na léčbu, u exprese HSP90 jsme zaznamenali výrazné rozdíly. Pacienti v diagnóze a v MMR vykazovali nízkou expresi HSP90 obdobně jako zdraví dárce. Pacienti v relapsu, v akcelerované fázi a v blastické krizi měli velmi silnou expresi tohoto proteinu, stejně jako buněčná linie K562. Hladina HSP90 ve většině sledovaných případů dobře korelovala s hladinou transkriptu BCR-ABL. Rozdíl jsme našli pouze ve stadiu diagnózy, kde hladina BCR-ABL byla vysoká, zatímco hladina HSP90 nízká. To naznačuje patrně rozdílnou stabilizaci proteinu BCR-ABL proteinem HSP90 v diagnóze a pokročilých stádiích CML. Dále jsme hodnotili souvislost poměru exprese HSP90 a HSP70 s dalším vývojem odpovědi pacienta na léčbu. Jako hodnotící kritérium bylo stanoveno zhoršení stavu – relaps v průběhu 10 měsíců od analýzy HSP90. Ve skupině relabujících pacientů (9) byl ve všech analyzovaných vzorcích zjištěn poměr HSP90/70 $\geq 0,4$. Ve druhé skupině – nerelabujících pacientů mělo 15 ze 17 pacientů poměr $< 0,4$. To znamená, že poměr HSP90/70 rovnající se hodnotě 0,4 může být dělicím faktorem mezi pacienty s dobrou a špatnou prognózou. Prognostický význam exprese HSP90 a poměru HSP90/70 pro průběh CML bude prokázán analýzami na větším počtu pacientů. Podpořeno MZO MZČR 000230763 (MZOUHKT2005)

2057.

Morfologický obraz primárnej myelofibrózy v kostnej dreni v čase diagnostiky ochorenia

Marcinek Juraj, Balhárek Tomáš, Szépe Peter, Plank Lukáš

(Ústav patologickej anatómie a Konzultačné centrum hematopatológie Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice v Martine a Martinské bioptické centrum, s.r.o., Martin – SK)

ÚVOD: Morfológia obraz primárnej myelofibrózy (PMF) v kostnej dreni (KD) je podľa WHO klasifikácie súčasťou tzv. „veľkých diagnostických kritérií“ a preto je bioptické vyšetrenie KD nevyhnutné pre potvrdenie ochorenia. PMF sa vyznačuje v porovnaní s inými myeloproliferatívnymi neopláziami (MPN) podstatne horšou prognózou a jej odlíšenie od iných MPN je na základe klinických kritérií v skorých štádiách problematické až nemožné. Morfológia KD umožňuje odlíšenie PMF od iných MPN, klinicky imitujúcich PMF, ako aj od reaktívnych myeloproliferácií. V práci sme sa zamerali na analýzu morfológie KD pacientov bioptizovaných v čase diagnózy ochorenia. METÓDY: Zo súboru 70 pacientov s klinicky aj biopticky potvrdenou PMF sme vylúčili dlh-

šie sledovaných pacientov (nad 2r). Výsledný súbor tvorilo 43 pacientov (28 mužov, 15 žien, vek 34r až 78r, medián 60r) s celkovým počtom 46 biopsií KD, ktoré sme analyzovali semikvantitatívne so zameraním na morfológické črty KD kľúčové pre MPN. VÝSLEDKY: 14 pacientov bolo diagnostikovaných v prefibrotickom štádiu ochorenia s ľahkou fokálnou (8x) resp. difúznou (6x) retikulínovou myelofibrózou (MF). Vo zvyšných vzorkách sme zaznamenali stredne ťažkú (21x) až ťažkú MF (11x). Dominoval obraz hypercelulárnej KD s proliferáciou bieleného radu a megakaryocytov (mgk), len v prípadoch s rozvinutou MF sme zaznamenali pokles celularity KD (3x). Tesné zhluky mgk, typické pre PMF boli prítomné vo väčšine vzoriek, avšak 15x (8x v prefibrotickom štádiu) absentovali. Dysplázie mgk boli vo všetkých vzorkách, aj keď v 6 prípadoch predstavovali len malú časť z celkovej populácie mgk. „Obláčikovitá jadrá“ mgk typické pre PMF sa vyskytli v rôznej miere v 35 vzorkách a 11x absentovali. Mgk s morfológiou typickou pre esenciálnu trombocytémiu sme pozorovali v 25 vzorkách, pričom väčšinou tvorili len malú časť mgk ($\leq 20\%$). ZÁVER: Morfológický obraz PMF v KD v čase diagnózy je značne variabilný, pričom väčšia časť pacientov je diagnostikovaná až v rozvinutom, fibrotickom štádiu ochorenia, kedy je diagnostika PMF jednoduchšia. Aj keď vo väčšine prípadov dominuje hypercelulárna KD s proliferáciou prevažne dysplastických mgk tvoriacich tesné zhluky s prímiesou „obláčikovitých jadier“ mgk, v časti prípadov môžu byť tieto charakteristické črty len slabšie vyznačené, alebo úplne absentovať. Práca podporená Grantom VEGA č.1/0341/10 a Centrom excelentnosti CEPV I (ITMS kód 26220120016), CEPVII (ITMS kód 26220120036) a RKM (ITMS kód 26220220113).

1899.

Efektivita a tolerancia anagrelidu a jeho vplyv na laboratórne parametre u pacientov s esenciálnou trombocytémiou v dlhodobom sledovaní – výsledky z celoslovenského registra

Hrubíško Mikuláš, Tóthová Elena

(Klinika hematológie a transfúziológie UNB, Nemocnica sv. Cyrila & Metoda, Bratislava -SK; Klinika hematológie a onkohematológie UN L. Pasteura, Košice - SK)

Anagrelid (ANA) je na Slovensku liekom prvej voľby v terapii esenciálnej trombocytémie (ET). Liečba je trvalá, preto vznikol celoslovenský register na monitoring klinického stavu pacientov, ktorí užívajú ANA. Cieľ: Vyhodnotenie efektivity, tolerancie a nežiaducich účinkov ANA. Pacienti a metódy: Súbor tvorí 349 pacientov s ET, 205 žien a 144 mužov vo veku 54 rokov (rozsah 18-88) liečených na hematologických pracoviskách z celého Slovenska. Pacienti boli liečení ANA od 9 do 60 mesiacov, v 3-4 mesačných intervaloch sa sledoval ich klinický stav, nežiaduce účinky lieku, komplikácie základného ochorenia a základné hematologické a biochemické parametre. Výsledky: Vyhodnocujeme pacientov na základe úda-

jov v registri za obdobie sledovania 6 – 39 mesiacov. Medián počtu trombocytov na začiatku liečby bol vyšší u nepredliečených chorých ($858 \times 10^9/l$) ako u pacientov, ktorí už nejakú inú cytoredukčnú liečbu užívali ($661 \times 10^9/l$). Normalizáciu počtu trombocytov sa podarilo dosiahnuť po prvých 6 mesiacoch liečby u polovice chorých, postupne až u 63%. Približne štvrtina pacientov mala hodnoty trombocytov v rozsahu $450-600 \times 10^9/l$, čiže spolu 80 resp. 87% pacientov malo hladiny trombocytov $< 600 \times 10^9/l$ po 6 resp. 39 mesiacoch liečby. Len u 13% chorých sa nepodarilo znížiť hodnoty trombocytov pod $600 \times 10^9/l$ ani po 39 mesiacoch liečby. Počet leukocytov sa v priebehu liečby nemenil a významnejšie zmeny sme nepozorovali ani pri hladine hemoglobínu. Ďalej sme sledovali parametre kreatinínu, ALT a AST. Hladiny sa v priebehu liečby významne nemenili. Pokiaľ mala časť pacientov ľahko zvýšené hladiny kreatinínu, išlo o chorých, u ktorých bol tento parameter zvýšený už pred liečbou. Nežiaduce účinky udávalo 51, t.j. 14,6%. Boli však väčšou prechodného charakteru a v priebehu liečby mali tendenciu ustupovať alebo zmierňovať sa. 37 chorých udávalo len jeden príznak, 9 pacientov 2 príznaky a len piati mali ≥ 3 nežiaduce účinky. Monitorovali sme aj trombotické a krvácajúce komplikácie pred liečbou i počas nej. Zaznamenali sme pokles počtu závažných komplikácií z 58 na 5, menej závažných zo 44 na 14 ako aj krvácajúcich príhod z 18 na 5. Len 11% pacientov ukončilo liečbu – pre nežiaduce účinky, neúčinnosť resp. exitus. Ten sme v súbore zaznamenali v 10 prípadoch. Príčinou boli trombotické a kardiologické komplikácie, progresia do primárnej myelofibrózy, epilepsia, karcinóm žalúdka a iné. Záver: Anagrelid je účinný a dobre tolerovaný liek u chorých s esenciálnou trombocytémiou.

1970.

Bezpečnosť a účinnosť liečby interferónom alfa u pacientov s diagnózou Ph negatívnej myeloproliferatívnej neoplázie

Hatalová Antónia, Pavlíková Daniela, Štefaníková Zdena, Skráková Marcela, Mistrík Martin

(Klinika hematológie a transfúziológie LF UK, SZU a UN, Bratislava – SK)

Úvod: Liečba interferónom alfa (Roferon A, Intron A) má svoje nezastupiteľné miesto v terapii myeloproliferatívnej neoplázie (MPN) Ph negat. V Slovenskej republike je jeho použitie v 3 neregistrovaných hematologických indikáciách: 1. MPN (esenciálna trombocytémia - ET, polycytémia vera - PV, primárna myelofibróza - PMF) u žien vo fertílno-m veku a v priebehu gravidity. 2. MPN s trombocytémiou u mladších jedincov pri kontraindikáciách, intolerancii alebo neúčinnosti nových liečiv pre MPN. 3. dlhodobá nastavení pacienti v liečbe interferónom s dg. MPN. Výsledky: V práci prezentujeme súbor 20 pacientov liečených interferónom alfa (11 žien, 9 mužov) s mediánom veku 52,5 (29 – 76). 12/20 pacientov s diagnózou PV, 5/20 dg. ET, 3/20 dg. PMF. 6/20 boli pred-

liečení (hydroxyurea a anagrelid). Somatická mutácia V617F v JAK 2 géne bola pozitívna u 13/20 pacientov. Medián doby od stanovenia diagnózy a začatia liečby interferónom 11 m (2 – 105 m). Medián dĺžky sledovania liečby INF 35 m (1 – 144 m). Medián priemernej týždenej dávky INF 9 MU (6 – 15). Kompletnú hematologickú remisiu dosiahlo 80% pacientov. Neúčinnosť liečby sme konštatovali u jednej pacientky s dg PV. Pri monitorácii molekulárnej odpovede sme u 2 pac. po dlhodobej aplikácii INF zachytili kompletnú molekulovú odpoveď (JAK 2 negativita). Nežiaduce účinky liečby sme zaznamenali u 6/20 pacientov. Hematologická toxicita bola zastúpená trombocytopéniou ľahkého až stredne ťažk.st. (Gr I - II). Etiologickú súvislosť s liečbou INF sme nevylúčili po diagnostikovaní cirhózy pečene na podklade autoimunitnej hepatitídy a difúznej lymfoidnej (autoimunitnej) tyreoiditídy (DLT). U žiadneho pacienta nedošlo v priebehu liečby k tromboembolickej alebo hemoragickej komplikácii, ani transformácii do akútnej hemoblastózy. Gravidita 29 ročnej pacientky s dg MPN ET bola liečbou INF úspešne monitorovaná. Záver: Interferón alfa je dobrou a terapeuticky úspešnou alternatívou chemoterapeutických postupov v liečbe myeloproliferatívnych neoplázií. Okrem navodenia kompletnej hematologickej remisie je s dlhodobou liečbou INF spojená aj možná molekulárna odpoveď pri pozitívnom JAK 2 stave. INF alfa je nelekemogénny liek. Riziká nežiadúcich účinkov sa v správnej klinickej praxi dajú predpokladať a monitorovať. Liečba INF je bezpečnou liečebnou alternatívou.

CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE

1914.

Molekulárni odezva na intenzifikaci léčby 6 pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) nesoucích stejný typ BCR-ABL mutace M244V

Machová Poláková Kateřina, Broučková Adéla, Nádvoříčková Sylvie, Polívková Václava, Zemanová Karla, Vlčanová Kateřina, Trněný Marek, Klamová Hana
(Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha)

Mutace v kinázové doměně BCR-ABL mnohdy nemá přímou souvislost s rezistencí k imatinibu (IM) a i míra jejich rezistence je mezi pacienty s CML variabilní. Cílem této práce bylo vyhodnotit molekulární odpověď po zesílení léčby u 6 pacientů s mutací M244V. IM v 1. linii byli léčeni 3 pacienti (skupina A). Dalším 3 pacientům (skupina B) byla před IM aplikována hydroxyurea a následně podáván interferon-alfa (32-67 měsíců). Hladina BCR-ABL transkriptu byla kvantifikována pomocí real-time qPCR (IS). Množství BCR-ABLM244V bylo po přímém sekvenování hodnoceno pomocí Mutation Surveyor (Softgenetics). Skupina A odpověděla na léčbu IM kompletní cytogenetickou remisí (CCgR) 3-12 měsíců od zahájení 400 mg. Velkou molekulární odpověď (MMR) dosáhl 1 pacient po 3 měsících, avšak hladina BCR-ABL zůstala neměnná po 18 měsících (~ 0.01%). Následně do-

šlo k nárůstu BCR-ABL > 2.5 řádů. Mutace byla detekována v době ztráty MMR. Dávka IM byla zvýšena na 800 mg 3 měsíce od detekce mutace. Došlo k zastavení růstu BCR-ABL a ke ztrátě mutace, ale objevila se mutace nová F359V. Pacient byl převeden na dasatinib (DA) 10 měsíců od nárůstu BCR-ABL a za 4 měsíce odpověděl kompletní molekulární remisí (CMR). U dalších 2 pacientů byl BCR-ABLM244V detekován 10 a 8 měsíců od zahájení IM, avšak pacienti zůstali v CCgR dalších 10 a 19 měsíců. Pacient, který po 10 měsících ztratil CCgR, byl převeden na nilotinib (NIL) a za 6 měsíců odpověděl CMR. U druhého pacienta hladina BCR-ABLM244V fluktuovala mezi 27-89%. Přítomnost obou BCR-ABL klonů, mutovaného a nemutovaného, mohla přispět k částečnému účinku IM a k déle trvající CCgR. Pacient byl po ztrátě CCgR převeden na DA se střídavě snižovanou dávkou. Hladina BCR-ABL se však zvýšila 5x a BCR-ABLM244V klesl o polovinu 6 měsíců od DA. Pacienti skupiny B nikdy nedosáhli CCgR. M244V byla detekována 2, 12 a 70 měsíců od zahájení IM; tj. 37, 48 a 137 měsíců od diagnózy (Dg). U 2 pacientů celkový BCR-ABLM244V (všechn přítomný BCR-ABL byl mutovaný) neklesl pod 10% po zvýšení dávky IM. Na DA byli převedeni 2 pacienti a 1 na NIL. MMR dosáhl 1 pacient 6 měsíců od startu NIL (60 měsíců od Dg) a mutace vymizela. U 2 pacientů došlo k mírnému poklesu BCR-ABL a BCR-ABLM244V 4 měsíce od DA (103 a 142 měsíců od Dg). Naše data naznačují, že typ BCR-ABL mutace jako samostatný parametr nepredikuje míru citlivosti na změnu terapie. Fáze onemocnění, délka léčby a další znaky pacientů ovlivňují odpověď na zesílení léčby. Podpořeno IGA MZČR NT11555 a MZOUHKT2005

2046.

Léčba CML imatinibem v první linii a prognostický význam ELN doporučení v reálné klinické praxi – populační analýza dat 458 nemocných z České republiky a Slovenska

Klamová Hana, Faber Edgar, Žáčková Daniela, Steinerová Kateřina, Karas Michal, Demečková Eva, Voglová Jaroslava, Demitrovičová Ludmila, Tóthová Elena, Chudej Juraj, Markuljak Imrich, Černá Olga, Cmunt Eduard, Jarošová Marie, Machová Poláková Kateřina, Šťastná Marková Markéta, Michalová Kyra, Dušek Ladislav, Mužík Jan, Mistrík Martin, Cetkovský Petr, Mayer Jiří, Trněný Marek, Indrák Karel

(Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha; Hematoonkologická klinika FN a LF UP, Olomouc; Hematoonkologická klinika FN, Brno; Fakultní nemocnice, Plzeň; Klinika hematologie a transfuziologie LFUK, SZU a FNsp, Bratislava – SK; II. interní klinika – OKH FN a LF UK, Hradec Králové; Národní onkologický ústav, Bratislava – SK; Klinika hematologie a onkohematologie UPJŠ a UN L. Pasteura, Košice – SK; Klinika hematologie a transfuziologie LF UK, Martin – SK; Univerzitní nemocnice, Banská Bystrica – SK; Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha; I. interní klinika VFN

a l. LF UK, Praha; Institut biostatistiky a analýz, Masarykova univerzita, Brno)

Úvod: Imatinib (IM) zásadně změnil léčbu nemocných s CML, jak bylo potvrzeno výsledky mezinárodní klinické studie IRIS. Léčebná strategie je v současné době dána doporučeními European LeukemiaNet (ELN), která definují odpověď na léčbu a její prediktivní výpovědní hodnotu. Dat z každodenní klinické praxe však stále není dostatek. Cílem práce bylo provést populační analýzu dat nemocných s CML v CP léčených imatinibem, registrovaných v databázích INFINITY a CAMELIA a zhodnotit prognostický význam ELN definovaných doporučení, zvláště pak významu časné molekulární odpovědi. **Metody:** Hodnoceno celkem 458 nemocných z 13 hematologických pracovišť České republiky a Slovenska zařazených do databází CAMELIA (306) a INFINITY (152 pacientů). Dle platných doporučení ELN, sledován podíl dosažených kompletních hematologických (CHR) a kompletních cytogenetických remisí (CCgR), velké a kompletní molekulární odpovědi (MMoIR, CMoIR), dále pak odhad pravděpodobnosti celkového přežití (OS), přežití bez transformace do pokročilé fáze (TFS), bez progresse definované dle IRIS studie (PFS) a bez události, tzn. i selhání IM dle kritérií ELN a jeho vysazení z důvodu netolerance (EFS). Hodnocen prognostický význam dosažené odpovědi na léčbu, definované jako optimální, suboptimální a selhání léčby dle ELN doporučení, včetně kvality a rychlosti dosažené molekulární odpovědi. **Výsledky:** 458 pacientů hodnoceno (medián 52 let; 17-81) v období let 2003-2009 s mediánem sledování 33,1 měsíců (1,4-82,1). Odhadovaná kumulativní incidence CHR, CCgR, MMoIR a CMoIR v 5ti letech byla 95,6%, 79,2%, 73,4,1% a 54,7% respektive, odhadovaná OS, OSCML, TFS, PFS a EFS v 5ti letech 96,6%, 90,2%, 93,9%, 80,7% a 58,8%. Pacienti s optimální odpovědí na léčbu v 6. a 12. měsíci (parciální CgR v 6. měsíci a CCgR ve 12. měsíci), měli statisticky významně větší pravděpodobnost PFS ($p=0,041$, $p=0,02$) a EFS ($p<0,001$). Dosažení MMoIR ve 3. měsíci predikovalo větší pravděpodobnost PFS ($p=0,039$). Hladina transkriptu BCR-ABL $>10\%$ ve 3. měsíci znamenala menší pravděpodobnost dosažení CCgR a MMoIR v měsících dalších ($p<0,001$). **Závěr:** Na souboru neselektovaných pacientů léčených v reálné klinické praxi jsme potvrdili vysokou účinnost imatinibu u nově diagnostikovaných nemocných s CML v CP. ELN doporučení však měla v námi hodnoceném souboru z reálné klinické praxe výpovědní hodnotu limitovanou. Podpořeno Projekty CELL a CAMELIA

2017.

Výsledky léčby chronické myeloidní leukemie ve FN Hradec Králové v období 1987 – 2010

Voglová Jaroslava, Bělohávková Petra, Mužík Jan (II. interní klinika - OKH, Fakultní nemocnice, Hradec Králové; Institut biostatistiky a analýz, Masarykova univerzita, Brno)

Cíl: Zhodnocení výsledků léčby chronické myeloidní leukemie na OKH FN Hradec Králové se zaměřením na celkové přežití a příčiny úmrtí. **Soubor a metodika:** Soubor nemocných tvořili všichni nemocní s Ph+ CML v evidenci OKH FN Hradec Králové od r. 1987 do 2010. Hodnoceno celkové přežití podle data stanovení diagnózy v obdobích: 1. 1987-1995, 2. 1996-2000, 3. 2001-2005, 4. 2006-2010, dále dle stádia CML a způsobu léčby pomocí Kaplan-Meierovy analýzy. U nemocných léčených imatinibem v 1. a 2. linii srovnávány počty dosažených kompletních cytogenetických remisí a četnost progresí. Ve výše uvedených obdobích sledovány příčiny úmrtí. **Výsledky:** Soubor tvořilo 176 nemocných (ženy 47%, muži 53%) ve věku 17-86 let (medián 52 let). U 163 (93%) nemocných zjištěna CML v chronické fázi, u 9 (5%) v akcelerované fázi a u 4 (2%) v blastickém zvratu. Kompletní cytogenetická odpověď v chronické fázi CML dosažena u 85% pac. léčených inhibitory tyrozinkináz v první linii, u 70% léčených ITK v 2. linii. Medián přežití podle období stanovení diagnózy: sk.1: 66 měs.; 2: 93 měs., 3. a 4: nedosažen. Pětileté přežití pacientů v chronické fázi CML bylo při léčbě ITK v 1. linii 89%, ITK v 2. linii 92%, transplantací krvetvorných buněk 76% a u ostatních způsobů léčby 31%. Počet pacientů ročně léčených na OKH od roku 2000 trvale stoupá, do roku 2010 vzrostl ze 40 na více jak 100. Do roku 2000 nemocní umírali nejčastěji na progresi CML (71%), v posledních 5 letech podíl CML na úmrtnosti výrazně poklesl (32%), pacienti častěji umírali na přidružená onemocnění (64%). **Závěr:** Inhibitory tyrozinkináz významně prodloužily přežití nemocných s CML. Počet nemocných ročně léčených CML od roku 2000 trvale stoupá. Příčinou úmrtí je v současnosti častěji přidružená choroba než progresse CML.

2011.

Účinnost a tolerance dasatinibu v léčbě pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) rezistentních/netolerujících imatinib léčených v podmínkách každodenní klinické praxe

Žáčková Daniela, Klamová Hana, Mužík Jan, Cmunt Eduard, Dobešová Blanka, Ryšavá Jana, Ráčil Zdeněk, Machová Poláková Kateřina, Dvořáková Dana, Jurček Tomáš, Rážga Filip, Moravcová Jana, Doubek Michael, Březinová Jana, Oltová Alexandra, Cetkovský Petr, Trněný Marek, Dušek Ladislav, Mayer Jiří (Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Masarykova univerzita, Brno; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Institut biostatistiky a analýz, Masarykova univerzita, Brno; I. interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice, Praha)

Většina údajů o dasatinibu v léčbě pacientů s CML pochází z klinických studií. Publikovaných dat o jeho účinnosti v kontextu každodenní klinické praxe je stále málo. Cílem naší práce bylo zhodnotit účinnost a toleranci dasatinibu ve 2. linii léčby pacientů s CML rezistentních na imati-

nib nebo ho netolerujících, léčených převážně mimo rámec klinických studií. Analyzovali jsme údaje z databáze INFINITY, zahrnující pacienty s CML z definovaných oblastí ČR léčené ve specializovaných centrech. Menšina pacientů (n=19) byla léčena v rámci klinických studií (CA180-034, CA180-035). Hodnotili jsme kumulativní incidence kompletních hematologických odpovědí (CHR), velkých (MCgR) a kompletních cytogenetických odpovědí (CCgR), velkých molekulárních odpovědí (MMoIR), a sérii analýz přežití: celkové přežití (OS), přežití bez transformace (TFS), bez progresu (PFS), kde progresu byla definována dle studií START (Blood, 2007), bez selhání (FFS), kde byla zahrnuta též ELN navržená kritéria pro selhání léčby 2. linie (Baccarani, J Clin Oncol, 2009), ztráta CCgR a ukončení dasatinibu pro intoleranci, přežití bez absolutního selhání (TFFS), zahrnující všechny důvody ukončení léčby dasatinibem, a přežití bez alternativní léčby (ATFS). Celkem jsme hodnotili 98 pacientů (mediánu věku 57 let, 19-79; 43 mužů a 55 žen); 68% bylo v CP a 32% v AP/BC. Devadesát (91,8%) pacientů bylo předléčeno imatinibem. Dasatinib byl nasazen v mediánu 39 měsíců od stanovení diagnózy CML (1-175) a medián sledování byl 12,9 měsíců (0,2 – 50,8). Důvodem pro jeho nasazení byla v 77% rezistence, ve 14% intolerance a u 9% jiné důvody. Odhadované kumulativní incidence CHR, MCgR, CCgR a MMoIR ve 24 měsících byly 92,1%, 76,2%, 66,7% a 58,5% u pacientů v CP a 51,6%, 30,8%, 17,4% a 9,7% u pacientů v AP/BC. Odhadované OS, TFS, PFS, FFS, TFFS a ATFS ve 24 měsících byly 90,6%, 92,9%, 90,4%, 66,8%, 63,7% a 66,9% pro pacienty v CP a 37,2%, 46,8%, 34,2%, 15,1%, 14,6% a 25,1% pro pacienty v AP/BC. Nehematologická a hematologická toxicita všech stupňů se vyskytla u 63,3% a 85,7% pacientů, s 26,4% a 48,4% případů toxicity stupně 3/4 dle CTCAEv.3. Celkem 44 pacientů ukončilo terapii dasatinibem z různých příčin. Během sledování zemřelo 21 pacientů. Výsledky naší analýzy potvrdily dobrou účinnost a toleranci dasatinibu v léčbě pacientů s CML rovněž v podmínkách každodenní klinické praxe. V pokročilých fázích onemocnění však výsledky stále nejsou uspokojivé. Podpořeno CELL – The Czech Leukemia Study Group for Life.

2045.

Dasatinib – účinná léčba také v nižší než obvyklé dávce u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) rezistentních nebo netolerujících imatinib

Klamová Hana, Štastná Marková Markéta, Zemanová Karla, Moravcová Jana, Březinová Jana, Michalová Kyra, Ryšavá Jana, Cetkovský Petr, Trněný Marek, Machová Poláková Kateřina

(Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha)

Dasatinib (DA), tyrozinkinázový inhibitor (TKI) druhé generace je efektivní léčbou pacientů s CML rezistentních nebo netolerujících imatinib (IM). Doporučenou terapeutickou dávkou 100 mg/den v chronické fázi (CP) a 140 mg/den v pokročilé fázi nemoci (AP, BP) však nelze vždy dodržet. Důvodem jsou závažné nežádoucí účinky (NÚ) podávané-

ho DA, dle CTCAE stupně 3-4, a také projevy přetrvávající toxicity léčby předchozí. Cílem práce bylo zhodnotit, zda je také nižší než obvyklá dávka DA schopná navodit nebo udržet dostatečnou odpověď u nemocných léčených v běžné klinické praxi. 24/49 (48%) pacientům podáván dasatinib v dávce 50 mg/den nebo střídavě 50 mg a 100 mg/den a provedena retrospektivní analýza účinnosti této léčby. Skupina A: 14 pacientů s redukovanou dávkou z důvodu závažných NÚ dasatinibu, kdy redukce provedena v průběhu léčby DA a skupina B: jsou pacienti s přetrvávajícími projevy významné toxicity léčby předchozí, kdy DA podáván v nižší dávce již iniciálně. Redukovaná dávka podávána v mediánu (med.) 6 měsíců (3-24) ve skupině A, s celkovou dobou terapie 40 měsíců (10-60), a v mediánu 10 měsíců (2-18) s trváním léčby 28 měsíců (14-39) ve skupině B. Monitorována hematologická, cytogenetická (CCgR) a molekulární odpověď (MMoIR, CMoIR). Pacienti rezistentní na IM vyšetřeni na přítomnost mutace v kinázové doméně BCR-ABL, která zachycena u 6/15 (40%). Ve skupině A nedošlo ke zhoršení odpovědi cytogenetické ani molekulární u 82% (9/11) pacientů (p.), 90% (10/11) přežívá (OS) v med. 40 měsíců (10-60) a 82% (9/11) bez projevů progresu (PFS). U 5 pacientů iniciálně záchyt 5 typů mutací. 3 z nich vymizely v průběhu léčby, u 1 došlo ke snížení hladiny mutovaného klonu ze 100% na 23%. Dva pacienti s mutací F311I a Y253H progredovali do AP. Jedna nemocná přerušila léčbu DA na 10 měsíců z důvodu těhotenství. Po opětovném nasazení DA znovu docílila CCgR a MMoIR. Skupina B: CCgR dosaženo u 80% (8/10) a MMoIR u 50% (5/10) pacientů po 4 až 12 měsících léčby. Tři pacienti (30%) dosáhli CMoIR, další 2 dosud CCgR nedocílili. U 1 pacienta ještě před léčbou DA nalezena mutace E459V, která vymizela po 9 měsících. Žádné další mutace nebyly v této skupině nalezeny. Všichni pacienti žijí bez známek progresu, s dobrou kvalitou života. Naše výsledky z běžné klinické praxe ukazují na terapeutickou účinnost také nižší než obvyklé dávky dasatinibu jak ve smyslu dosažení, tak také zachování dosažené léčebné odpovědi. Podpořeno: MZOUH-KT2005 a IGA MZČR NT11555.

CHRONICKÁ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE

1987.

Analýza biklonálních/bifenotypických případů chronické lymfocytární leukemie

Plevová Karla, Skuhrová Francová Hana, Tichý Boris, Burčková Kateřina, Malčíková Jitka, Pavlová Šárka, Brychtová Yvona, Doubek Michael, Mayer Jiří, Pospíšilová Šárka

(Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice, CEITEC, Masarykova univerzita, Brno)

Většina případů chronické lymfocytární leukemie představuje monoklonální lymfoproliferaci. Nádorové buňky jednotlivých pacientů jsou charakterizovány unikátní pře-

stavbou imunoglobulinových (Ig) genů exprimovaných na povrchu buněk jako BCR receptor. Výjimečně mohou být při vyšetření mutačního statusu IGHV detekovány vícečetné produktivní přestavby Ig. Ty mohou indikovat přítomnost více maligních klonů CLL, diverzifikaci původní nádorové populace na nový subklon s odlišnou receptorovou specifitou nebo poruchu alelické exkluze, která má za následek expresi dvojího typu BCR receptorů na jednotlivých buňkách. CÍL: Podrobně jsme analyzovali případy CLL, u kterých byly při vyšetření mutačního statusu IGHV zjištěny dvě/tři přestavby Ig. Detailně jsme sledovali klonální evoluci onemocnění u vybraných pacientů. METODY: Mutační status IGHV byl vyšetřen z cDNA dle doporučení mezinárodní iniciativy ERIC. K potvrzení přestavb těžkých řetězců Ig (IGH) na úrovni DNA byl použit protokol BIOMED-2. Byly vyšetřeny přestavby lehkých řetězců Ig (IGL). Pomocí flow-cytometrie byl stanoven imunofenotyp CD19+ buněk (IgLambda, IgKappa, CD20, CD23, CD43, FMC7). VÝSLEDKY: Dvě/tři produktivní přestavby IGH byly stanoveny u 35 pacientů z 1040 (3,4 %). U 18 byly zároveň detekovány dvě produktivní přestavby IGL. V 9 případech jsme pozorovali změny v zastoupení jednotlivých IGH přestavb v průběhu nemoci. U tří z nich byla selekce dalšího maligního klonu doprovázena de novo mutací TP53. Detailně jsme analyzovali nádorové populace u 12 pacientů. Na úrovni DNA byly potvrzeny všechny přestavby IGH zjištěné během rutinní diagnostiky a detekovány další neproduktivní přestavby v IGH i IGL. U 5 pacientů byly potvrzeny dvě imunofenotypicky odlišné CLL populace, které se lišily především expresí povrchových Ig Kappa a Lambda. U dalšího pacienta jsme biklonální CLL předpokládali dle exprese dvou IGL Lambda (PCR analýza). Pomocí bioinformatických analýz jsme u všech pacientů vyloučili editaci BCR receptoru. SHRNUŤI: Biklonální CLL se vyskytuje velmi vzácně a představuje nejméně polovinu případů s vícenásobnými funkčními IGH přestavbami. Z 12 podrobně studovaných jsme biklonální CLL potvrdili u 6 pacientů (50%). V průběhu nemoci se může měnit zastoupení jednotlivých populací. Opakované stanovení přestavb IGH může odhalit selekci nového maligního klonu a včas upozornit na zhoršení průběhu choroby. Podpořeno granty IGA NS10439-3/2009, IGA NS9858-3/2008, MSM0021622430, GAČR 204/09/H058 a MPO FR-TI2/254

2044.

Infúzní toxicita rituximabu v léčbě 1. line u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií

Šimkovič Martin, Motyčková Monika

(II. interní klinika, oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové)

Úvod: Kombinace rituximabu s chemoterapií je účinná v léčbě chronické lymfocytární leukémie (CLL). Hlavním nežádoucím účinkem rituximabu jsou infúzní reakce, např. syndrom uvolnění cytokinů (cytokine-release

syndrom – CRS), který zpravidla doprovází první podání rituximabu. Cílem naší retrospektivní analýzy bylo zhodnotit četnost výskytu infúzních reakcí, jejich vztah k parametrům nádorové nálože a posoudit možnou spojitost infúzních reakcí s účinností léčby. Charakteristika souboru: chemoimunoterapie (FCR, n=36, nízkodávkový FCR, n=13, jiný režim s rituximabem, n=5) byla podána v rámci 1. linie léčby v období od března 2005 do března 2011 54 nemocným s CLL. Jednalo se o 35 mužů a 19 žen s mediánem věku 61 let (rozmezí 32-83). Vysoké riziko dle Raie bylo přítomno u 26 nemocných. IgVH geny byly nemutované u 28 ze 40 (70 %), izolovaná delece 13q u 9 (27 %), delece 17p u 1 (3 %) a delece 11q u 12 (35 %) nemocných. Součástí premedikace před infúzí rituximabu byl metylprednisolon 80 mg i.v., paracetamol 1000 mg p.o. a bisulepin 1 mg i.v., všichni nemocní měli nitrožilní hydrataci min. 2000 ml/den a allopurinol 300-600 mg denně. V prvním cyklu byl rituximab podáván frakcionovaně v dávce 375 mg/m², od druhého cyklu v dávce 500 mg/m². Výsledky: K rozvoji infúzní reakce po rituximabu došlo u 18 (33 %) pacientů a jednalo se převážně o toxicitu stupně II dle CTCAE (stupeň I/II/III/IV u 1/15/2/0 nemocných). Reakce se nejčastěji projevila třesavkou, zimnicí, dušností, febrilií či hypotenzí. U všech nemocných bylo možno infúzi rituximabu v plánované dávce dokončit. Hodnocení léčebné odpovědi bylo k dispozici u 41 pacientů a nebyl zaznamenán rozdíl v celkové léčebné odpovědi (86 vs. 89 %) mezi pacienty s infúzní reakcí na rituximab a bez ní. Stejně tak nebyl nalezen významný rozdíl ve vstupní lymfocytóze (87 vs. 56 x 10log⁹/l, p=0,21) a rozsahu lymfadenopatie. Při mediánu sledování souboru 16 měsíců nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v PFS a OS mezi oběma skupinami. Závěr: Výskyt infúzních reakcí u nemocných s CLL léčených rituximabem je poměrně běžný (33 %), avšak při pečlivé premedikaci je velmi dobře zvladatelný a těžká forma je vzácná. Naše data neprokázala statisticky významnou souvislost mezi výskytem infúzních reakcí a efektem léčby. Podpořeno výzkumným záměrem MZO 00179906 MZ ČR.

1934.

Nízkodávkový fludarabin a cyklofosfamid v kombinaci s rituximabem u starších a komorbidních nemocných s chronickou lymfocytární leukémií/lymfomem z malých lymfocytů: aktualizované výsledky projektu Q-lite České CLL skupiny

Smolej Lukáš, Brychtová Yvona, Špaček Martin, Doubek Michael, Belada David, Motyčková Monika, Cmunt Eduard, Procházka Vít, Rohoň Peter, Poul Hynek, Klásková Kateřina, Kozák Tomáš

(II. interní klinika, oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové; Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice, Brno; Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha; I. interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice, Praha; Hemato-onkologická

klinika, Fakultní nemocnice, Olomouc; Hematologické a transfúzní oddělení, nemocnice, Pelhřimov)

Úvod: Kombinace fludarabinu, cyklofosfamidu a rituximabu (FCR) je v současnosti považována za léčbu volby u fyzicky zdatných nemocných s chronickou lymfocytární leukémií (CLL), nicméně řada nemocných tímto protokolem nemůže být léčena z důvodu vysokého věku a/nebo závažných přidružených onemocnění. Pro tyto nemocné zůstává v současnosti chlorambucil lékem volby. Nízkodávkované fludarabinové režimy prokázaly v posledních letech v pilotních studiích slibné výsledky. Cíle: Posoudit účinnost a toxicitu nízkodávkovaného režimu FCR u starších/komorbidních nemocných s CLL. Nemocní a metodiky: Od března 2009 do prosince 2010 jsme léčili 93 nemocných s aktivní chorobou vyžadující léčbu (CLL, n=88, SLL, n=5, muži 59%, medián věku 70 let [rozmezí 58-83], medián Cumulative Illness Rating Score 4 [0-10]) nízkodávkovaným FCR ve 14 centrech spolupracujících v rámci České CLL skupiny. Snížení dávek chemoterapie bylo následující: fludarabine na 50% (12 mg/m² i.v. nebo 20 mg/m² p.o. den 1-3), cyklofosfamid na 60% (150mg/m² i.v./p.o. den 1-3). Dávka rituximabu byla standardní (375mg/m² v 1. cyklu, 500mg/m² od 2. cyklu). Léčba byla opakována po 4 týdnech. Byla doporučena protiinfekční profylaxe sulfametoxazolem/trimetoprimem a aciklovirem či ekvivalenty. Padesát šest procent nemocných bylo léčeno v 1. linii, 44% v relapsu. Pokročilá klinická stádia (Rai III/IV) byla přítomna u 62% nemocných; 40% mělo masivní lymfadenopatii. IgVH geny byly nemutované u 74%; del 11q bylo přítomno u 32% a del 17p u 5%. Výsledky: Při analýze „intention-to-treat“ byla celková léčebná odpověď/kompletní remise (ORR/CR, včetně klinické CR a CR s nekompletní regenerací) 71/39% v 1.linii a 63/27% u relapsu; 18% nemocných je dosud na léčbě. Data týkající se kvality života, PFS a OS dosud nejsou k dispozici. Závažná (III./IV. stupeň dle CTCAE) neutropenie se vyskytla v 54%, trombocytopenie v 13% a anémie u 11% nemocných. Závažné infekce se objevily u 13% nemocných. Závěr: Léčba starších/komorbidních nemocných s CLL/SLL nízkodávkovaným protokolem FCR vykazuje slibnou účinnost s přijatelnou a zvladatelnou toxicitou.

Léčebná odpověď	1. linie (%)	Relaps (%)
Celková odpověď	75	63
Kompletní remise (včetně cCR, cRI)	39	27
Částečná odpověď	36	36
Stabilní onemocnění	8	12
Progrese	12	5
Nehodnotitelné	6	20

1989.

Současné trendy v molekulárně-biologické analýze genu TP53 u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií a příklady aplikace v praxi

Kantorová Barbara, Malčíková Jitka, Lochmanová Jana, Šmardová Jana, Trbušek Martin, Pavlová Šárka, Šebejová Ludmila, Doubek Martin, Mayer Jiří, Pospíšilová Šárka
(*Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika FN Brno a LF MU, Brno*)

Klinický obraz chronické lymfocytární leukémie (CLL) je důvodem neustálého hledání specifických markerů, umožňujících zpřesnění prognózy tohoto heterogenního onemocnění. Mezi významné cytogenetické aberace podílející se na predikci průběhu CLL, délky přežívání a odpovědi pacientů na léčbu patří delece lokusu 17p13.1, zahrnující gen TP53. V průběhu vývoje leukemického klonu dochází často na zbývající genové alele k selekci mutací a následně k narušení fyziologické funkce proteinu p53. Recentní práce u CLL prokázaly, že část pacientů může přenášet také monoalelické mutace genu TP53, které jsou rovněž spojeny s nepříznivou prognózou. Detekce uvedených změn tedy vyžaduje velmi citlivou a specifickou metodologii, umožňující přesnou analýzu obou alel genu TP53. Moderní přístupy molekulární biologie na bázi čipových technologií jsou vysoce automatizovaným a senzitivním prostředkem mutační analýzy. Na našem pracovišti jsou pro vyšetření změn genu TP53 využívány resequenční mikročipy - CLL custom resequencing microarray (Affymetrix) a Roche AmpliChip p53 Test (Roche Molecular Systems). Přes své nesporné výhody ovšem podobně jako sekvenční přístupy vyžadují velmi nákladné laboratorní vybavení. V rutinní praxi jsou proto nadále pro vyšetření genu TP53 upřednostňovány spíše prescreeningové metodiky, jako např. HrMCA (analýza křivek tání s vysokým rozlišením), DGGE (denaturační gradientová gelová elektroforéza) nebo v našem případě DHPLC (denaturační vysokotlaká kapalinová chromatografie). Z výsledků mezinárodní spolupráce a dat získaných na našem pracovišti je patrné, že pro mutační analýzu genu TP53 u pacientů s CLL je nezbytná kombinace více přístupů. Pro přesnou charakterizaci biologického důsledku detekovaných sekvenčních změn je vhodné vyšetření genu TP53 doplnit také funkční analýzou, popřípadě stanovením jeho proteinové hladiny. Práce byla podpořena granty IGA MZČR NS10439-3/2009, NR9858-3/2009, MSMT MSM0021622430, GAČR P301/10/0590, MPO FR-T/2/254.

2040.

Léčba pacientů s B-chronickou lymfatickou leukémií alemtuzumabem na HOK FNOL 2005-2010

Turcsányi Peter, Procházka Vít, Urbanová Renata, Papajík Tomáš
(*HOK FN, Olomouc*)

Úvod: Terapeutické možnosti u B - Chronické lymfatické leukémie (B-CLL) se stále rozšiřují, navzdory to-

mu je onemocnění nevléčitelné není-li léčeno transplantací kostní dřeně. Jednou z léčebných modalit v relapsu onemocnění je podávání alemtuzumabu (anti CD 52 protilátky). Cíl: Retrospektivně analyzovat léčebné výsledky neselektovaného souboru nemocných s B-CLL. Soubor: V letech 2005-2010 bylo na HOK FNOL léčeno alemtuzumabem 29 pacientů. Medián věku při diagnóze dosáhl 54 (30-74) let, medián věku při aplikaci alemtuzumabu dosáhl 59 let, soubor tvořilo 24 mužů a 5 žen. Stadia nemoci dle Bineta v době diagnózy byly A 22% B 48% C 30%. Delece 17p byla přítomna u 8 z 24 (33,3%) vyšetřených pacientů. Nemutovaný IgVH byl u 21 z 23 vyšetřených pacientů. 17 z 29 (59%) pacientům byla podána léčba alemtuzumabem za účelem navození remise a u 12 z 29 (41%) za účelem prodloužení remise po předchozí chemoterapii. Alemtuzumab byl podán v průměru 60,5 (3-252) měsíců od stanovení diagnózy, v průměru jako 3 (2-6) linie léčby. Průměrná kumulativní dávka léku dosáhla 313 mg (33-1033 mg). K laboratorní reaktivaci CMV infekce došlo u 11 z 26 (42 %) vyšetřených pacientů a u 3 pacientů došlo ke klinické manifestaci CMV infekce. U 3 z 26 pacientů došlo k závažné infekční komplikaci (grade

4 dle NCI-CTC). Žádný ze sledovaných pacientů v souvislosti s infekční komplikací nezemřel. V průběhu terapie byla pozorována neutropenie pod $1 \cdot 10^9/l$ u 13 z 26 (50%) sledovaných pacientů a neutropenie pod $0,5 \cdot 10^9/l$ u 6 z 26 (23%) pacientů. Medián celkového přežití (OS) dosáhl 103,3 měsíců (95% CI 86,4-126). OS od zahájení první linie léčby B-CLL dosáhl v mediánu 73,6 měsíců. OS od zahájení terapie alemtuzumabem dosáhlo v mediánu 22,7 měsíců. Závěr: Populace studovaných nemocných byla výrazně předléčena (alemtuzumab aplikován nejčastěji jako 3. linie léčby), alemtuzumab byl aplikován v pozdních fázích nemoci u chemorezistentních pacientů, nebo jako konsolidace v poindukční terapii u rizikových nemocných. Terapie byla ukončována pro myelotoxicitu a infekční komplikace – díky tomuto přístupu nedošlo k úmrtí v souvislosti s léčbou. Optimální načasování aplikace alemtuzumabu je stále nejasné. Přístup k nemocnému by měl reflektovat jeho léčebné cíle, toleranci infekčních komplikací a kvalitu života. Cílem aplikace je dosažení co nejlepší a nejdelší léčebné odpovědi za cenu co nejmenší hematologické toxicity a infekčních komplikací. Podpořeno: LF-2011-006, MSM 6198959205.

AKUTNÍ LEUKEMIE

P1 / 2029.

Cytogenetika a molekulární cytogenetika T-ALL

Holzerová Milena, Urbánková Helena, Balcárková J., Chytilíková R., Mičková P., Prekopová I., Kropáčková J., Hanzlíková J., Sztokowski T., Hubáček J., Pikalová Z., Indrák K., Jarošová M.

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

T-buněčná akutní lymfoblastická leukemie (T-ALL) je maligní onemocnění vycházející z T-buněčné řady a představuje 10-15% dětských a 25 % dospělých případů nově diagnostikovaných ALL. I přes značné pokroky v poznání molekulární podstaty T-ALL, mechanismus, který vede k abnormální proliferaci a přežívání T lymfocytů, zůstává stále neznámý. Konvenční cytogenetickou analýzou (G-pruhování) jsou chromosomové změny pozorovány u přibližně 50-60 % nemocných, detailnější molekulárně cytogenetickou analýzou jsou změny v nádorovém genomu nemocných s T-ALL odhaleny až v 80 % případů. Nejčastější prokázanou chromosomovou změnou jsou přestavby T-buněčných receptorů (TCRB a TCRG s lokalizací na chromosomu 7, TCRA a TCRD na chromosomu 14), detekované přibližně u 30-35 % případů T-ALL, dále pak kryptické delece oblastí s lokalizací genů s potencionálně tumor supresorovou aktivitou CDKN2A (INK4A) (9p21) a TAL1 (1p32). Klinický význam některých nově nalezených změn je ještě stále studován, předpokládá se však, že mnohé z těchto kryptických změn jsou spojeny s agresivní formou onemocnění a horší odpovědí na léčbu. Cílem naší práce bylo provést retrospektivní analýzu souboru 16 nemocných s T-ALL, kteří byli vyšetřeni na Hemato-onkologické klinice FN Olomouc v letech 1996 – 2010. K určení chromosomových aberací byli všichni nemocní vyšetřeni metodami klasické cytogenetiky – G pruhováním, k odhalení kryptických přestaveb byly použity molekulárně cytogenetické metody – fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Zaměřili jsme se především na odhalení změn diagnostického a prognostického významu - přestavby T-buněčných receptorů, TLX1, TLX3 genů a detekci kryptických delecí 9p21, 6q21, 6q23 a TAL1. Konvenční cytogenetikou byly detekovány chromosomové přestavby u 9 (54 %) z 16 nemocných, detailní molekulárně cytogenetická analýza však odhalila kryptické aberace u 15 (94 %) nemocných. Nejčastější prokázanou změnou byla delece 9p21 u 10 nemocných (62,5 %), u 5 z nich se jednalo o bialelickou delecii. U 4 nemocných byly prokázány aberace TLX1 – u 3 nemocných byla prokázána t(10;14), u jednoho delece TLX1. U dalších dvou nemocných byla prokázána t(5;14) s přestavbou TLX3/BCL11b. V práci budeme prezentovat výsledky studie, zajímavé nálezy a jejich klinický význam. Práce je podporována grantem MSM 6198959205 a Studentským projektem LF University Palackého 2011-006.

P2 / 1992.

Studium metylačního profilu genů zapojených do regulace T-buněčné odpovědi pomocí DNA metylačních arrayů u pacientů s AML a MDS

Hájková Hana, Petrboková Radka, Jonášová Anna, Nováková Ludmila, Čermák Jaroslav, Šálek Cyril, Schwarz Jiří, Haškovec Cedrik

(Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha; VFN a 1. LF UK, Praha)

Selhání imunitního dozoru hraje roli při vzniku a rozvoji nádorových onemocnění. Aberantní metylace DNA jako mechanismus inaktivace genů kontrolujících buněčný cyklus může hrát roli při umlčení genů zapojených do kontrolních a rozpoznávacích mechanismů imunitního systému. Z těchto důvodů je zajímavé zkoumat metylační status těchto genů u nádorových onemocnění včetně těch leukemických, jako je akutní myeloidní leukemie (AML) a její preleukemická forma myelodysplastický syndrom (MDS). Pro tyto účely jsme analyzovali panel 24 genů podílejících se na regulaci T-buněčné odpovědi. Vyšetřili jsme mononukleární buňky (MNC) z periferní krve či kostní dřeně u 10 pacientů s AML při diagnóze, u 8 pacientů v různých stádiích MDS a u 4 zdravých dárců. Metylační analýza spočívala ve štěpení cílové sekvence různými restrikcčními endonukleázami (metylačně senzitivními a/či dependentními) a v následné real-time PCR detekci. Metylace byla u vybraných vzorků ověřována pomocí bisulfitového sekvenování. Stanovení genové exprese bylo provedeno pomocí real-time PCR s TaqMan sondou a primery. Aberantní DNA metylaci jsme zjistili u 7/24 studovaných genů u AML a u 6/24 u MDS. Frekvence metylací jednotlivých genů u AML byla následující: CD8a (9/10), SOCS1 (7/10), FOXP3 (6/10), LAG3 (5/10), PAX1 (4/10), RIPK2 (2/10) a MICB (1/10). Frekvence metylací jednotlivých genů u MDS byla tato: MICB (4/8), PAX1 (3/8), LAG3 (3/8), SOCS1 (3/8), CD8a (3/8) a FOXP3 (1/8). Následně jsme tyto výsledky u vybraných genů ověřili metodou bisulfitového sekvenování a porovnali získané výsledky metylace promotorových oblastí genů s hladinou jejich exprese. U genů LAG3 a PAX1 jsme měřili míru exprese u 19 pacientů s AML při diagnóze a u 11 zdravých dárců. Exprese genu LAG3 byla u pacientů s AML významně downregulována (p=0,003) v souladu se zvýšenou metylací DNA. Pro gen PAX1 jsme expresi analyzovali u stejného počtu vzorků, ale ani ve vzorcích pacientů ani u zdravých dárců jsme žádnou měřitelnou míru exprese nedetekovali. Potvrdili jsme výskyt aberantní metylace DNA u genů zapojených do regulace T-buněčné odpovědi, která by mohla přispívat ke vzniku a progresi leukemického onemocnění. Tyto výsledky v současné době rozšiřujeme, abychom mohli provést jejich klinickou korelaci. Podpora granty OC10042 a IHBT00023736.

P3 / 1984.**Monitorování minimální reziduální nemoci pomocí mutovaného genu NPM1 stanoveného z mRNA a genomové DNA a jeho srovnání s expresí genu WT1 u pacientů s AML**

Petrboková Radka, Hájková Hana, Fuchs Ota, Polák Jaroslav, Šálek Cyril, Dvořáková Dana, Haškovec Cedrik (*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Fakultní nemocnice, Brno*)

Lidský gen pro nukleofosmin 1 (NPM1) je zvýšeně exprimován u rakoviny žaludku, střeva, rekta, vaječníků a prostaty. Četné mutace se nacházejí i u hematologických malignit. U akutních myeloidních leukemia (AML) se jedná o nejčastěji se vyskytující mutace. Analyzovali jsme expresi mutovaného genu NPM1 u pacientů s AML. Porovnali jsme průběh minimální reziduální nemoci (MRN) mutovaného genu NPM1 (mutNPM1) pomocí mRNA a genomové DNA s průběhem exprese genu WT1. Pro kvantitativní stanovení MRN pomocí mutNPM1 a genu WT1 bylo použito real-time RT-PCR. V naší laboratoři se mutace genu NPM1 vyskytuje u 20% pacientů s AML. U 35 pacientů byla sledována minimální reziduální nemoc pomocí mutNPM1. Analyzovali jsme celkem 7 typů mutací, a to nejčastěji typu A v 81%, mutaci D ve 3% a mutaci B ve 2%. Molekulární relaps lze pomocí exprese mutNPM1 předpovědět v předstihu 36 dnů (medián). U 13 pacientů jsme porovnali expresi zjištěnou pomocí mRNA s expresí na úrovni genomové DNA. Výsledky se shodovali, ale zdá se, že monitorování pomocí genomové DNA více odpovídá klinickým datům. U 29 pacientů jsme expresi mutace NPM1 typu A porovnali s expresí genu WT1. Naměřené hodnoty spolu velmi dobře korelují a spolehlivě odrážejí klinický stav pacienta. Sledování MRN pomocí mutNPM1 má tu výhodu, že mutNPM1 je negativní u zdravých pacientů a u pacientů v remisi, narozdíl od genu WT1, který bývá u pacientů v remisi i u zdravých dárců pozitivní. Naše výsledky dokazují užitečnost sledování mutovaného genu NPM1 jako molekulárního markeru pro sledování MRN u pacientů s AML. Finančně podpořeno grantem IGA MZČR NS10632-3/2009 a grantem IHBT00023736.

P4 / 1876.**Cytogenetic and clinical characterization group of acute leukemia patients with rearrangements MLL gene (11q23)**

Svoreně Zdenko, Ružbacký Rastislav, Čermák Martin, Janíková Petra, Szabóová Žofia, Copáková Lucia (*Národný onkologický ústav, Bratislava – SK*)

Introduction Translocations involving chromosomal band 11q23 are found in most of the infant acute lymphoblastic leukemia. Majority of these translocations lead to the rearrangement of the MLL gene and the formation of new chimeric genes. Acute leukaemia patients carrying MLL rearrangements are not exceeding a total of 800 cases per year in Europe (about 300 pediatric and 500 adult leukaemia pa-

tients). The most common MLL fusion partners are AFF1/AF4 (4q21), MLLT3/AF9 (9p23), MLLT1/ENL (19p13.3), MLLT10/AF10 (10p12), MLLT4/AF6 (6q27), ELL (19p13.1), EPS15/AF1P (1p32), MLLT6/AF17 (17q21). Material and methods From January 2009 to the end of 2010 we examined 246 patients with acute leukaemia (130 pediatric and 116 adult). In this group of patients the rearrangement of the MLL gene was proved by the fluorescence in situ hybridization (FISH) with LSI MLL Dual colour, Break apart probe and/or conventional cytogenetic was made. We also examined rearrangement of the MLL gene by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Results and Conclusion In above mentioned group of patients we have found 13 patients with MLL translocation that means 5,2%. This number is in compliance with the published data. We present case reports by some selected interesting patients where we also have used additional methods such as multicolour FISH, event. molecular identification arising chimeric genes has been done in cooperation with external institution. Information about patients include clinical, haematological data as well as information about reach of the completed remission or relapses on cytogenetic and molecular level in time.

MYELOYDYSPLASTICKÝ SYNDROM / ANÉMIE

P5 / 1880.**Klinický význam stanovenia hepcidinu, centrálny regulátor metabolismu železa**

Nosál Miloš, Mistrík Martin

(*Univerzitná nemocnica Bratislava, Nemocnica Staré Město, Bratislava – SK; Klinika hematológie a transfúziológie, LF UK, SZU, UNB, Bratislava - SK*)

Aj keď je železo nevyhnutné pre žijúce organizmy na ich prežitie, jeho reaktívne vlastnosti vyžadujú prísnu reguláciu, aby sa zabránilo jeho toxickým účinkom. Cicavčia homeostáza železa vyžaduje úzkostlivú kontrolu mnohých proteínov zahrnutých do črevnej absorpcie železa, do erythropoetického riadenia kostnej drene a regulácie tkanivového železa. Nedávne štúdie na zvieracích modeloch poskytli dôležité preniknutie do fyziológie železa. Hecpidin (Hepc) je v pečeni produkovaný peptický hormón. Považuje sa za nový biomarker, hlavný regulátor telového metabolismu železa. Jeho produkciu kontroluje hlavne erythropoetická aktivita kostnej drene, množstvo cirkulujúceho a uloženého telového železa a zápal. Nedávno sa vyvinulo viacero testov na meranie hepcidinu v sére aj moči u ľudí, čo poskytlo nové možnosti na štúdium jeho regulácie u ľudí. Avšak, len malý počet laboratórií je schopných vykonať tieto testy. Anémia pri zápalovej chorobe čreva (inflammatory bowel disease (IBD) je prototypom kombinácie deficitu železa a anémie pri zápale (anemia chronických chorôb - anemia of chronic disease; ACD), ktorá je zapríčinená negatívnymi následkami aktivovaného imúnneho systé-

mu na rozdielnej úrovni erytropoézy. Vedľa nedostatku železa pri ACD, metabolické poruchy a deficity vitamínov rovnako ako všeobecne používané IBD lieky (lieky na zápalovú chorobu čreva) môžu zhoršiť anémiu pri zápalovej chorobe čreva. Pokračujúce štúdie u ľudí poskytnú viac informácií o etiológii chorôb metabolizmu železa, zdokonalí sa diferenciálna diagnóza týchto chorôb a postupne sa vytvoria aj nové liečebné možnosti. Cieľom článku je podať prehľad o regulácii železa a Hcp., získaný z klinických štúdií a z in vitro a in vivo štúdií na zvieratách a o zmeny hladín hepcidinu pri niektorých hematologických ochoreniach.

P6 / 2004.

Upregulace miRNA lokalizovaných ve 14q32 doméne v CD34+ buňkách kostní dřeně u pacientů s MDS

Krejčík Zdeněk, Dostálová Merkerová Michaela, Votavová Hana, Belíčková Monika, Vašíková Alžběta, Čermák Jaroslav

(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

MicroRNA (miRNA) jsou malé nekódující RNA, které fungují jako klíčové regulátory mnoha buněčných procesů včetně hematopoézy. Jejich aberace hraje významnou roli v mnoha patologických procesech, avšak o vztahu miRNA k vývoji a progresi myelodysplastického syndromu (MDS) je k dispozici pouze omezené množství informací. MDS je heterogenní skupina klonálních preleukemických stavů s vysokým rizikem transformace do sekundární akutní myeloidní leukemie (sAML). V této studii jsme se zaměřili na stanovení míry exprese miRNA lokalizovaných v doméne 14q32 u pacientů s MDS, neboť role některých z těchto miRNA byla nedávno popsána v různých vývojových, nebo onkogenních procesech, včetně AML. S využitím čipových technologií (human v2 MicroRNA Expression Profiling Kit, Illumina) jsme změřili expresi miRNA v CD34+ buňkách kostní dřeně u 39 pacientů s MDS a sAML a získaná data jsme porovnali se skupinou 6 zdravých dárců. Všechny miRNA z uvedeného klastru, jejichž exprese byla detekována během experimentu (n=35), vykazovaly vyšší hladinu exprese u pacientů v porovnání s kontrolami (24 miRNA na hladině $p < 0,01$, ostatní miRNA (n=11) vykazovaly patrný, nicméně statisticky nevýznamný vzestup u zhruba 80% pacientů). Pro vyšetření přítomnosti kryptických chromozomálních aberací v tomto regionu, které by mohly být zodpovědné za zvýšenou expresi miRNA (variace počtu kopií a uniparentální dizomie), jsme otestovali 23 pacientů s MDS pomocí celogenomové SNP-array (HumanCyto-SNP-12 BeadChip; Illumina), ale nenašli jsme žádný důkaz pro chromozomální defekt v této oblasti; toto zjištění podporuje spíše hypotézu o změně v metylačním, nebo acetylačním stavu v dané oblasti, nebo o malfunkci regulátorů transkripce. Podpořeno GACR301/09/P579 a UHK00023736.

P7 / 1869.

Změny proteomu plasmy u pacientů s refrakterní cytopenií s multilineární dysplazií

Májek Pavel, Reicheltová Zuzana, Suttar Jiří, Čermák Jaroslav, Pečánková Klára, Dyr Jan Evangelista
(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Refrakterní cytopenie s multilineární dysplazií (RCMD) se řadí do skupiny onkohematologických onemocnění známých jako myelodysplastický syndrom (MDS), jehož patogeneze zůstává stále nejasná. Cílem této práce bylo nalézt změny v plasmatickém proteomu pacientů s RCMD. Vzorky plasmy byly depletovány a proteiny rozděleny pomocí 2D SDS-PAGE (pI 4-7). Jednotlivé proteomy byly porovnány statistickým programem Progenesis SameSpots. Proteiny ze signifikantně odlišných spotů byly štěpeny trypsinem, peptidy byly separovány nanokapalinovou chromatografií (Ultimate 3000, Dionex) a identifikovány pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (HCT Ultra ion-trap, Bruker). Porovnáním skupiny RCMD se zdravou kontrolní skupinou bylo nalezeno 61 spotů, které se signifikantně ($p < 0,05$) lišily; proteiny z 59 spotů se podařilo úspěšně identifikovat a odpovídaly 57 různým proteinům. Dále byla pozorována fragmentace několika proteinů (albumin, inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4, proteiny komplementu C4A a C4B). Naše výsledky poukazují na změny plasmatických proteinů u RCMD pacientů. Mezi hlavní změny, které byly pozorovány, patří fragmentace proteinů komplementu C4A i C4B a dalších proteinů. Poděkování: Tato práce byla podpořena granty AVČR KAN200670701, VZ ÚHK MZ 02373601 a MZ NS10633-3/2009.

CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE / MYELOPROLIFERATIVNÍ NEMOCI

P8 / 1971.

Vliv vybraných polymorfizmů genů SLCO1B3, ABCB1 a ABCG2 u pacientů s chronickou myeloidní leukémií na plasmatickou hladinu imatinibu a odpověď na léčbu imatinib mesylátem

Vrbacký Filip, Bělohlávková Petra, Voglová Jaroslava, Maláková Jana, Nekvindová Jana, Žák Pavel, Pecka Miroslav, Malý Jaroslav

(II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie, LF UK a FN, Hradec Králové; Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN, Hradec Králové)

Řada případů rezistence na imatinib mesylát, která vede ke zhoršené odpovědi, popř. selhání léčby, může být vysvětlena přítomností mutací nebo zvýšenou expresí fúzního proteinu BCR/ABL. Zvýšená rezistence však může být způsobena i polymorfizmy genů pro proteiny, které ovlivňují metabolismus a transport této látky. Přes zvyšující se počet studií, které se této problematice věnují, je vliv mnoha těchto polymorfizmů stále nejasný. V naší studii jsme proto pro-

vedli genotypovou analýzu polymorfizmů genů *SLCO1B3*, *ABCB1* a *ABCG2* u 58 pacientů s chronickou myeloidní leukémií léčených imatinib mesylátem (400 mg/den). Pacienti s prokázaným selháním léčby způsobeným mutací v kinázové doméně ABL byli ze studie vyloučeni. U 51 pacienta byla navíc stanovena plasmatická hladina imatinib mesylátu. Signifikantní závislost reakce na léčbu hodnocenou podle doporučení European LeukemiaNet nebyla pozorována u nositelů homozygotní alely T nebo C polymorfizmu *ABCB1* C3435T (TT vs CT nebo CC, $p = 0.437$; CC vs CT nebo TT, $p = 0.460$) nebo heterozygotů (CT vs CC nebo TT, $p = 0.923$). Ani u polymorfizmů *ABCG2* C421A ($p = 0.299$) a *SLCO1B3* G480C ($p = 0.496$) nebyla pozorována jiná reakce na léčbu. Stejně tak nebyl nalezen rozdíl v plasmatické hladině imatinib mesylátu v závislosti na různých genotypech ($n = 51$; *ABCB1* C3435T, $p = 0.890$; *ABCG2* C421A, $p = 0.978$; *SLCO1B3* G480C, $p = 0.923$). Na rozdíl od některých dříve publikovaných prací se nám nepodařilo prokázat vztah mezi různou odpovědí na léčbu či hladinou plasmatického imatinibu u všech tří studovaných polymorfizmů. Pro potvrzení našich výsledků bude nutné provést analýzu většího počtu pacientů, popř. dalších polymorfizmů. Tento výzkum byl realizován s podporou výzkumného záměru ministerstva zdravotnictví č. MZO 00179906.

P9 / 2034.

Sledování inhibice fosforylace Crkl a „Src family“ kináz in vitro pomocí průtokové cytometrie u pacientů s chronickou myeloidní leukémií léčených tyrozinkinázovými inhibitory

Calábková Lenka, Mojžízková Renáta, Novotný Jiří, Gazdová Jana, Holzerová Milena, Faber Edgar, Divoký Vladimír (Ústav biologie LF UP, Olomouc; Hemato-onkologická klinika FN a LF, Olomouc)

Úvod: Cílená léčba chronické myeloidní leukémie (CML) specifickými inhibitory tyrozinkináz (TKI) představuje pro svoji účinnost, selektivitu a dostupnost první volbu při léčbě pacientů s CML. Nevýhodou je vznik lékové rezistence či intolerance na léčbu, které se předchází vývojem inhibitorů další generace a používáním sofistikovaných metod při monitorování léčebné odpovědi. Metody: V naší laboratoři jsme zavedli jednoduchou screeningovou metodu umožňující in vitro hodnocení míry účinnosti TKI. Principem je detekce fosforylace Crkl (nepřímo tak inhibice aktivity Bcr-Abl TK) a „Src family“ kináz (SFK) pomocí průtokové cytometrie. Touto metodou jsme nahradili dřívější testování senzitivity CML buněk k TKI prostřednictvím imunoblotu. Nesporná výhoda nové metody spočívá v kvalitativním i kvantitativním zhodnocení výsledku, což zvyšuje validitu testování, a je navíc laboratorně a co do spotřeby vzorku méně náročná. Výsledky: In vitro testy bylo vyšetřeno 17 nově diagnostikovaných pacientů a 12 pacientů s rozvojem rezistence. Z tohoto souboru byla na základě monitorování P-Crkl u 10 pacientů prokázána in vitro senzitivita na imatinib (IM) i dasatinib (DAS), u 12 par-

ciální rezistence a u 6 rezistence na IM. Šest parciálně rezistentních/rezistentních pacientů na IM vykazovalo senzitivitu na DAS, 10 bylo parciálně rezistentních a pouze 2 pacienti byli rovněž rezistentní na DAS. Vyjma 2 případů byla prokázána u sledované skupiny pacientů úplná inhibice SFK dasatinibem. U 4 pacientů byla pozorována rovněž výrazně zvýšená aktivace SFK v neinhibovaném vzorku. Závěr: Funkční testy in vitro senzitivity leukocytů na TKI korelují velmi dobře s klinickou odpovědí v období rozvoje rezistence na léčbu. U vyšetření při stanovení diagnózy a v situaci suboptimální odpovědi se setkáváme s „falešně negativními“ výsledky. Ty mohou odpovídat nepřítomnosti signifikantního množství rezistentních buněk (jejichž množství se zvyšuje až pod selektivním tlakem TKI) nebo vlivu dalších faktorů, které ovlivňují léčebnou odpověď in vivo (přidatné cytogenetické abnormality, farmakokinetika léčiva aj.). Funkční testy jsou v situaci cytogenetické rezistence významnou součástí komplexního vyšetření nezbytného při rozhodování o léčbě CML pacientů se selháním léčby IM, popřípadě TKI druhé generace. Podpořeno granty MSM6198959205 (MŠMT ČR), LF_2011_011, LF_2011_006 (LF UP) a společnosti Bristol-Myers Squibb.

P10 / 1901.

Identifikácia mutácii génu JAK2 u pacientov s diagnózou polycytémia vera

Mikulášová Zuzana, Leitnerová Michaela, Copáková Lucia (Oddelenie lekárskej genetiky, Národný onkologický ústav, Bratislava - SK)

Úvod: Myeloproliferatívne neoplázie (MPN) vznikajú patologickou transformáciou pluripotentnej kmeňovej bunky. Medzi klasické chronické myeloproliferatívne ochorenia patrí: chronická myeloidná leukémia (CML), polycytémia vera (PV), esenciálna trombocytémia (ET) a primárna myelofibróza (PMF). U týchto ochorení nemali molekulárne markery dlhú dobu váhu. V roku 2005, pri objavení špecifickej aktivačnej mutácie v JH2 doméne JAK2 kinázy, však nastal zlom. Dochádza pri nej k substitúcii guanínu za tymín v pozícii 1849 exónu 14 (c.1849 G>T), a tým k zámeně valínu za fenylalanín v pozícii 617 aminokyselinovej sekvencie (V617F). Táto somatická bodová mutácia sa vyskytuje u 65%-97% pacientov s PV a v súčasnosti sa považuje za kľúčový marker pri diagnostike MPN. Následne, v roku 2007 u JAK2 V617F negatívnych pacientov s PV, bola identifikovaná nová séria somatických mutácií. Tieto mutácie bývajú zoskupené v rámci vysoko konzervovaného regiónu exónu 12 génu JAK2 a sú veľmi variabilné. Vyskytujú sa tu „in-frame“ delécie, bodové mutácie, duplikácie a inzercie. Cieľom našej práce bola identifikácia JAK2 V617F mutácie u pacientov s nepotvrdenou diagnózou PV a zavedenie vyšetrenia mutácií génu JAK2 v exóne 12 u JAK2 V617F negatívnych pacientov s PV. Materiál a metódy: Na genetickú analýzu mutácií JAK2 génu sme použili vzorky DNA izolované z periférnej krvi. Prítomnosť V617F mutácie sme detegovali klasickou PCR reakciou, po ktorej nasledovalo restriktčné štiepenie pomocou enzýmu

Bsa XI. Konzervovaný región exónu 12 sme vyšetřili prostredníctvom denaturačnej analýzy s vysokou rozlišovacou schopnosťou (HRMA). Na vizualizáciu PCR produktov bola využitá interkalačná farbička a denaturácia v lineárnom teplotnom gradiente prebiehala v HRMA analyzátoře. Verifikáciu pozitívnych vzoriek sme realizovali prostredníctvom sekvenovania DNA. Výsledky: V priebehu rokov 2009 a 2010 sme na Oddelení lekárskej genetiky NOÚ vyšetřili 50 pacientov (33 mužov a 17 žien) vo veku od 4 do 87 rokov s podozrením na PV. Mutáciu JAK2 V617F sme identifikovali u 18/50 (36%) pacientov a mutácie v exóne 12 u 2/32 (6,25%) pacientov. V prvom prípade sa jednalo o deláciu 6 nukleotidov exónu 12 c.1624-1629del6/ N542-E543del a v druhom prípade o „missense“ mutáciu c.[1615 A>T; 1616A>T]/ K539L. Záver: Na našom oddelení sa nám úspešne podarilo zaviesť vyšetřenie najčastejšie sa vyskytujúcich mutácií v exóne 12 génu JAK2 a taktiež identifikovať mutáciu JAK2 V617F u pacientov s PV.

HEMOSTÁZA

P11 / 2022.

Stanovení generace trombinu u nosičů primární trombofilie a u pacientů se získanými rizikovými faktory pro žilní tromboembolismus

Hluší Antonín, Slavík Luděk, Úlehlová Jana, Procházková Jana, Krčová Věra

(Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Úvod: Standardně užívaná screeningová vyšetřeni trombofilních stavů vyžadují vyšetřeni panelu koagulačních, biochemických a molekulárních testů. Trombin generační test (TGT) byl vyvinut s cílem napodobeni fyziologických koagulačních mechanismů a nabízí možnosti využití v posuzování jak krvácivých tak trombofilních klinických situací. Cíl práce: Stanovit generaci trombinu u nosičů primárních trombofilních mutací a u pacientů s přítomností získaných rizikových faktorů, srovnání výsledků s generací trombinu u zdravých jedinců. Metodika: Měření generace trombinu bylo provedeno u 71 nosičů primární trombofilie (mutace FV Leiden G1691A, mutace FII G20210A) a u 28 pacientů se získaným trombofilním rizikem (hormonální antikoncepce, hormonální substituční léčba, gravidita, malignita, chronické zánětlivé onemocnění). Získaná data byla srovnávána s výsledky parametrů generace trombinu od 66 zdravých dárců krve. Generace trombinu byla měřena v plasmě chudé na trombocyty pomocí komerčně dostupného testu Technothrombin®TGA. Srovnávány byly standardní parametry TGT křivky (Lag fáze, maximum generace trombinu - Cmax a endogenní potenciál trombinu - ETP). Výsledky: Při srovnání s výsledky kontrolní skupiny byly Cmax a ETP vyšší u nosičů primární trombofilní mutace i u pacientů se získaným rizikovým faktorem (medián Cmax 203nM/ 263nM vs 113nM, medián ETP 2124nm/2235nM vs 1519nM). Významný rozdíl v době do nástupu generace trombinu (Lag fáze) pozorován nebyl. Analýza kontrolní skupiny neprokázala závislost generace

trombinu na věku ani na pohlaví. Subanalýza skupiny s primární trombofilii neprokázala statisticky významný rozdíl v parametrech TGT mezi symptomatickými nosiči trombofilní mutace a probandy, kteří v minulosti žilní trombotickou komplikaci prodělali. Závěr: Trombin generační test představuje slibnou možnost v globálním posuzování funkce hemokoagulačního systému. Měření generace trombinu stále provází některé problémy nejen v pranalytické a analytické fázi, které zatím neumožňují standardizaci testu.

P12 / 2000.

Prevenia venóznei trombózy v detskej chirurgii

Molnár Marián, Plameňová Ivana

(KDCH JLF UK a UN, Martin - Slovensko)

Profylaxia venózneho tromboembolizmu (VTE) u detí a adolescentov, na rozdiel od dospelého veku, nie je presne definovaná. Je to spôsobené tým, že v detskom veku je výskyt VTE ako komplikácie chirurgického výkonu asi 10-krát zriedkavejší a vplyv známych rizikových faktorov na vznik VTE je relatívne menší, preto sa rutínne použitie farmakoprofylaxie VTE neodporúča. Rizikovými faktormi VTE sú: centrálny venózný katéter, malignita, chemoterapia, imobilizácia, nefrotický syndróm, popáleniny, trauma, vrodené chyby srdca, obezita, fajčenie, hormonálna antikoncepcia, trombofilia, predchádzajúca VTE alebo rodinná anamnéza VTE, chirurgický zákrok. Prevenia VTE u detského chirurgického pacienta vychádza z doporučení ACCP 2008 po konzultácii chirurga, anesteziológa a hematológa, môže byť nefarmakologická alebo farmakologická (preferuje sa použitie nízkomolekulového heparínu). Zohľadnením veku, prítomnosti rizikových faktorov a typu operačného zákroku možno vypočítať skóre rizika vzniku VTE, stratifikovať pacientov do skupiny nízkého, stredného a vysokého rizika a zvoliť adekvátnu formu prevencie VTE. Autori uvádzajú príklad praktického algoritmu primárnej profylaxie VTE v detskom veku u chirurgických pacientov a detí hospitalizovaných na jednotkách intenzívnej starostlivosti.

P13 / 1903.

Analýza příčin prodloužení aPTT u hospitalizovaných pacientů se zaměřením na možnou diagnostiku získané hemofilie

Ptáček Jan

(Hematologicko-transfúzní odd, Nemocnice, Frýdek-Místek)

CÍL STUDIE: Retrospektivním hodnocením výsledků vyšetřeni aPTT pacientů ošetřeni během hospitalizace v Nemocnici ve Frýdku-Místku, p.o. v období leden až říjen 2010 zjistit příčiny této odchylky se zaměřením na případnou diagnostiku získané hemofilie A. METODIKA: Pomocí údajů z informačního systému nemocnice StaproAcord byly získány všechny patologické výsledky aPTT (jako referenční mez byla určena hodnota aPTT vyšší než 50 bez jiných odchylek v koagulačním scree-

ningu). Následně byla sestava pacientů redukována pouze na pacienty ve věku 20 – 60 let. Rozborem lékařské dokumentace byla zjišťována nejpravděpodobnější příčina prodlouženého aPTT a v údajích bylo pátráno po krvácivých projevech pacientů. **VÝSLEDKY:** Celkem bylo nalezeno 45 pacientů s abnormálním výsledkem aPTT odpovídajícím zadanému požadavku v uvedeném věkovém rozmezí, u kterých byla v informačním systému nemocnice zaznamenána alespoň jedna patologická hodnota vyšetření aPTT. Median hodnoty aPTT byl v tomto souboru pacientů 72,8, (směrodatná odchylka 40,48), průměrná hodnota aPTT byla 89,91 (51,0 – 201,6) Rozbor příčin prodloužení aPTT je uveden níže ve formátu: diagnóza-počet pacientů 1) Iatrogenní příčina (aplikace heparinu pro susp. AIM nebo EP během přednemocniční péče): 20 pacientů. 2) Iatrogenní příčina (doznívající heparinizace po dialýze): 2 pacienti. 3) Přítomnost lupus antikoagulans: 5 pacientů. 4) Deficit F. XII: 3 pacienti. 5) Hepatopatie (kombinovaný deficit několika faktorů): 4 pacienti. 6) Septický stav: 4 pacienti. 7) Již anamnesticky diagnostikována hemofilie A: 1 pacient. 8) Nepodařilo se objasnit jednoznačnou příčinu: (ICHS, CMP, Ca colonis, st.p. hemicolectomie, spontánní fyziol.porod bez větších krevních ztrát, ICHS s recid., FiS bez antikoagulační léčby, kóma mozku, distenze C páteře, traumatický hemo-pneumothorax: 6 pacientů. U žádného pacienta v této heterogenní skupině nebyly přítomny krvácivé projevy. **DISKUSE:** V souboru pacientů nebyl přítomen pacient s inhibítorem proti f. VIII. Zajímavým zjištěním je, že téměř polovinu pacientů s dokumentovaným prodloužením hodnoty aPTT představovali pacienti s aplikovaným heparinem během převozu do nemocnice. Přítomnost inhibítora proti f. VIII se nemusí dle literatury klinicky manifestovat hemoragickými projevy a může se projevit jen abnormálním výsledkem koagulačního vyšetření (aPTT), je proto vyšetření aPTT možno považovat za součást screeningu, který může k diagnostice tohoto vzácného onemocnění přispět.

P14 / 1925.

Thin fibrin networks for blood vessel engineering

Riedel Tomáš, Brynda Eduard, Chlupáč Jaroslav, Filová Elena, Bačáková Lucie, Dyr Jan Evangelista
(*Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague; Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, vvi, Prague; Institute of Physiology AS CR v.v.i., Prague*)

When exposed to blood, any surface other than that of undamaged vascular wall endothelium induces blood coagulation. Fibrin network formed after injury to stop bleeding, later, serves as a temporary scaffold for cells repairing the damaged vessel. These processes help organism to maintain haemostasis after vessel injury, however, they are a source of troubles when synthetic materials are used in cardio-vascular surgery. Particularly, small diameter vessel grafts displayed high failure ratios due to thrombus formation and perianastomotic hyperplasia. A confluent, semipermeable layer of endothelial cells (EC) grown *in vitro* on the inner side of grafts can solve the problems. In this work,

knitted polyethylene terephthalate (PET) vascular prostheses modified with collagen were coated with artificial fibrin gels using a novel technique based on the catalytic activity of surface-bound thrombin on fibrinogen solution. Thin fibrin networks were formed on surface of polymer fibers without filling the space between them with bulk fibrin gel when antithrombin III was used for inhibition thrombin released into solution. A confluent layer of bovine pulmonary artery endothelial cells formed on the fibrin coated prostheses after 7 days *in vitro* cultivation. The technique makes it possible to encourage the endothelialization vascular prosthesis lumen while preserving the free space in the vessel wall for potential capillary vascularization. Acknowledgements: This research was supported by the Academy of Sciences of the Czech Republic under Contract No KAN200670701 and VZ ÚHK MZ 02373601

P15 / 1941.

Oxidační modifikace fibrinogenu

Štikarová Jana, Májek Pavel, Reicheltová Zuzana, Jedličková Ivana, Suttner Jiří, Dyr Jan Evangelista
(*Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha*)

Oxidační stres je chápán jako stav organismu, při kterém dochází k nekontrolovatelné tvorbě volných radikálů. Během jejich působení na biomolekuly může docházet k pozměnění jejich struktury a následně i k narušení biologické funkce. Mezi bílkoviny citlivé k působení oxidačního stresu patří fibrinogen (FBG). Jedná se o plasmatický glykoprotein o molekulové hmotnosti 340 kDa. Skládá se ze tří neidentických párů řetězců alfa, beta a gama. 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. V této práci byl zkoumán vliv oxidačních modifikací na molekulu FBG a její vlastnosti. Modifikace byly vyvolány působením dvou činidel – chlornanu sodného (NaOCl) a 3-morpholinosydnoniminu (SIN-1). Tato modifikační činidla byla vybrána tak, aby simulovala možné reakce probíhající v organismu během působení oxidačního stresu. Pro posouzení míry modifikace byla využita metoda stanovení karbonylových skupin. U modifikovaného i kontrolního fibrinogenu byla stanovena AOPP (advanced oxidation protein products) reaktivita. Modifikovaný a kontrolní fibrinogen byl dále analyzován pomocí chromatografie na reverzní fázi. Pro pozorování interakcí mezi modifikovaným fibrinogenem a krevními destičkami bylo využito jak dynamické (analyzátor "Cone and Plate(let)"), tak statické adheze krevních destiček na imobilizovaný fibrinogen. Bylo zjištěno, že modifikovaný fibrinogen vykazoval vyšší AOPP reaktivitu než kontrolní. Krevní destičky v přítomnosti fibrinogenu modifikovaného NaOCl adherovaly při dynamické adhezi ochotněji než v přítomnosti kontrolního. Zjištěná data ukazují na možnost ovlivňování struktury fibrinogenu a následně i jeho interakce s krevními destičkami v místě tvorby reaktivních kyslíkových a dusíkatých látek při patologických dějích. Tato práce vznikla za podpo-

ry grantu VZ ÚHKT MZ 00002373601 a IGA NS 10633-3/2009.

P16 / 1943.

Modifikace destičkových bílkovin za podmínek oxidačního stresu

Pimková Kristýna, Suttner Jiří, Májek Pavel, Dyr Jan Evangelista
(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Role krevních destiček v hemostáze může být významně ovlivněna redoxním stavem organismu. Během některých onemocnění, zánětlivých procesů, stárnutí dochází ke zvýšené produkci volných radikálů, ke vzniku reaktivních kyslíkatých (ROS) a dusíkatých látek (RNS) a tím k oxidační nerovnováze (oxidačnímu stresu). Proteiny jsou citlivým cílem produktů oxidačního stresu, může docházet k jejich modifikaci a ke změně jejich funkce. V této práci jsme sledovali vliv oxidačního stresu na bílkoviny krevních destiček za použití stresového agens 3-morpholinosydnoniminu (SIN-1). Promyté destičky byly vystaveny působení SIN-1. Nitrace proteinů byla sledována metodou COFRADIC (Combined Fractional Diagonal Chromatography). Bílkoviny krevních destiček ovlivněných SIN-1 byly zhydrolyzovány trypsinem. Peptidy byly rozděleny chromatografií na reverzní fázi v prvním směru a získané frakce byly specificky modifikovány dithionitátem. Takto modifikované peptidy byly opět rozděleny na reverzní fázi za stejných podmínek. Peptidy, které neobsahovaly nitro skupinu, zůstaly nezměněny a eluovaly se ve stejném čase jako při prvním dělení, zatímco nitrované peptidy přeměněné po modifikaci se eluovaly dříve. Tyto frakce, ve kterých byla nitroskupina redukována na aminoskupinu, byly identifikovány 2D-HPLC/ESI-MS/MS. Karbonylované proteiny byly detegovány SDS PAGE s imunoblottingem. Lyzát krevních destiček ovlivněných SIN-1 byl inkubován s 0,2% DNPH. Bílkoviny byly rozděleny na SDS polyakrylamidovém gelu (5-15%), přebílotovány na PVDF membránu, inkubovány s protilátkou anti-DNP značenou alkalickou fosfatázou a detegovány chemiluminiscencí. Karbonylované proteiny byly identifikovány pomocí 2D-HPLC/ESI-MS/MS. Zjistili jsme, že postranní řetězce řady proteinů v krevních destičkách podléhaly působení superoxidu za vzniku karbonylových skupin. Na tyrosinových zbytcích docházelo působením peroxynitritu ke vzniku nitroskupin. Tyto posttranslační modifikace mohou významně ovlivnit funkci bílkoviny a hrají tak zásadní roli v patofyziologii onemocnění. Je známo, že vznik karbonylových skupin je markem degradace proteinů a odráží intenzitu oxidačního stresu. Identifikace bílkovin v destičkách, které podléhají nitracím a karbonylacím by mohla pomoci objasnit vliv těchto změn na jejich funkci. Tato práce vznikla za podpory grantů: NS10633-3/2009 a MZ 02373601 Ministerstva zdravotnictví, ČR a grantu KAN200670701 Akademie věd, ČR. Poděkování za podporu firmě Baxter, ČR.

P17 / 1881.

TAFI (trombinom aktivovatelný inhibitor fibrinolýzy) a AICMP (akutna ischemická cievna mozgová príhoda)

Nosál Miloš, Mistrík Martin, Vestenická Veronika, Turcsányi Peter
(Univerzitná nemocnica Bratislava, Nemocnica, Staré Město, Bratislava – SK; Klinika hematológie a transfúziológie, LF UK, SZU, UNB, Bratislava - SK; I. neurologická klinika, LF UK, UNB, Bratislava - SK)

Úvod: Koncentrácia TAFI (trombinom aktivovatelný inhibitor fibrinolýzy, procarboxypeptidáza U, pro CPU) je potenciálne spojená s trombotickým rizikom a zvýšené hladiny TAFI sa môžu zaznamenať u pacientov s ischemickou mozgovou príhodou. Zlepšené poznanie úlohy TAFI pri akútnej ischemickej CMP je nevyhnutnosťou pre vývoj primeranejších liečebných postupov, ktoré zahrnujú inhibítory karboxypeptidázy. Vyšetřili sme plazmatické hladiny TAFI u pacientov s AICMP na začiatku ochorenia do 4 hodín, do 48-72 hodín a po týždni. Metóda: vyšetřili sme plazmatické hladiny TAFI u 32 pacientov s AICMP podľa rozsahu postihnutia. Výsledky: TAFI koncentrácia poklesla signifikantne do prvých 72 hodín po porážke, ale po týždni po prekonanej AICMP sa hladiny TAFI vrátili na základnú hodnotu. Zaznamenali sme bifázický priebeh hladín TAFI, nepriaznivý vývoj porážky v priebehu prvých 48-72 hodín a zlý dlhodobý výsledok. Závery: Pokles hladín TAFI (proCPU) koncentrácie v prvých 72 hodinách od začiatku porážky koreluje s ťažšou formou porážky, jej nepriaznivým vývojom a horším dlhodobým výsledkom AICMP.

NHL

P18 / 1967.

Detekce fúzních genů ALK/? u pacientů s ALK pozitivním anaplastickým velkobuněčným lymfomem

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

Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) patří do skupiny T lymfomů s expresí cytokinového receptoru CD30. V případě ALK pozitivní ALCL dochází k patologické aktivaci onkogenu ALK ležícím na 2p23 (gen anaplastic lymphoma kinase), která je způsobena chromozomální translokací, při které vznikají fúzní geny s různými translokačními partnery. Nejčastěji (75%) nacházíme translokaci t(2;5), kdy dochází k fúzi s genem NPM (gen nukleofosmin). Cílem práce byla detekce nejčastějšího fúzního genu NPM/ALK. Dále bylo u pacientů bez prokázané fúze NPM/ALK provedeno následné hledání translokačního partnera genu ALK pomocí metody 5' RACE. Poté byla zavedena kvalitativní resp. kvantitativní PCR k detekci dané variantní translokace pro ověření fúzního produktu.

Výsledky jsme porovnávali s výsledky imunohistochemického průkazu (IHC) exprese proteinu ALK a jeho lokalizace v buňce a dále s výsledky fluorescenční in situ hybridizace na interfazických jádrech (I-FISH). Celkem jsme vyšetřili 39 pacientů s ALCL (4-67 let; medián 17 let) s IHC prokázanou expresí proteinu ALK. U 37 pacientů bylo provedeno vyšetření zlomu chromozomu 2, oblasti 2p23, pomocí I-FISH a ve všech případech byl detekován zlom. V naší skupině pacientů jsme ve 29/39 případech detekovali fúzní gen NPM/ALK (74%), ve 3 případech fúzní gen ATIC/ALK (fúze s genem 5-aminimidazole-4-carboximide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase), ve dvou případech fúzní gen CLTC/ALK (fúze s genem clathrin heavy chain), 1x jsme detekovali fúzní gen TPM4/ALK, resp. fúzní gen TPM3/ALK, resp. fúzní gen ALO17/ALK (fúze s geny pro tropomyosin 4, resp. 3, resp. gen ALK lymphoma oligomerization partner on chromosome 17). U 2 pacientů NPM/ALK negativních, ALK pozitivních jsme neměli dostatek materiálu (RNA) pro následné vyšetření metodou 5' RACE. Korelace nálezu fúzních genů s imunohistochemickým obrazem ukázala v případě fúze NPM/ALK v 83% jadernou a cytoplazmatickou pozitivitu, u pacientů s fúzí CLTC/ALK byla detekována jasně granulární cytoplazmatická pozitivita a ostatní variantní translokace nesly pouze cytoplazmatickou pozitivitu proteinu ALK. Molekulární diagnostika umožňuje detekovat translokační partnery genu ALK u ALK pozitivní ALCL. Posouzení vlivu jednotlivých translokací na klinický průběh onemocnění vyžaduje delší klinickou studii, která by v rámci mezinárodní spolupráce přispěla k rozšíření souboru pacientů s vzácným onemocněním ALK pozitivní ALCL. Podporováno projekty: MSM 0021620813 a MZO FNM 2005/6704.

PODPŮRNÁ PÉČE

P19 / 1912.

Ambulance paliativní onkologické péče – její význam v poskytování zdravotní péče

Stanislav Filip, Slováček Ladislav, Priester Peter, Kopecký Jindřich, Švecová Dagmar, Šimková Michaela, Petera Jiří (Klinika onkologie a radioterapie LFUK a FN, Hradec Králové)

Paliativní léčba a s ní související ošetrovatelská péče představují v současné době významný problém v organizaci poskytování zdravotní péče. Ambulance paliativní onkologické péče (APOP) přispívá k ověření klinického stavu onkologických pacientů a spolurozhodování o dalších léčebných možnostech a formě jejich zabezpečení. APOP musí obsahovat plně funkční složky zajišťující léčbu bolesti a symptomů, které souvisejí s onkologickým onemocněním a jeho onkologickou léčbou. V APOP bylo v sledovaném období (od 1.1.2008 do 31.10.2010) léčeno celkem 446 nemocných, z toho 288 žen s průměrným věkem 61 let (věkové rozpětí 20-81 let) a 158 mužů s průměrným věkem 56 let (věkové rozpětí 18-96 let).

Podle hodnocení funkční zdatnosti (PS) bylo v kategorii PS-0 8%, PS-1 54%, PS-2 33% a PS-3 5%. APOP využívá jednotný systém vedení zdravotnické dokumentace, jednotný systém hodnocení kvality a kvantity poskytované zdravotní péče – stanovení „minimální zdravotní péče“. V naší práci prezentujeme výsledky, které vyjadřují vzájemné propojení všech složek poskytování zdravotní péče formou spolupráce s praktickým lékařem (PL), spádovými onkologickými odděleními včetně hospicové péče a spolupráce s agenturami domácí zdravotní péče. APOP využívá jednotný systém vedení zdravotnické dokumentace, jednotný systém hodnocení kvality a kvantity poskytované zdravotní péče – stanovení „minimální zdravotní péče“. K jejímu zajištění je nezbytně nutné vzájemné propojení všech složek v rámci poskytování zdravotní péče formou spolupráce s praktickými lékaři, zdravotnickým lůžkovým fondem v rámci regionu včetně hospicové péče a spolupráce s agenturami poskytujícími terénní sesterskou ošetrovatelskou péči.

TRANSFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ

P20 / 2012.

Výsledky vyšetření anti-HBc u dárců tkání v letech 2009 – 2011

Sláviková Margita, Žáková Alexandra, Radová Alice, Trhlíková Petra, Galuszková Dana (Transfuzní oddělení, FN, Olomouc)

ÚVOD: Transfuzní oddělení v Olomouci provádí od 10.6.2009 vyšetření anti-HBc u dárců tkání, jedná se o činnost vyplývající ze zákona č. 296/2008 Sb., o zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka (zákon o lidských tkáních a buňkách). Protilátky proti core antigenu hepatitidy B (anti-HBc) jsou prvními detekovatelnými protilátkami v průběhu onemocnění, které zůstávají přítomny obvykle po dlouhou dobu života. Jejich přítomnost signalizuje probíhající nebo již proběhlou infekci virem HBV (hepatitida B virus). Při akutních infekcích HBV lze protilátky anti-HBc nalézt v séru krátce poté, co se objeví povrchový antigen viru hepatitidy B (HBsAg). Jelikož tyto protilátky jsou detekovatelné ve fázi akutní, chronické i proběhlé infekce, stávají se důležitým epidemiologickým markerem. METODIKA: Srážlivý krevní vzorek odebraný do zkumavky s akcelerátorem srážení. Vyšetření anti-HBc je prováděno testem firmy Abbott Architect Anti-HBc II na analyzátoru Architect i2000SR/Architect i2000. Stanovení anti-HBc je založeno na principu chemiluminiscenční imunoanalýzy na mikročásticích. VÝSLEDKY: Celkem bylo k 25.3.2010 vyšetřeno 2 302 dárců tkání (gynekologická pracoviště pro léčbu neplodnosti, Hematoonkologická klinika FNOL, III. Interní klinika FNOL, Ortopedická klinika FNOL). Celkem bylo zachyceno 71 anti-HBc pozitivit (tj. 3 %, 71/2 302). U 2 231 krevních vzorků byla detekce anti-HBc negativní (tj. 97 %, 2 231/2 302). ZÁVĚR: Naším cílem je zajistit co nejcitlivější způsob

detekce infekce virem HBV a z toho plynoucí co nejbezpečnější podání tkáně či buněk případnému příjemci. Protilátky anti-HBc mohou být jediným sérologickým markerem infekce HBV a jejich stanovení hraje důležitou roli zejména v případech tzv. skryté (okultní) HBV chronické infekce, kdy nelze detekovat HBsAg.

P21 / 1980.

Vliv Traumacentra na AB0 a RhD skupinové zastoupení erytrocytů k hemoterapii

Dudíková Marie, Neničková Marie, Pacasová Rita, Langová Marta

(*Transfuzní oddělení a krevní banka Fakultní nemocnice, Brno*)

Cíl: Na podzim 2009 bylo ve Fakultní nemocnici Brno otevřeno Traumacentrum a oddělení urgentního příjmu. Vliv jejich celoročního provozu na expedici erytrocytových transfuzních přípravků a odběry plné krve je předmětem této práce. Metody: Autorky provedly analýzu zastoupení krevních skupin v registru aktivních dárců krve k 31.12.2010. Současně sledovaly poměrné zastoupení krevních skupin u realizovaných odběrů plné krve a u expedovaných erytrocytových transfuzních přípravků v období 1.1.–31.12.2010. Získané údaje porovnály s výsledky předchozí práce, která monitorovala období r. 2007 (před zahájením provozu urgentního příjmu). Výsledky: Podíl dárců RhD negativních krevních skupin v registru byl vyšší, než je jejich zastoupení v populaci České republiky. Odběry plné krve ve sledovaném období rovněž vykazovaly výrazně vyšší relativní četnosti u všech RhD negativních krevních skupin. Celkový podíl RhD negativních erytrocytů vydaných k hemoterapii v rámci FN Brno poklesl z 20,7 % (r. 2007) na 18,9 % (r. 2010). Nejvýraznější pokles byl zaznamenán u erytrocytů 0 RhD negativních - z 8,3 % (r. 2007) na 6,9 % (r. 2010). Naproti tomu se zvýšil podíl RhD negativních erytrocytů, které byly expedovány externím odběratelům (z 26,1 % v r. 2007 na 28,1 % v r. 2010). Závěr: K očekávanému navýšení expedice RhD negativních erytrocytů na oddělení urgentního příjmu nedošlo. Edukace zaměstnanců urgentního příjmu, úzká spolupráce s Transfuzním oddělením a krevní bankou a strategicky výhodná lokalizace obou oddělení v jednom pavilonu FN Brno, napomohly snížit expedici RhD negativních erytrocytů, zejména 0 RhD negativních z vitální indikace, na nezbytné minimum. Nadužívání RhD negativních erytrocytů externími odběrateli je však dlouhodobě neudržitelné. Je nezbytné zaměřit se na správnou, skupinově vhodnou indikaci, zkvalitnit spolupráci s krevními bankami jednotlivých zdravotnických zařízení a v rámci účelné hemoterapie systémově řešit zásobování s jasně definovanou dostupností.

P22 / 1950.

Príprava autológneho lepidla druhej generácie - skúsenosti a výsledky

Tupý Jaromír, Mítura Juraj, Chrenková Olga, Tupá Miriam, Lacko Anton

(*FZ KU, Ružomberok - SK; ÚHaT ÚVN SNP, FN, Ružomberok - SK*)

Úvod: Fibrínové lepidlo, ako produkt ovplyvňujúci zrážanie krvi, prešiel od vstupných kombinácií so zvieracími komponentami a nedokonalou výrobou k výraznému ovplyvneniu imunologických reakcií prípravou lepidla tzv. druhej generácie. Jednou z nových možností je systém automatickej prípravy ľudského kryoproteínu a trombínovej zložky z jednotky krvnej plazmy pacienta (CryoSeal systém). Účinok napodobňuje fyziologické zrážanie krvi, kde sa fibrinogén mení účinkom trombínu na fibrín a k zrážaniu, v závislosti od aplikácie, dochádza v priebehu niekoľkých sekúnd. Uzavretý systém prakticky eliminuje riziko kontaminácie a technologický spôsob prípravy vylučuje nežiaduce účinky. Komplexnosť prípravku dotvára možnosť plánovanej prípravy a rôzne spôsoby aplikácie, ktoré predurčujú lepidlo na univerzálne podávanie. Cieľ: Laboratórna komparácia kvality fibrínového lepidla a overenie jeho stability v časovej súvislosti. Materiál: Vzorku pre analýzu tvorilo 30 jednotiek fibrínového lepidla pripraveného z čerstvej zmrazenej plazmy. Vstupne sme stanovili objemy plazmy, trombínu, kryoproteínu a čas prípravy. Pred expiráciou prípravku sme laboratórne overili markery kvality (koagulačné faktory I, II, VIII, XIII, vWfAg, trombínovú aktivitu, fibronektín) a stanovili v časovej súvislosti čas in vivo zrážania. Výsledky: Priemerný objem plazmy použitej k výrobe bol 270,80±27,01 ml, objem pripraveného trombínu 6,81±1,25 a kryoproteínom 5,88±1,13 ml. Priemerný čas spracovania 57±5 min. Pri in vivo zrážaní v čase t0 a t4 od rozmrazenia sme namerali priemerné časy 2,9 respektíve 3,6 sekundy. Záver: Pri porovnávaní markerov kvality rozmrazenej ČZP k hodnotám trombínu a kryoproteínu, respektíve času zrážania boli všetky rozdiely štatisticky významné na hladine p<0,01. Pri porovnaní vzostupu hodnôt medzi plazmou a kryoproteínom skúmanej vzorky sme v porovnávaní s výsledkami publikovanými v dostupnej literatúre dosiahli takmer identický pomer nárastu. Hodnoty rozdielov výskumnej vzorky a výsledkov udavaných výrobcom (až na fibrinogén a FXIII plazmy, vWfAg kryoproteínu a fibronektín trombínu) boli štatisticky významné na hladine p<0,01 čo znamená, že naše hodnoty sa v 66,67% prípadov štatisticky líšili. Avšak len v dvoch prípadoch - trombínová aktivita trombínu a fibrinogén plazmy - t.j. 16,67%, sme zaznamenali nižšiu hodnotu a aj v týchto prípadoch nami nameraná hodnota zodpovedala do 90. percentilu priemeru hodnoty výrobcu. Projekt bol podporený MO SR, SEPMZ-103-8/2009-OdV.

P23 / 1949.**Spontánní antepartální RhD aloimunizace**

Holusková Iva, Lubušský Marek, Studničková Martina, Procházka Martin, Galuszková Dana
(*Transfuzní oddělení, FN, Olomouc; Porodnicko-gynekologická klinika LF UP a FN, Olomouc*)

Cíl studie: Zjistit incidenci spontánní antepartální RhD aloimunizace u RhD negativních těhotných žen s RhD pozitivním plodem. Metodika: Celkem bylo v pilotní studii vyšetřeno 411 RhD negativních žen s RhD pozitivním plodem a bez přítomnosti aloprotilátek anti-D na začátku těhotenství. Krevní skupina RhD byla u těhotných žen stanovena v I. trimestru těhotenství, RhD statut plodu byl určen po porodu. Screening nepravidelných antierytrocytárních protilátek byl všem ženám proveden v I. trimestru těhotenství, ve 30.-32. týdnu těhotenství, bezprostředně před porodem ve 39.-42. týdnu těhotenství a následně za 6 měsíců po porodu. Screening protilátek byl proveden v nepřímém antiglobulinovém (LISS/NAT) a enzymovém (papain) testu s jejich následnou identifikací pomocí panelu typových erytrocytů metodou sloupcové aglutinace Dia-Med. Po porodu byl u všech RhD negativních žen stanoven objem fetomaternální hemoragie a byla provedena prevence RhD aloimunizace podáním potřebné dávky IgG anti-D, antepartálně nebyl IgG anti-D žádné ženě podán. Výsledky: Při kontrolním screeningu nepravidelných antierytrocytárních protilátek ve 30.-32. týdnu těhotenství nebyly aloprotilátky anti-D diagnostikovány u žádné ženy (0/411), bezprostředně před porodem ve 39.-42. týdnu těhotenství byly diagnostikovány aloprotilátky anti-D u 2 % žen (8/411) a opakovaně i za 6 měsíců po porodu (8/210). U 201 žen nebylo vyšetření za 6 měsíců po porodu provedeno, nelze u nich tudíž spolehlivě vyloučit spontánní antepartální RhD aloimunizaci. Při nepřítomnosti aloprotilátek anti-D před porodem byl všem ženám po porodu podán IgG anti-D v dávce minimálně 125 µg. Závěr: U RhD negativních žen s RhD pozitivním plodem byla incidence spontánní antepartální RhD aloimunizace ve III. trimestru těhotenství minimálně 2 %. Většinu případů lze teoreticky zabránit preventivním podáním IgG anti-D v dávce 250 µg všem RhD negativním ženám ve 28. týdnu těhotenství. Podpořeno grantem IGA MZ ČR NS-10311-3/2009

P24 / 1931.**Hemorheoferéza - úspěšná léčba drusového odchlípení retinálního pigmentového epitelu**

Bláha Milan, Rencová Eva, Langrová Hana, Bláha Vladimír, Lánská Miriam, Studnička Jan, Rozsival Pavel, Malý Jaroslav
(*II. interní klinika - OKH, LFUK, Hradec Králové; Oční klinika, LF UK, Hradec Králové; Geronto-metabolická klinika, LF UK, Hradec Králové*)

ÚVOD: Věkem podmíněná degenerace makuly (VPMD) je nejčastější příčinou praktické slepoty popula-

ce nad 60 let. Progresi suché formy lze obtížně omezit. Metodou hemorheoferézy lze zlepšit fluiditu krve a tím mikrocirkulaci v cévnatce a metabolismus v sítnici a docílit zástavy progresu nebo zlepšení choroby. ÚČEL PRÁCE: Bylo vyšetřeno 36 pacientů s VPMD a u 12 z nich bylo zjištěno drúzové odchlípení retinálního pigmentového epitelu (drusen retinal pigment epithelium detachment -DPED). Byly sledovány změny rheologických ukazatelů před a po proceduře a hodnocena velikost DPED vlastní modifikací programu Reconstruct - před a po léčbě a oproti kontrolám jako prospektivní randomizovaná studie. METODA A PACIENTI: Plazma byla získávána separátorem Cobe-Spectra (Caridian, Denver, USA) a promývána sekundárním přístrojem Adasorb (Medicap, Ulrichstein, SRN) s filtrem Evaflux 4A (Kuraray, Osaka, Japonsko), který odstraní přesně definované spektrum vysokomolekulárních látek. Dojde k poklesu viskozity alepší se odsun produktů metabolismu v sítnici. Množství promyté plazmy: 1,5 tělesného objemu, antikoagulace: ACD-A 1:15. Bylo sledováno 12 pacientů s DPED, 3 muži a 9 žen u kterých byly provedeny serie 8 procedur hemorheoferézy během 10 týdnů. VÝSLEDKY: Po procedurách klesaly cílové velké molekuly významně: IgM o 75 % ($p < 0,0001$), fibrinogen o 68% ($p < 0,0001$), viskozita krve o 15% ($p < 0,0001$), viskozita plazmy o 12 % ($p < 0,0001$). Po hemorheoferéze bylo zjištěno i po 2,5 roce zmenšení plochy PPEP u 19 očí, zatímco zvětšení bylo zaznamenáno jen u 3 očí ($p = 0,001$). V kontrolní skupině se zmenšení plochy vyskytlo u 3 očí, zatímco zvětšení plochy se vyskytlo u 15 očí ($p = 0,008$). K porovnání rozdílu mezi pacienty po hemorheoferéze a v kontrolní skupině byl použit Kruskal-Wallisův test. Zatímco na počátku sledování byl rozdíl nevýznamný ($p = 0,605$), po 2,5 roce sledování byl tento statisticky velmi významný ($p < 0,0005$). ZÁVĚR: Naše modifikace hemorheoferézy významně snížila viskozitu krve a plazmy jako podmínku k lepší mikrocirkulaci v sítnici. Po léčbě došlo k významnému zmenšení plochy DPED a to ve větším procentu nežli bez léčby. PODĚKOVÁNÍ: Práce byla podporována grantem IGA NS/9743-4.

P25 / 1942.**Kompletní imunohepatologické vyšetření u pacientů Hematoonkologické kliniky – vyhodnocení výsledků za rok 2010**

Zemanová Markéta, Holusková Iva, Papajík Tomáš, Szotkowski Tomáš, Galuszková Dana
(*Transfuzní oddělení FN, Olomouc; Hematoonkologická klinika FN, Olomouc*)

Cíl: zhodnocení výsledků kompletních imunohepatologických vyšetření u hematoonkologických pacientů za rok 2010 a zjištění eventuální aloimunizace u těchto chronicky substituovaných pacientů. Soubor nemocných: v roce 2010 bylo na našem oddělení provedeno celkem 324 kompletních imunohepatologických vyšetření u 296 pacientů Hematoonkologické kliniky, z toho 229 pacientů bylo vyšetřeno poprvé, tj. při stanovení diagnózy he-

matologického onemocnění, u 67 nemocných bylo imunohepatologické vyšetření provedeno již v minulosti. Věkový průměr nemocných činil 56 let (19-89 let), poměr mužů a žen byl 159:137. Metodika: u všech pacientů bylo provedeno kompletní imunohepatologické vyšetření (krevní skupina, Rh a Kell fenotyp, screening nepravidelných tepelných a chladových antierytrocytárních protilátek metodou sloupcové aglutinace DiaMed v nepřímém antiglobulinovém i v enzymovém (papain) testu, v případě pozitivní jejich identifikace, PAT event. jeho rozlišení). Výsledky: Z celkového počtu 324 provedených kompletních imunohepatologických vyšetření byl zcela negativní nález zaznamenán ve 29% případů (94/324), z toho u pacientů s nově diagnostikovaným onemocněním byl negativní výsledek v 33.2% (76/229), zatímco u nemocných s pokročilejším onemocněním byl negativní nález jen v 18.9% případů (18/95). Nejčastějším pozitivním nálezem byl výskyt chladových protilátek, a to celkem ve 212 případech. Nepravidelné tepelné antierytrocytární protilátky byly pozitivní u 37 nemocných, z toho ve 20 případech se jednalo specifickou aloprotilátku (nejčastěji anti-E, a to v 6 případech). Přímý antiglobulinový test byl pozitivní u 50 nemocných. Ve 14 případech byl potvrzen imunohepatologický nález podporující dg. autoimunní hemolytické anémie. Závěr: Hematoonkologická onemocnění mohou být provázána výskytem nepravidelných tepelných či chladových antierytrocytárních protilátek. Provedení kompletního imunohepatologického vyšetření již při stanovení hematologické diagnózy umožňuje zajištění hemoterapie na míru pro každého konkrétního pacienta a výrazně tak snižuje riziko aloimunizace, neboť je známo, že cca 2-3% pacientů vytváří aloprotilátky po expozici antigenům z transfundovaných erytrocytů, a to velmi často již po podání prvních transfuzí.

P26 / 1910.

Úspěšná léčba toxické epidermální nekrolýzy plazmaferézou: 4 případy

Bláha Milan, Košťál Milan, Lánská Miriam, Košťálová Milada, Filip Stanislav, Malý Jaroslav
(II. interní klinika - OKH, Separátorové centrum, Hradec

Králové; Dermatovenerologická klinika, Hradec Králové; Onkologická a radioterapeutická klinika, Hradec Králové)

Úvod: Toxická epidermální nekrolýza – Lyellův syndrom (TEN) je vzácná akutní reakce, pravděpodobně způsobená hypersensitivitou na léky, charakterizovaná extenzivní epidermální nekrolýzou, teplotou a postižením očí i sliznic, se smrtností do 40 % na sepsi a multiorganové selhání. V léčbě je jasné jen vynechání podezřelého léku a komplexní podpůrná péče. Podávají se kortikoidy a intravenosními globulíny (IVIG), ale bez „evidence based“ průkazu profitu. Publikovány byly jen malé soubory nebo kasuistiky s rozpornými výsledky. Některé menší studie prokazují efekt plazmaferézy (PE). Referujeme o úspěšné léčbě 4 nemocných PE. Pacienti a metodika: PE byla použita v případech selhání léčby kortikoidy, IVIG a podpůrné terapie. Plazma byla získávána separátorem Cobe-Spectra a 1 tělesný objem nahrazen 5% albuminem a krystaloidy v poměru 2:1. Základní údaje o nemocných jsou v tabulce. Výsledky: Počet PE byl 5.25 ± 2.22 (range 3 – 8). Intervaly mezi PE: zprvu 1, později 2 - 3 dny. Podezřelou příčinou byly léky ve všech případech. Začátek léčby PE koincidoval se zástavou progresu choroby, poklesem teplot a reepitelizací postižených ploch. Léčba skončila úspěchem (zhojením kůže ad integrum) u všech 4 nemocných. Závěr: PE by měla být alternativní léčebnou metodou v případech těžké TEN, kdy předchozí léčba (včetně kortikoidů a IVIG) není úspěšná. Poděkování: Práce byla podporována grantem IGA NS/9743-4.

P27 / 2047.

Autologní odběry odebrané a aplikované v Přerově v letech 2006-2010

Černá Michaela, Repovský Štefan

(HTO, Středomoravská nemocniční a.s., odštěpný závod Nemocnice, Přerov)

Autologní transfuze znamená podání krve či krevních přípravků odebraných příjemci. Již řadu let se tato možnost využívá u plánovaných chirurgických výkonů. Výhodou je, že nedochází k přenosu alogenních infekcí od dobrovolných dárců krve včetně variantní Jakob-Creutzfeldovy nemoci, současně není inkompatibilita skupino-

Pacient č.	Věk/pohlaví	BMI	Dni hospital. na JIP	Podezřelý lék	% postižení kůže	Sepse	Steroidy/IVIG	Počet PE
1	17/Ž	22.4	51	Biseptol či Rulid	> 90	Ano	Ano/Ano	6
2	58/M	22.7	25	Biseptol	> 90	Ne	Ano/Ne	8
3	25/Ž	20.4	16	Fungicidín či Biseptol	> 80	Ano	Ano/NE	4
4	18/Ž	22.3	9	Augmentin	> 80	Ne	Ano/Ne	3

vých systémů a ani riziko GVHD, je menší imunosuprese, dále jsou nižší ztráty krevní během operace díky „hemodiluci“ před operačním výkonem a dochází k redukci spotřeby alogenních transfuzních přípravků. Je nicméně faktem, že i ani tzv. autotransfuze nejsou zcela bez rizika. Jednak jsou možné nežádoucí účinky během vlastního odběru u většinou starších a polymorbidních pacientů (kolapsové stavy po odběru, hematomy v místě venepunkce), dále nejen při aplikaci alogenních, ale také při aplikaci autologních transfuzních přípravků mohou být potransfuzní reakce (bakteriální kontaminace, febrilní potransfuzní reakce). Dle publikovaných klinických studií se až 40% odebraných autologních odběrů vůbec nepoužije. Cílem naší práce je zjistit trend v počtu odebraných autologních transfuzních přípravků v průběhu posledních 5 let, procento aplikovaných a neaplikovaných transfuzních přípravků a počet pacientů, u kterých pro KI nemohly být autotransfuze odebrány (např. pro anémie, závažné kardiovaskulární nebo jiné onemocnění, probíhající infekce nebo insuficience periferního žilního systému).

TRANSPLANTACE

P28 / 2068.

Availability od stem cell niches for transplanted hematopoietic stem cells after a submyeloablative dose of irradiation

Forgáčová Katarína, Savvulidi Filipp, Michalová Jana, Šefc Luděk, Nečas Emanuel
(Centrum experimentální hematologie a Ústav patologické fyziologie, 1. LF UK, Praha)

A therapeutic bone marrow transplantation (BMT) is usually performed 0-2 days after a conditioning treatment. Our aim was to determine experimentally the „transplantation window“, i.e. for how long after conditioning by irradiation are transplanted hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) able to engraft microenvironmental niches of the recipient. Furthermore, we attempted to correlate closure of the window with presence of numbers of regenerated HSPCs. To determine the duration of the transplantation window, recipients (C57Bl/6 Ly5.2 or congenic Ly5.1 mice) were irradiated by a submyeloablative (4-6 Gy) dose of total body irradiation (TBI) carried out from a ⁶⁰Co source. With a delay from 0 up to 60 days, the mice received a large congenic (Ly5.1 to Ly5.2 recipients and vice versa) transplant corresponding to 1/2 of femoral BM. Chimerism of donor/recipient derived blood cells, resulting from transplanted HSPCs, competing with survived and regenerated HSPCs of recipients, was evaluated from 1 to 6 months after the transplantation in the peripheral blood and also in the BM at the end of examination period. To test the presence of HSPCs in the regenerating BM of sublethally irradiated recipients, their BM cells were co-transplanted with congenic BM from unirradiated mice in a 1:1 or a 10:1 ratio to lethally (9 Gy)

irradiated recipients. Chimerism resulted from co-transplantation of the mixture of regenerated and normal (control) BM was evaluated from 1 to 6 months in the peripheral blood to examine regeneration of both the short-term (STRC) and the long-term (LTRC) repopulating HSCs. HSCs were also determined in regenerating BM by flow cytometry at different times after a sublethal irradiation. BM cells collected from control and sublethally irradiated mice were labelled with antibodies allowing the detection of a subpopulation enriched for HSCs (LSK SLAM or LSK SP cells). Our present results roughly correspond to a mechanistic view of hematopoietic niches – HSC interactions, when the niches need to be “opened” before transplantation by damage delivered to the BM. The transplantation window remains “open” for a substantial time period and its length correlates with recovery of HSPCs and lags after recovery of the BM cellularity. The transplantation window closes despite that absolute numbers of HSPCs do not completely recover.

P29 / 2065.

Hematopoietic stem cells survive in situ ischemia and can serve as a source for BMT

Michalová Jana, Šefc Luděk, Savvulidi Filipp, Forgáčová Katarína, Nečas Emanuel
(Centrum experimentální hematologie a Ústav patologické fyziologie 1. LF UK, Praha)

Hematopoietic stem cells (HSCs) located in stem cell niches are known for their relative resistance to hypoxia. This study is focused primarily on maintenance of the repopulating ability of HSCs exposed to ischemia, resulting in combined lack of oxygen and metabolic substrates and accumulation of metabolic waste products in situ. Effect of ischemia was tested at three different temperatures (37°C, 20°C and 4°C). C57Bl/6 mice Ly5.1/Ly5.2 were used in the experiments. Intact femurs were collected from sacrificed Ly5.1 mice and they were kept in a pre-temperated phosphate buffer solution for different time periods - up to 5 hours, 20 hours and 48 hours at 37°C, 20°C and 4°C, respectively. Bone marrow (BM) cells were then harvested, analyzed for their viability and HSCs percentage via flow cytometry, and were used for a competitive repopulation transplantation assay (BMT). Apoptosis and necrosis of BM cells and LSK cells (LinlowSca-1+c-Kit+; fraction of BM enriched for the HSCs) was determined using Hoechst 33342 and propidium iodide staining. HSCs were detected as a subfraction of LSK cells after labeling with anti-CD48 and anti-CD150 (SLAM markers) antibodies. Furthermore, SP cells (side population) were determined in parallel. Both LSK SLAM and LSK SP cells are highly enriched for HSCs and in the competitive repopulation assay contain long-term repopulating cells (LTRC). BMT was realized in two settings: (I) BM cells from a half femur from Ly5.1 donors was transplanted into congenic Ly5.2 hosts irradiated

ted with a sublethal dose of 6 Gy from a ^{60}Co source; (II) BM cells from a half femur from Ly5.1 donors were mixed with fresh cells from a half femur of Ly5.2 donors and co-transplanted into lethally irradiated Ly5.2 recipients (9 Gy). A chimerism of donor cells was examined up to 6 months after transplantation in the peripheral blood as a measure of the engraftment. HSCs were fully preserved up to 2 hours, 6 hours and 8 hours at 37°C , 20°C and 4°C ischemia, respectively. In concert, LSK population enriched for HSCs presented with a little number of apoptotic and dead cells and numbers of LSK SLAM and LSK SP cells remained as high as in control fresh BM. In conclusion, HSCs survive unfavorable conditions elicited by ischemia (a circulatory arrest) for a considerable time which is significantly prolonged by temperature decreased below 37°C .

P30 / 1933.

Colonization of recipient tissues with transplanted murine bone marrow cells

Filip Stanislav, Mokřý Jaroslav, Vávrová Jiřina, Mičuda Stanislav, Bláha Milan

(Department of Pharmacology, Charles University in Prague, Faculty of Medicine, Hradec Králové; Department of 2nd Internal Medicine, Charles University in Prague, Faculty of Medicine and Teaching Hospital, Hradec Králové)

The whole body irradiation of mice by lethal doses represents a standard model for elimination of endogenous hemopoiesis and demonstration of efficacy of transplantation heterogenous population bone marrow cells - hematopoietic stem cells (HSCs). Animals: B6;129S-Gt(ROSA)26Sor mice obtained from the Jackson Laboratories, USA, were used as donors for B6129SF2/J mice; C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)C14Y01FM 1310sb mice from Riken, Japan, were used as donors for C57BL/6J mice. Recipient animals were exposed to 9.5 Gy of radiation at a dose rate of 1.3 Gy/min. Isolation of CD117+ from bone marrow cells: Bone marrow cells were obtained from femur. These cells were further subjected to positive immunomagnetic sorting with CD117 MicroBeads (Miltenyi Biotec). Transplantation: Recipient animals were transplanted intravenously with lacZ+ cells from the full bone marrow, lacZ+lin-CD117+ or GFP+lin-CD117+ hematopoietic cells. Histochemical detection of cells in tissues after transplantation: The recipients were sacrificed under deep anesthesia on D8, D12, D30 and D70 post transplantation in tissues. Real time RT-PCR analysis: Total RNA was isolated from tissue samples using Qiagen RNeasy® Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and converted into cDNA via Superscript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, USA). The amplification was completed using TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) and made-to-order primers and a FAM-labeled probe (Generi-Biotech,

Czech Republic) for LacZ target gene. As a housekeeping gene Eukaryot 18S rRNA endogenous control kit (P/N4319413E) provided by Applied Biosystems (Foster City, USA) was used. Results: Bone marrow-derived cells after i.v. administration do not necessarily engraft back to the bone marrow. To trace distribution of grafted cells in the recipient organism, we utilized transgenic mice as donors whose cells are tagged to endogenous vectors. Transplantation of lethally irradiated mice with bone marrow-derived cells supports hemopoiesis and leads to colonisation of diverse organs with grafted cells. Engraftment efficiency depends on variety factors including number and type of transplanted cells. Transplanted cells differentiate into hemopoietic cells, lymphocytes, phagocytosing cells and hepatic stellate cells.

P31 / 2053.

Výskyt kmenů Staphylococcus epidermidis se schopností tvorby biofilmu na oddělení 5C Hemato-onkologické kliniky FN Olomouc

Matoušková Ivanka, Sauer Pavel, Kolář Milan, Raida Luděk, Holý Ondřej

(Ústav preventivního lékařství, LF UP, Olomouc; Ústav mikrobiologie, LF UP a FN, Olomouc; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Studie s názvem „Surveillance of Infectious Complications in Hemato-Oncological Patients“ probíhá na oddělení „5C“ Hemato-onkologické kliniky FN Olomouc. Byla zahájena 1. srpna 2010 s předpokládanou dobou ukončení k 31. červenci 2011. V období od 1. srpna 2010 do 31. března 2011 bylo na tomto oddělení hospitalizováno celkem 63 pacientů, z toho bylo 33 pacientů transplantovaných. Ve 21 případech se jednalo o transplantaci autologní, ve zbývajících případech (12) o transplantaci alogenní. V uvedeném období byla sledována mikrobiální kontaminace vybraných povrchů a ovzduší na výše uvedeném oddělení. Současně byla monitorována mikrobiální kontaminace aktuálně přítomného personálu (stěr pravé ruky a vlasů, výtěr z nosu). Z kultivačně prokázaných mikrobiálních agens, jsme se soustředili na výskyt kmenů Staphylococcus epidermidis, u nichž byla testována schopnost formace biofilmu fenotypizační metodou. Získané výsledky z prostředí a od personálu byly porovnány s výskytem kmenů Staphylococcus epidermidis, které byly izolovány z hemokultur pacientů oddělení 5C a rovněž testovány na schopnost tvorby biofilmu. Práce byla podpořena grantem „Surveillance of Infectious Complication in Hemato-Oncological Patients“ – Research Support Foundation, Vaduz (801100021/39).

P32 / 2035.**Cyklosporín a metotrexát versus cyklosporín a mykofenolát mofetil ako prevencia GvHD po myeloablatívnom prípravnom režime BUCY**

Rusiňáková Zuzana, Riada Luděk, Faber Edgar, Vondráková Jana, Indrák Karel

(Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc)

Úvod: Prevencia GvHD u pacientov po alogénnej transplantácii krvotvorných buniek s myeloablatívnym prípravným režimom pomocou cyklosporínu (CyA) a metotrexátu (MTX) predstavuje štandardný liečebný postup. Zámerna mykofenolát mofetilu (MMF) za MTX by mala viesť k zníženiu akútnej toxicity. Metóda: 42 pacientov podstúpilo transplantáciu po prípravnom režime BUCY. Ako prevencia GvHD bola u 15 pacientov použitá kombinácia CyA a MTX, u 27 CyA a MMF. Medián veku v skupine s MTX bol 35 (18-55) rokov. Všetci boli transplantovaní od zhodného príbuzného darcu. 12 pacientov malo diagnózu akútnej leukémie (9xAML, 3xALL), 3 CML. 27 pacientov s mediánom veku 29 rokov (21-50) bolo v skupine s MMF. 11 podstúpilo transplantáciu od príbuzného darcu, 16 od nepríbuzného zhodného darcu. S výnimkou 1 pacienta boli všetci v 1. CR (prípadne v chronickej fáze choroby). Základnou diagnózou bola 15x AML, 8x ALL, 2xCML a 1x NHL. Výsledky: U všetkých hodnotených pacientov došlo k engraftmentu. V prihojení granulocytov i trombocytov a v počte dosiahnutých CR po transplantácii nebol významný rozdiel. Mukozitída III-IVst. sa vyskytla častejšie v skupine s MTX (80% vs. 60%). Venookluzívna choroba pečene akéhokoľvek stupňa sa objavila u 29% pacientov v skupine s MMF a u 40% v skupine s MTX. Akútna GvHD III-IVst. bola diagnostikovaná u 11% pacientov s MMF a 13% s MTX. Extenzívna chronická GvHD bola častejšia v skupine pacientov s MTX (58% vs. 38%), rovnako ako výskyt relapsov choroby (40% vs. 11%). S mediánom sledovania 901 dní žije v skupine s MMF 20 pacientov (74%), došlo k 2 úmrtiam v súvislosti s GvHD a 5 úmrtí bolo zapríčinených infekčnými komplikáciami. Pravdepodobnosť 3-ročného prežitia je 73,5%. V skupine s MTX s mediánom sledovania 311 dní žijú 3 pacienti (20%), príčinou úmrtia bola 5x progresia choroby, 4x GvHD, 2x infekčné komplikácie a 1x subdurálny hematóm. Pravdepodobnosť 3-ročného prežitia je v skupine s MTX 23%. Záver: Pravdepodobne nižšie počty hodnotených pacientov neumožnili potvrdiť významný vplyv použitej prevencie GVHD na potransplantačnú regeneráciu krvotvorby, slizničnú a pečeno-vú toxicitu ani rozvoj GVHD, a to i napriek tendencii k nižšiemu výskytu závažných komplikácií a lepšiemu celkovému prežitiu v skupine s kombináciou CyA a MMF. Podporené grantom LF-2011-006 Univerzity Palackého v Olomouci.

P33 / 1985.**Polyomavírusová BKV hemoragická cystitída po alogénnej transplantácii kmeňových krvotvorných buniek**

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

(Klinika hematológie a transfuziológie LF UK, SZU a UN Bratislava, Nemocnica sv. Cyrila a Metoda Petržalka, Bratislava - SK)

Úvod: Polyomavírusová hemoragická cystitída (PVHC) postihuje 5-15% transplantovaných pacientov najčastejšie v období 3 až 6 týždňov po alogénnej transplantácii kmeňových krvotvorných buniek (TKB). Najčastejším typom ľudského polyomavírusu vyšetreného v súvislosti s PVHC je BK virus (BKV). Predisponujúcimi faktormi rozvoja PVHC sú okrem alogénnej transplantácie aj pokročilý vek v čase TKB, choroba štetu proti hostiteľovi (GvHD), trombocytopenia, koagulopatie a iné vírusové infekcie. Metódy: Vyšetrovanie vzoriek moču a krvi na dôkaz DNA BKV pomocou PCR metódy je na našom pracovisku dostupné od 10/2008. V období od 10/2008 do 12/2010 sa alogénnej TKB podrobilo 49 pacientov, z toho 24 pacientov dostalo štep od zhodného nepríbuzného darcu. Zdrojom krvotvorných buniek boli prevažne periférne kmeňové bunky (44/49 pacientov). Väčšina pacientov dostala štandardnú imunosupresívnu liečbu. U 11 pacientov s klinickými prejavmi cystitídy po TKB (dyzúria, polakizúria a mikroskopická alebo makroskopická hematúria) sme vyšetrovali sérum a moč na prítomnosť BKV po vylúčení iných vírusových a bakteriálnych patogénov. Výsledky: PVHC na podklade BKV infekcie sme dokázali u 8/11 pacientov s cystitídou v rôznom období po TKB: u 6 do dňa 100, u 2 viac ako 100 dní po TKB. Medián času do rozvoja PVHC bol 30,5 (rozsaľ 15 - 240) dní. Všetci pacienti dostali v príprave pred TKB cyklofosfamid; 5 pacientů v kombinácii s celotělovým ožiarením +/- antitymocytový globulín (ATG), 3 pacienti busulfan + ATG. V čase PVHC mali 3/8 pacientov akútnu GvHD II.-IV. stupňa. 3/8 pacientov mali súčasne pozitívitu CMV DNA PCR (z toho 2 s GvHD). 6/8 pacientov bolo liečených ribavirínom, 2 kombináciou intravenózneho imunoglobulínu a valaciklovíru. U 7/8 pacientov došlo ku klinickému zlepšeniu, čas do regresie klinických prejavov cystitídy bol od 28 do 98 (medián 58) dní. K poklesu počtu kópií došlo u 6/8 pacientov (medián 87,5, rozsah 42-169 dní); u 2 pacientov nerealizované ďalšie kontrolné vyšetrovania (1 z nich exitoval). Záver: PVHC v súvislosti s BKV je komplikáciou po TKB, na ktorú je nutné myslieť a diferenciálne diagnosticky ju odlišiť od cystitídy po urotoxickom prípravnom režime a infekcií spôsobených inými patogénmi. Napriek obmedzeným možnostiam liečby je možné dosiahnuť úplnú regresiu nálezu, avšak liečba je dlhodobá a vyžaduje dobrú spoluprácu pacienta.

P34 / 1978.**Plerixafor v rámci prvej a druhej mobilizačnej línie u pacientov s mnohopočetným myelómom – skúsenosti jedného centra**

Zwiewka Michal, Štefániková Zdenka, Masárová Katarína, Martinka Ján, Hrubisko Mikuláš, Pribulová Hana, Hapalová Jolana, Bojtárová Eva, Mistrík Martin
(Klinika hematológie a transfuziológie LF UK, SZU a UNB, Nemocnica sv. Cyrila a Metoda, Bratislava – SK)

Transplantácia periférnych kmeňových buniek (PKB) je z hľadiska dlhodobého prežívania a kvality života (QoL) pre pacientov s mnohopočetným myelómom (MM) jednoznačným benefitom. Zber PKB je však u 15-20% pacientov z dôvodu slabej odpovede na rastový faktor G-CSF neefektívny. Prínosom v súčasných mobilizačných režimoch je plerixafor, ktorý patrí do skupiny exogénnych imunomodulátorov/imunostimulancií. Na základe súčasných poznatkov umožňuje v prípade hematologických malignít nepostihujúcich primárne kostnú dreň problém neefektívnych mobilizácií v 70-80% prípadov riešiť. Plerixafor ako antagonistu receptora CXCR4 zabraňuje väzbe buniek v kostnej dreni a umožňuje ich vyplavenie do periférnej krvi (PK) s následným efektívnym zberom. Na Klinike hematológie a transfuziológie v Bratislave bolo od 06/2009 do 12/2010 s použitím plerixaforu mobilizovaných päť pacientov s MM, z ktorých traja boli remobilizovaní s použitím schémy G-CSF + plerixafor (G+P) po predchádzajúcej neúspešnej mobilizácii a u dvoch bol plerixafor podaný v rámci tzv. „boostu“ pri prvotníovej zlyhávajúcej mobilizácii s Cy + G-CSF (C+G). Obidva postupy umožnili získať dostatočne výťažný produkt (>2x10⁶ CD34+ buniek/kg) pre jednu alebo dve transplantácie. Zlyhanie mobilizácie s použitím plerixaforu sme nezaznamenali. Jedna pacientka bola úspešne odtransplantovaná. Získané produkty sme porovnali s kontrolnou vzorkou produktov od pacientov s MM mobilizovaných bez použitia plerixaforu, a to vyšetrením náterov, imunofenotypu a rastu koloniformných jednotiek (CFU). Vyšetrenia v prípade mobilizácie s plerixaforom potvrdzujú prítomnosť vyššieho podielu buniek kostnej drene v produkte. V prípade autológnych transplantácií možno preto aj pri rovnakej výťažnosti (hodnotenej množstvom CD34+ buniek) transplantátu predpokladať o niečo dlhší engraftment. Z etického hľadiska sa ako vhodnejšie javí použitie plerixaforu už v prvotníovej mobilizácii ak sa táto javí ako zlyhávajúca. Umožní to predchádzať na manažment náročnejšej a pre pacienta potenciálne nebezpečnej (ak plánovaná i chemoterapia) druholníovej mobilizácii.

P35 / 1969.**Monitorovanie rekonstitúcie CMV buněčné imunity u pacientů po alogenní transplantaci kmenových buněk pomocí CMV- tetramer testu**

Tkáčová Vlasta, Veronika Váľková
(Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha)

Důležitou roli v regulaci cytomegalovirové (CMV) infekce hrají CMV specifické, paměťové CD8+ T lymfocyty (CMV CD8+ Tly). K jejich detekci je možné využít CMV specifické tetramery. Naším cílem bylo ověřit vliv sérologického statusu dárce na rekonstituci CMV specifické buněčné imunity u pacientů po alogenní transplantaci kmenových buněk, její ovlivnění léčbou reakce štěpu proti hostiteli (GvHD) a podání antithymocytárního globulinu (ATG). U pacientů po alogenní transplantaci, jejichž dárce byli CMV séropozitivní, byla detekována rekonstituce CMV CD8+ Tly cca 20. den po transplantaci. Další monitorování bylo u 31 pacientů >100 dní po transplantaci. K detekci CMV CD8+ Tly byl použit CMV- tetramer test, který umožňuje stanovení přímo z periferní krve, bez nutnosti izolace lymfocytů. U 5 (45%) pacientů, kteří neprodělali GvHD, byly detekovány CMV CD8+ Tly: průměr 26 b/μl (min. 16 b/μl, max. 44 b/μl). Všichni tito pacienti měli CMV séropozitivního dárce a 80% těchto pacientů bylo podáno ATG. U 6 (55%) pacientů bez GvHD, jejichž dárce byli CMV séronegativní, byly detekovány velmi nízké hladiny CMV CD8+ Tly: průměr 1,6 b/μl (min. 0 b/μl, max. 6 b/μl). 83% těchto pacientů bylo podáno ATG. U 20 (65%) pacientů byla diagnostikována GvHD a byli na ni léčeni. Jejich dárce byli jak séropozitivní, tak séronegativní. U 14 (70%) z těchto pacientů byly detekovány velmi nízké hladiny CMV CD8+ Tly: průměr 0,9 b/μl (min. 0 b/μl, max. 4 b/μl), 57% těchto pacientů bylo podáno ATG. U 6 (30%) pacientů byly detekovány CMV CD8+ Tly: průměr 11 b/μl (min. 7 b/μl, max. 24 b/μl), 50% pacientů bylo podáno ATG. Žádný z výše uvedených pacientů neprodělal CMV nemoc. Naše výsledky potvrdily hypotézu, že CMV sérologický status dárce má vliv na rekonstituci CMV specifické buněčné imunity příjemce. Podání ATG nemá vliv na tuto rekonstituci, ovšem léčba GvHD ji ovlivňuje negativně.

P36 / 1951.**Posouzení koncentrace a viability periferních kmenových buněk před a po separaci systémem AXP**
Prajzlerová Klára, Štěpánková Marika, Beranová Adéla, Trunda Miroslav, Vošahlíková Šárka, Klubal Radek
(Česká genetická banka spol. s r.o., Praha)

ÚVOD: Periferní krev může být stejně jako kostní dřeň a pupečníková krev cenným zdrojem kmenových buněk krvetvorby (HSC), schopných jak vlastní sebeobnovy, tak diferenciaci do krevních elementů a dalších buněčných typů. Tato schopnost pak umožňuje použití HSC při léčbě celé řady onemocnění krvetvorby. Využití periferních kmenových buněk v posledních letech vzrůstá, neboť získávání těchto buněk je pro pacienta v porovnání s odběrem kostní dřene přijatelnější. Jelikož se běžně v periferní krvi vyskytuje relativně málo HSC, může být správné zamražení při práci s nimi zcela zásadní. Naším cílem bylo porovnat počet a viabilitu malých kvantit HSC v průběhu zpracování a zamražení pomocí automatizovaného

separačního systému AXP a zamrazovacího systému BioArchive firmy Thermogenesis. **METODIKA:** Odebrané vzorky periferní krve od zdravých dárců (průměrně 100ml) byly separovány pomocí uzavřeného separačního systému AXP (došlo k odseparování červené krevní řady a plazmy a tím ke zkoncentrování kmenových buněk). Na průtokovém cytometru byla porovnávána viabilita a zastoupení jednotlivých buněčných subpopulací (detekcí CD34, CD45, CD3, CD4, CD8, CD16CD56, CD19) ve vzorku po odběru a po následné separaci. Posléze byly jáderné buňky zamrazeny pomocí automatizovaného zamrazovacího systému BioArchive. V současné době testujeme kvalitu buněk po rozmražení. Na průtokovém cytometru sledujeme jejich počet a životnost a pomocí molekulární genotypizace systémem Illumina (s použitím HumanCytoSNP-12 BeadChip) posuzujeme chromozomální stabilitu buněk prošlých procesem kryoprezervace. **VÝSLEDKY:** Počet CD34+CD45+ buněk ve vzorcích zpracovaných pomocí systému AXP trojnásobně vzrostl. Poměr mezi CD3+, CD4+, CD8+, CD16CD56+, CD19+ buňkami zůstal beze změny. Životnost CD34+CD45+ buněk po separaci pomocí systému AXP zůstala plně zachována. **ZÁVĚR:** Z našich prvních výsledků vyplývá, že separaci pomocí systému AXP lze dosáhnout významného zvýšení koncentrace kmenových buněk při zachování jejich viability.

P37 / 2063.

Identifikace nové HLA alely DRB1*13:116 při vstupním vyšetření členky Registru dárců krvetvorných kmenových buněk

Mrázek František, Onderková Jana, Zachová Silvie, Ambřuzová Zuzana, Petřek Martin
(*HLA laboratoř, Ústav imunologie, Fakultní nemocnice Olomouc & Lékařská fakulta UP, Olomouc*)

Hlavní komplex tkáňové slučitelnosti člověka (HLA, z angl. Human Leukocyte Antigens) charakterizuje vysoká míra polymorfismu; v lednu 2011 bylo popsáno více než 6 tisíc HLA variant. Shoda v HLA znacích mezi dárcem a příjemcem významně ovlivňuje úspěšnost transplantace krvetvorných kmenových buněk. Tato práce popisuje nález nové alely HLA II. třídy, HLA-DRB1*13:116, která byla identifikována při vstupním vyšetření dobrovolné dárkyně – členky Českého národního registru dárců dřeně (ČNRDD). Novou alelu jsme detekovali při rutinní HLA typizaci molekulárně-genetickou technikou (polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery); výsledek typizace neodpovídal žádnému známému genotypu. Vyšetření vzorku jsme proto rozšířili o sekvenční analýzu (SBT, z angl. Sequencing-Based Typing); pro definitivní potvrzení jsme obě HLA alely na lokusu DRB1 oddělili skupinově specifickou amplifikací. Zjistili jsme, že se nová alela liší od již známé varianty DRB1*13:17 záměnou nukleotidu (T/A) v pozici 227 kódující oblasti genu HLA-DRB1. Tato změna je kódující a podmiňuje také změnu v primární

struktúre HLA proteínu (Phe47Tyr). Popsaná nová alela HLA-DRB1*13:116 bude součástí další verze názvosloví HLA systému (vydává Nomenklaturní výbor WHO), databáze ČNRDD byla obohacena o unikátní genotyp dárkyně. Grantová podpora: MSM6198959205 a IGA UP projekt č. LF_2010_008.

P38 / 1921.

Psychosociálne aspekty dobrovoľného darcovstva krvotvorných buniek - skúsenosti Národného registra darcov kostnej drene SR

Slezáková Katarína, Kušíková Mária, Stemnická Denisa, Farkašová Denisa, Mistrík Martin
(*Klinika hematológie a transfuziológie LF UK, SZU a UNB, Bratislava – SK*)

Úvod: Významné pokroky hlavne v oblasti HLA typizácie a podpornej terapii transplantácie krvotvorných buniek umožnili transplantácie od nepríbuzných darcov. Ich počet sa každým rokom zvyšuje, ako aj počet darcov v registroch darcov kostnej drene. Keďže nepríbuzní darcovia nepoznajú príjemcu transplantátu, ich motivácie sú odlišné od súrodeneckých darcov. Darovanie krvotvorných buniek cudziemu pacientovi môže mať dôležitý psychologický vplyv na darcu. Cieľ: Cieľom nášho príspevku je analyzovať psychologické a sociálne aspekty dobrovoľného darcovstva krvotvorných buniek. Na základe zistených výsledkov, by sme chceli zvýšiť nábor nových darcov do registra a zlepšiť komunikáciu medzi registrom a darcami. Materiál a metódy: Retrospektívna analýza súboru dobrovoľných darcov krvotvorných buniek v Národnom registri darcov kostnej drene (NRDKD). Sledovali sme vek, pohlavie, vysokoškolské vzdelanie, súčasné darcovstvo krvi u darcov. Formou dotazníka sme u nových darcov zisťovali najčastejšie spôsoby nábora darcov do registra, ich motivácie ako aj príčiny ich obáv z darovania krvotvorných buniek. Výsledky: Do konca roka 2010 bolo v NRDKD zaregistrovaných 1740 darcov, z toho 53,6% žien. Priemerný vek darcov je 33 rokov. Väčšina darcov je súčasne aj darcami krvi. Vysokoškolské vzdelanie nemalo významný vplyv pri náboře darcov do registra. Z databázy bolo vyradených 12 darcov, z toho 6 kvôli veku. Z NRDKD sme zabezpečili 1 darcu krvotvorných buniek pre pacienta v Nemecku a pre 1 pacientku liečenú na KHaT v Bratislave. V oboch prípadoch išlo o odber periférnych krvotvorných buniek. Najviac darcov sa obáva podávania G-CSF a odboru kostnej drene. O možnosti stať sa darcom krvotvorných buniek sa väčšinou dozvedeli od známych. Ich najčastejšou motiváciou zaradenia do databázy bola túžba pomôcť pacientovi, ktorému sa už vyhľadával darca. Záver: V databáze NRDKD je do konca roka 2010 evidovaných 1740 darcov krvotvorných buniek, z ktorých väčšina je aj darcami krvi. Na základe našich výsledkov by sme chceli optimalizovať spoluprácu s transfuziologickými pracoviskami pri náboře darcov do NRDKD ako aj po-

skytnúť viac informačných materiálov do médií. Potrebné je aj objektívne informovanie darcov o možných nežiadúcich účinkoch G-CSF. Problémom zvyšujúceho sa počtu darcov v registri však ostáva vysoká cena HLA typizácie darcov metódami molekulovej biológie.

P39 / 2062.

Kvantitatívny monitorovani exprese genu WT1 v periférni krvi pred a po alogenni transplantaci kostni dreně u pacientů s akutni myeloidni leukemií vhodný prostředek pro časnu detekci nadcházejícího relapsu onemocnení

Polák Jaroslav, Válková Veronika, Hájková Hana, Vítek Antonín, Marková Markéta, Šálek Cyril, Cetkovský Petr (*Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha*)

Gen WT1 je zvýšeně exprimován u většiny pacientů s akutní myeloidní leukémií při diagnóze. Proto lze využít monitorování exprese genu WT1 v periferní krvi jakožto markéru minimální reziduální nemoci (MRN) po alogenní transplantaci kostní dřeně. Sledováním exprese genu WT1 lze předpovědět nadcházející relaps onemocnění. Kvantitativní exprese genu WT1 byla měřena u 51 pacientů transplantovaných mezi dubnem 2005 a prosincem 2010. Tito pacienti významně zvýšeně expimovali gen WT1 při diagnóze či v relapsu onemocnění. Pro kvantifikaci genu WT1 byl použit protokol doporučený European Leukemia Net založený na kvantifikaci exprese genu WT1 s použitím vysoce senzitivní a specifické polymerázové řetězové reakce (PCR) v reálném čase. Celkem bylo transplantováno v první kompletní remisi 14 pacientů, 16 pacientů bylo transplantováno v první kompletní remisi ale po provedení záchranné terapie (salvage therapy). 15 pacientů bylo transplantováno v druhé kompletní remisi po zaléčení předcházejícího relapsu onemocnění. 5 transplantovaných pacientů bylo rezistentních na léčbu. U všech analyzovaných pacientů byla rovněž kvantifikována exprese genu WT1 před provedením transplantace. Zvýšená exprese genu W1 před transplantací byla spojena se signifikantně horším celkovým přežitím „overall survival“ ($P = 0.0011$) a s horším parametrem přežití bez progresu onemocnění „leukemia free survival“ ($P = 0.0017$). Expresse genu WT1 je proto významným prognostickým faktorem u transplantovaných AML pacientů. Rovněž exprese genu WT1 po transplantaci vysoce signifikantně korelovala s morfoloogickým sledováním, buněčným chimerismem, detekcí MRN s použitím průtokové cytometrie nebo s expresí specifických fúzních genů. U sedmi sledovaných pacientů byl sledován nárůst exprese WT1 – molekulární relaps před nárůstem výše uvedených ostatních markérů MRN s mediánem 0.96 měsíce. Tedy nespecifický marker - gen WT1 slouží jako spolehlivý předpovědatel nadcházejícího relapsu onemocnění u transplantovaných pacientů. Monitorování exprese genu WT1 je nejvhodnější u pacientů transplantovaných v remisi, kde nárůst exprese nad normální hodnoty signalizuje nadcházející relaps s významným předstihem a je

tedy možno tomu přizpůsobit terapii onemocnení. Studie byla podpořena IGA MZ CR grantem: NR 8748-3 a výzkumným projektem MZ 00023736.

PÁTEK 24. ČERVNA 2011

CHRONICKÁ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE

P40 / 2031.

Analýza exprese miR-15a a miR-16-1 u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií

Humplíková Lenka, Kollinerová Soňa, Urbánková Helena, Holzerová Milena, Pikalová Zuzana, Galuszková Dana, Zapletalová Jana, Papajík Tomáš, Divoká Martina, Modrianský Martin, Indrák Karel, Jarošová Marie (*Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc; Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP, Olomouc; Transfúzní oddělení, FN, Olomouc; Ústav lékařské biofyziky, LF UP, Olomouc*)

MicroRNA (miRNA) jsou malé nekódující jednovláčkové řetězce RNA, které se podílejí na post-transkripční regulaci genové exprese. U chronické lymfocytární leukemie (CLL) je nejčastější chromosomovou změnou delece v oblasti 13q14.3, v níž jsou lokalizovány miR-15a a miR-16-1. Tyto miRNA regulují expresi antiapoptotického proteinu Bcl-2. Delece oblasti 13q14.3 vede ke snížení exprese obou miRNA, nadměrné expresi proteinu Bcl-2 a tím ke zvýšené proliferaci aktivitě a narušení apoptózy CLL buněk. Cílem práce bylo zavedení kvantitativního systému Q-RT-PCR pro měření exprese miR-15a a miR-16-1, vyšetření souboru nemocných s diagnózou CLL a vyhodnocení prognostického významu změny exprese obou miRNA. Studovaný soubor zahrnoval 39 pacientů (29 mužů, 10 žen, medián věku v době diagnózy 58,9 let). Nemocní byli vyšetřeni v době diagnózy nebo v průběhu, resp. progresi onemocnění. U všech pacientů byl stanoven mutační stav IgVH genu, hladina exprese proteinu ZAP-70 a zastoupení patologického klonu (CD5+, CD19+, CD23+). Pomocí FISH a arrayCGH byly mapovány delece oblasti 13q14.3. Metodou Q-RT-PCR na bázi technologie TaqMan sond byla měřena hladina exprese miR-15a a miR-16-1. Z celkového počtu 39 pacientů byla metodou FISH nalezena delece 13q14.3 u 31 pacientů. U 18 pacientů byla pozorována monoalelická delece. U 13 pacientů byla nalezena bíalelická delece, která byla u 9 pacientů nalezena společně s monoalelickou delecí 13q14.3. Nebyla prokázána signifikantní závislost mezi normalizovanými hodnotami exprese miR-15a a miR-16-1 a mutačním stavem IgVH genu, hladinou exprese ZAP-70, zastoupením patologického klonu, stádiem onemocnění dle Bineta a celkovým přežíváním. Hodnoty exprese miR-15a a miR-16-1 se lišily, přestože spolu obě miRNA kolokalizují v oblasti 13q14.3. Signifikantně nižší hodnoty exprese miR-15a byly zjištěny u pacientů s bíalelickou delecí 13q14.3 ($p=0,045$). Znač-

ně snížená exprese obou miRNA byla detekována u pacientů s bialelickou delecí pozorovanou ve více než 75 % buněk. Expresní profil miR-15a a miR-16-1 u pacientů bez delecí a s monoalelickou delecí 13q14.3 byl velmi podobný. Výsledky naší pilotní studie ukázaly výrazné snížení exprese miR-15a a miR-16-1 především u skupiny nemocných s vyšším zastoupením bialelické delecí 13q14.3. Rozšíření studie a sledování dalších genomických změn přinese podrobnější informace o prognostickém významu a možném využití pro cílenou léčbu nemocných s CLL. Grantová podpora: LF-2011-006, MSM 6198959205, MSM 6198959216

LABORATORNÍ SEKCE

P41 / 1979.

Kultivace mesenchymových stromálních buněk bez přítomnosti xenogenních proteinů využitelná pro klinické aplikace

Rychtrmocová Hana, Stehlík David, Veselá Romana, Pytlík Robert, Trněný Marek

(1. interní klinika 1. LF UK, Praha a VFN, Praha; Dětská a dospělá ortopedie a traumatologie 2. LF UK a FN Motol, Praha)

Mezenchymové stromální buňky (MSC) jsou fibroblastoidní buňky získané z kostní dřevě kultivací na adherentním povrchu. Významnou vlastností MSC je jejich schopnost diferenciací do adipogenní, chondrogení či osteogenní linie, do vaskulárních buněk či buněk podobných β -buněk pankreatu a neuronům. MSC jsou standardně připravovány v kultivačním médiu s fetálním telecím sérem (FCS) po odstranění neadherujících buněk. Pro získání dostatečného množství buněk vhodných pro klinické užití je potřeba kultury pasážovat, což je časově náročné, neumožňuje kultivaci buněk v uzavřeném prostoru a zvyšuje riziko infekce. Navíc FCS může představovat riziko nežádoucích imunitních reakcí, virových a prionových přenosů nebo senescenci MCS. Standardní protokoly tak nevyhovují kritériím správné laboratorní praxe (GMP) a požadavkům Food and Drug Administration (FDA). Dříve jsme publikovali námi vyvinutou techniku kultivace MSC v médiu schváleném pro klinické užití (CellGroTM) s lidským sérem (LS) a lidskými rekombinantními růstovými faktory (inzulín, L-askorbát, dexamethason, EGF, FGF, PDGF, MCSF) a bez odstraňování neadherentní frakce. To umožňuje bez pasážování a bez výměn kultivačního média během 14 dnů získat dostatek buněk pro in vivo podání. Výborné výsledky přineslo srovnání metody s kultivací v patentovaných komerčně dodávaných uzavřených systémech RoboFlaskTM. Cílem této práce byl další rozvoj kultivační metody směřující k GMP. Testovali jsme vliv absence některých z uvedených suplementů. Dárci MSC byli pacienti s hematologickými onemocněními podstupující rutinní diagnostickou trepanobiopsii. Výsledky - celkový počet získaných adherentních buněk a schop-

nost buněk tvořit kolonie (CFU-F) - jsme vztahovali k buňkám téhož pacienta kultivovaným v médiu s LS a kompletní sadou suplementů. U 7 pacientů jsme postupně odebírali jeden suplement. Přítomnost dexame-tasonu byla nezbytná, proto nebyl v dalších experimentech vynecháván. U dalších 8 pacientů jsme testovali vliv nepřítomnosti dvojice suplementů a následně u 9 pacientů vliv nepřítomnosti 4 nebo 5 suplementů. Ve 100 % případů byl počet kolonií a adherentních buněk oproti kompletně suplementovanému médiu nižší. Zjistili jsme, že absence inzulínu a EGF nemá vliv na počet MSC a CFU-F. Dexamethason, L-askorbát a FGF jsou naopak pro růst buněk a tvorbu kolonií nezbytné. Nepřítomnost PDGF (samotného či v kombinaci s jiným suplementem) často vedla ke spontánní diferenciaci do adipogenní linie. Podpořeno: MSM 0021620808.

P42 / 1968.

Detekce a kvantifikace klinicky důležitých zygomycet ve vzorcích BAL a tkání pomocí real-time PCR

Hrnčířová Kristýna, Lengerová Martina, Kocmanová Iva, Ráčil Zdeněk, Volfová Pavlína, Paloušová Dita, Kalincová Jana, Bejdák Petr, Tošková Martina, Winterová Jana, Weinbergerová Barbora, Rolencová Monika, 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 cílené antimykotické léčby. Významnou úlohu ve zkvalitnění diagnostických postupů hraje rozvoj molekulárně biologických metod. Metody: DNA ze vzorků nativních tkání, tekutiny z bronchoalveolární laváže (BAL) a ze zygomycetových kultur byla izolována pomocí ZR Fungal/Bacterial DNA Kit (Zymo Research, USA). DNA z tkání v parafínových bločcích (FFPE) byla izolována pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Německo). Screening vzorků byl prováděn PCR metodou detekující široké spektrum zygomycet využívající rozlišení jednotlivých druhů pomocí High Resolution Melt (HRM) analýzy. Pro potvrzení HRM výsledků a přesnou kvantifikaci zygomycetové nálože ve vzorku byly navrženy real-time PCR metody využívající primerů a TaqMan MGB sond specifických pro jednotlivé druhy klinicky nejvýznamnějších zygomycet (*Rhizopus* spp. (detekuje druhy *microsporus* a *oryzae*), *Mucor* spp., *Rhizomucor pusillus* a *Absidia corymbifera* (zde dvě metody detekující geneticky odlišné druhy *Lichtheimia corymbifera* a *Mycocladius corymbiferus*)). Výsledky: Specifickými real-time PCR metodami bylo otestováno celkem 63 vzorků BAL a 19 vzorků tkání od hematoonkologických nemocných s podezřením na mykotickou infekci, dříve testovaných screeningovou HRM metodou (z toho 1 vzorek BAL a 8

vzorků tkáně HRM pozitivních). Ze 42 vzorků testovaných na *Rhizopus* spp. byl pozitivní 1 vzorek BAL (1577 kopií/reakci) a 4 vzorky tkáně (průměr 405 475 kopií/r), z 31 vzorků testovaných na *R. pusillus* pak 1 vzorek tkáně (1014 kopií/r). Na *A. corymbifera* bylo testováno celkem 5 vzorků, 2 vzorky tkáně byly pozitivní (průměr 78 946 kopií/r, oba *L. corymbifera*) a 1 slabě pozitivní (314 kopií/r, *M. corymbiferus*). Ze 40 vzorků testovaných na *Mucor* spp. byly u některých zaznamenány pouze hraniční pozitivita ukazující spíše na možnou kontaminaci. Všechny výsledky získané specifickými real-time PCR metodami korespondovaly s výsledky screeningové HRM metody. Závěr: Prezentovaná metodika představuje jednoduchý a časově nenáročný způsob detekce a kvantifikace zygomycetové DNA v klinických vzorcích. Je výborným nástrojem pro potvrzení výsledků získaných screeningovou HRM metodou. Vzhledem k omezeným možnostem v diagnostice invazivních zygomycóz hrají molekulárně-biologické metody velmi významnou roli. Tato práce byla podpořena granty NS10442-3/2009, NS10441-3/2009 a FR-TI2/254.

P43 / 1964.

Standardizované a akreditované postupy v klinické průtokové cytometrii v souladu s normou ČSN EN ISO 15189

Luxová Alena, Tkáčová Vlasta, Feixová Hana, Marinov Iuri

(Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha)

Akreditace a její získání je v současné době ve zdravotnictví stále více důležitějším dlouhodobým procesem poukazujícím na odbornost a kvalitu poskytované zdravotní péče daného zdravotnického zařízení. Jedná se o standardizaci, sledování a vyhodnocování zdravotní péče, standardizaci řídicích a vnitřních procesů a systematické zvyšování úrovně odborné péče. Na našem pracovišti máme v současné době 6 akreditovaných metod. Procesy kontroly kvality, validace/verifikace a akreditace není možno uvažovat samostatně, ale jako jeden provázaný celek. Vysoká kvalita laboratorních vyšetření je zajištěna standardními operačními postupy (SOP), moderní a věrohodnou přístrojovou technologií, používáním certifikovaných souprav. Veškeré prováděné laboratorní testy jsou verifikovány/validovány a je zaveden účinný systém interní a externí kontroly kvality. Mezi důležité prvky osnovy pro tvorbu a přípravu Standardních operačních postupů pro laboratorní vyšetření doporučené pro přípravu klinických laboratoří k akreditaci je mimo jiné povinný bod Charakteristika spolehlivosti. Pod tímto termínem se skrývá relativně široká škála pojmů jako kalibrace a návaznosti, analytické znaky, interference a zkřížené reakce. Naše laboratoř věnovala tomuto celku po mnoha konzultacích s návazností na procesy týkající se validace a verifikace všech akreditovaných metod poměrně dlouhé a slo-

žité přípravy. V této práci uvádíme vybrané významné akreditační požadavky a možná úskalí, která bylo zapotřebí reflektovat v akreditačním procesu při přípravě SOP a verifikačních protokolů pro jednotlivé SOP.

P44 / 1962.

Použití panfungální PCR pro průkaz původce mykotické infekce u galaktomannan pozitivních vzorků BAT a vzorků tkání od hematoonkologických pacientů s podezřením na invazivní mykotickou infekci

Paloušová Dita, Lengerová Martina, Hrnčířová Kristýna, Volfová Pavlína, Kalincová Jana, Bejdák Petr, Ráčil Zdeněk, Kocmanová Iva, Mayer Jiří

(Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematoonkologická klinika LF MU a FN, Brno; Interní hematoonkologická klinika LF MU a FN, Brno; Oddělení klinické mikrobiologie, FN, Brno)

Úvod: Cílem této práce bylo pomocí panfungálních PCR metod otestovat galaktomannan (GM) pozitivní (OD index > 0,5) vzorky tekutiny získané bronchoalveolární laváží (BAT) a vzorky tkáně (nativní nebo fixované v parafínu), u kterých byla real-time PCR, specifická na nejčastějšího původce invazivních mykotických infekcí (*IFD*) *Aspergillus fumigatus*, negativní. Metody: Výchozím materiálem byla DNA izolovaná pomocí ZR Fungal/Bacterial DNA Kitu (Zymo Research, USA) ze vzorků BAT a tkání hematoonkologických pacientů. Fungální DNA byla amplifikována pomocí 3 kvalitativních panfungálních PCR metod cílených do méně konzervované oblasti genu pro ribozomální DNA (rDNA) ITS2 (internal transcribed spacer). PCR produkty byly následně klonovány do vektoru pomocí TA Cloning Kitu (Invitrogen) za vzniku rekombinantních plazmidů. Poté bylo izolováno a následně sekvenováno 10 plazmidů od každého pacienta. Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi z databáze (PubMed) pomocí algoritmu BLAST, na základě čehož byl určen druh mikromycety. Výsledky: Celkem bylo testováno 57 vzorků GM pozitivních BAT od 50 pacientů, 7 vzorků nativních tkání a 4 vzorky tkání fixovaných v parafínu celkem od 7 pacientů s podezřením na *IFD* nebo s histologicky prokázanou mykózou. Nejčastěji byla nalezena DNA nepatogenních, tzv. prostředových plísňí - *Cladosporium* spp. u 50 % vzorků (26 BAT/ 8 tkání) a *Penicillium* spp. u 26 % vzorků (11 BAT/ 1 tkání). Provedením real-time PCR specifické pro daný druh byla u těchto vzorků zjištěna pouze nízká kvantita fungální DNA. U 16 % vzorků (6 BAT/ 2 tkáně) byly nalezeny patogenní druhy vláknitých hub – *Aspergillus flavus*, *A. terreus*, *Rhizopus microsporus* a také poměrně vzácná infekce gastrointestinálního traktu způsobená druhem *Neosartorya pseudofischeri*. U těchto etiologických agens byla pomocí specifických real-time PCR detekována vysoká nálož fungální DNA ve vzorku. Závěr: Panfungální PCR je velmi přínosnou molekulární metodou, která může pomoci odhalit méně běžné druhy mikromycet způsobující

bujících infekce u imunokompromitovaných pacientů. Nicméně, použití nespecifických primerů s sebou nese zvýšené riziko zachycení běžných prostředových plísní, což je u vzorků tkání pravděpodobně způsobeno nestabilní manipulací při odběru, u vzorků BAT je příčinou jejich detekce přirozený výskyt těchto agens v dýchacích cestách. Kvantifikace nálože fungální DNA ve vzorku pomocí real-time PCR umožňuje odlišit kolonizující či kontaminující druhy hub od aktivně probíhající infekce.

P45 / 1961.

Detekce respiračních virů včetně lidského metapneumoviru v tekutině bronchoalveolární laváže a nazofaryngeálních stěrech u hematologických pacientů pomocí molekulárně biologických metod

Volfová Pavlína, Lengerová M., Paloušová D., Bejdák P., Ráčil Z., Winterová J., Tošková M., Hrnčířová K., Weinbergerová B., Mayer J.

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

Úvod: Respirační viry (RV) patří mezi běžně se vyskytující patogeny, které u hematologických pacientů mohou způsobit infekce horních a dolních cest dýchacích se závažným průběhem. Metody: Spektrum RV testovaných na našem pracovišti zahrnuje respiračně syncytiální virus (RSV), parainfluenza virus 1-3 (PIV1-3), adenovirus 1-7 (AD1-7), influenza virus A, B (FLU A, B) a lidský metapneumovirus (HMPV). Výchozím materiálem pro detekci byla RNA izolovaná z tekutiny bronchoalveolární laváže (BAT) a nazofaryngeálních stěrů (NFS) pomocí QIAamp Viral RNA Mini Kitu (Qiagen). Pro detekci RSV, PIV 1-3, AD 1-7 byla optimalizována kvalitativní multiplex reverzně - transkripční PCR metoda (RT-PCR). Vzhledem k předpokládanému limitnímu množství izolované virové RNA byla použita interní kontrola účinnosti izolace a vyloučení přítomnosti inhibitorů - RNA rostlinného původu připravená metodou in vitro transkripcí, která byla amplifikována v multiplex RT PCR Pro detekci a následnou kvantifikaci HMPV, RSV a FLU A, B byly zavedeny kvantitativní real time PCR metody s použitím TaqMan sond. Významného urychlení detekce a kvantifikace RSV a FLU A, B bylo dosaženo použitím TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mixu (Applied Biosystems), který umožňuje provést reverzní transkripci a amplifikaci v jedné reakční směsi ve velmi krátkém čase. Výsledky: V období XII/04 – III/11 jsme analyzovaly 376 vzorků - BAT/NFS (206/170) - získaných od 263 pacientů. Celkem byly detekovány v BAT/NFS následující patogeny: RSV- 25 (12%)/29(17%), PIV 1- 2 (1%)/2(1%), PIV 2 – 1 (0,5%)/4(2%), PIV 3 -14 (7%)/5(3%), AD 1-7 – 1 (0,5%)/1(0,6%), FLU A -17 (8%)/13(8%), FLU B – 2 (1%)/1(0,6%). V 10 případech (5 BAT/5 NFS) byla zjištěna současná koinfekce vzorku několika různými respiračními viry. Ve stejném období bylo retrospektivně otes-

toováno na přítomnost HMPV 174 vzorků -BAT/NFS (69/105) získaných od 114 pacientů - všechny s negativním výsledkem. Závěr: Ačkoliv jsou RV detekovány u hematologických pacientů poměrně často (pozitivita zjištěna u 28% BAT a 29% NFS), pouze u velmi malé části z nich jsou jediným zachyceným nálezem a suspektním vyvolavatelem infekce. Navíc možnosti terapie (s výjimkou FLU a AD) jsou omezené a je používána pouze symptomatická terapie. Výskyt HMPV jsme u testovaných pacientů neprokázali, nebyla tak potvrzena literární data o vysoké frekvenci výskytu této virové infekce mezi hematologickými nemocnými a rutinní vyšetřování není tedy doporučováno.

P46 / 1957.

Quality assessment of internet morphology education project based on virtual microscopy

Faber Edgar, Juránková Jarmila, Lapčíková Anna, Szotkowski Tomáš, Procházka Vít, Vondráková Jana, Papajík Tomáš, Indrák Karel, Kajaba Václav, Bulíková Alena, Hastka Jan, Kačírková Petra, Matýšková Miloslava, Mikulenkova Dana, Mustjoki Satu, Voglová Jaroslava, Zini Gina

(*Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc; OKH FN a LF MU, Brno; Universität Heidelberg, Mannheim – Germany; OKH FNKV, Praha; UHKT, Praha; Helsinki University Central Hospital, Helsinki – Finland; 2. interní klinika-OKH, FN, Hradec Králové; University Sacred Heart, Roma – Italy*)

Background New technologies has expanded education of microscopic morphology on internet. Virtual microscopy has enabled evaluation of whole microscopic smears. Aims To assess the quality of virtual microscopy internet project used for pregraduate education of medical students (www.e-hematologie.cz). Methods 7 experts from the Czech Republic, Finland, Germany and Italy have evaluated the pictures of cells and scans of marrow or blood microscopic smears obtained by CellaVision DM 96 (Sysmex) and dotSlide system (Olympus). Results 94 categories of normal and pathologic cells on 1-5 pictures including special stainings and 58 virtual scans of peripheral blood marrow aspirates in various hematologic conditions were evaluated. Technical quality of pictures was the most frequent finding (comments raised by 3 to 5 experts on proerythroblasts, promyelocytes, immature eosinophiles and basophiles; by 4 experts on quality of special staining). Experts agreed on the need to exchange the provided picture or scan for a new one because of poor selection in these cases of: mastocytes (6 of 7 experts); polymorphocytes (4/7); monoblasts, promonocytes, megakaryoblasts, micromegakaryocytes (3/7). A better selection of scanned smears was suggested by 3 experts in cases of APL, AML with inv16, MDS and acute monoblastic leukemia. Scans more than one case of HCL and CLL should be provided. Conclusions A very good level of agreement between the authors of the project and ex-

ternal auditors was achieved. Modern tools enabling virtual microscopy have been confirmed as excellent or very good for education of morphology (agreement among all experts). Careful selection of the smears and appropriate use of technologies may avoid scans and pictures of inadequate quality. Implementation of unified morphology classification and links to other national and European projects are mandatory to further improve the quality of the project. The use of these ICT tools is nowadays essential for a consensus morphological diagnosis, that is mandatory in those hematological malignancies where the identification and enumeration of abnormal cells still remain mandatory for the diagnosis. Acknowledgement Project was supported by the grant CZ.1.07/2.2.00/07.0294 of ESF and state budget of the Czech Republic through the Operating program Education for Competitiveness provided by the Czech Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic.

P47 / 1947.

Analýza tělních tekutin v hematologické laboratoři

Juráňová Jarmila, Vrbová Olga, Grycová Petra, Slavík Luděk, Lapčíková Anna, Kadlecová Jana
(*Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc*)

Jako tělní tekutiny označujeme cerebrospinální mok (likvor), synoviální a pleurální výpotky, peritoneální a perikardiální výpotky, bronchoalveolární laváže atd. Vyšetření slouží pro rychlou diferenciální diagnostiku. Lékař na podkladě dodaných výsledků může odlišit, zda se jedná o infekci, zánět, krvácení či nádorové onemocnění. Na rychlosti a přesnosti interpretace nálezu závisí často i život nemocného. Mezi laboratorní vyšetření tělních tekutin (TT) patří kromě dalších i cytologické vyšetření standardně prováděné mikroskopicky. Zahrnuje stanovení celkového počtu krevních elementů a specifikaci buněčných typů. Samotné stanovení počtu leukocytů a erytrocytů, které se doposud provádí ve Fuchs-Rosenthalově komůrce, nestačí pro potvrzení či vyloučení diagnózy, ale je východiskem pro rozhodování o potřebě zhotovení cytologických preparátů. Teprve přesné stanovení buněčných typů (cytomorfologické hodnocení buněk) umožní vyslovit diagnostické podezření. Vyšetření je časově náročné a vyžaduje přítomnost specialisty pro cytologii. Nová generace hematologických analyzátorů umožňuje provádět analýzu počtu krevních elementů v TT snadněji. Metoda je validovaná, rychlá a nevyžaduje speciální preanalytickou přípravu ani školení obsluhy. Také stanovení buněčných typů TT je možné provádět na automatech, které digitálně zpracovávají cytologické preparáty pomocí tzv. digitální morfologie. Specialista-cytolog může díky speciálnímu softwaru prohlížet a hodnotit cytologický nález i ze vzdáleného počítače zapojeného v síti a konzultovat nález nejen s lékařem indikujícím vyšetření, ale i s odborníky z jiných vzdálených pracovišť či s experty ze zahraničí. Hovoříme o éře virtuální mikroskopie. V naší pilotní studii bylo vyšetřeno 210 vzorků likvoru od dospělých i dětských pacientů. Stano-

vení počtu leukocytů (buniček) jsme nejprve provedli ve Fuchs-Rosenthalově komůrce a následně na analyzátoru Sysmex XE 5000. Výsledky jsme porovnali a statisticky vyhodnotili. Obě metody se shodují v hodnocení (tj. pozitivní/negativní výsledek) ve 183 případech (tj. 87% shoda). Korelační koeficient $r = 0,716$. Práce byla podpořena projektem CZ.1.07/2.2.00/07.0294, který je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem ČR.

P48 / 1945.

Stanovení minimální reziduální choroby u pacientů s hematoonkologickými onemocněními

Žejšková Lenka, Plachý Radek, Mazal Oldřich, Vydra Jan, Kozák Tomáš, Karas Michal, Koza Vladimír, Horáček Jan, Žák Pavel, Peková Soňa
(*Laboratoř molekulární diagnostiky, Chambon, a.s., člen skupiny Synlab Czech, Praha; Oddělení klinické hematologie, FN Královské Vinohrady, Praha; Hematoonkologické oddělení, FN Plzeň; Oddělení klinické hematologie, FN, Hradec Králové*)

Sledování minimální reziduální nemoci (MRN) je důležitým nástrojem pro stanovení léčebné odpovědi u hematoonkologických pacientů. Metody používané pro stanovení MRN musí splňovat nároky na potřebnou specifitu a senzitivitu. V porovnání s jinými dostupnými laboratorními obory dosahují metody molekulární biologie, především pak kvantitativní PCR v reálném čase, výrazně vyšší senzitivity (řádově 10^{-4} až 10^{-8}), v závislosti na typu molekulárního cíle. V naší laboratoři sledujeme MRN u pacientů s různými diagnózami (ALL, AML, CML, CLL, NHL a MM). To si vyžaduje, aby v době diagnózy byly nalezeny vhodné cíle pro prospektivní sledování MRN. U lymfoproliferativních onemocnění lze s výhodou použít unikátních přestaveb genů pro Ig (tj. IgH, IgL, DH-JH) nebo TCR (TCR δ , TCR β). Tyto cíle poskytují spolehlivý a dostatečně specifický cíl. U řady leukémií lze sledovat rekurentní chromozomální přestavby, které kódují specifické fúzní transkripty (např. PML/RAR α , variantní fúze RAR α , DEK/CAN, AML1/ETO, BCR/ABL, CBF β /MYH11). Kromě těchto aberací lze využít klon-specifických mutací u řady prognostických markerů, asociovaných s leukemiemi (např. mutace v genech NPM1, FLT3, WT1, TP53, MLL, cKIT, CEBP α). Tyto markery představují vhodné cíle pro sledování MRN pokud obsahují delece nebo inzerce v rozsahu alespoň 3-5 nukleotidů. Bodové mutace jsou méně vhodné. Vždy je třeba brát do úvahy, že se v některých případech nejedná o primární mutace, ale o sekundární, které postihují jen část klonu nádorových buněk. Klonální evoluce obecně komplikuje použití molekulárně genetických cílů při sledování MRN. Cílem sdělení bude prezentovat naše zkušenosti s různými markery pro sledování MRN a diskutovat o jejich vhodnosti v rutinní laboratorní praxi.

P49 / 1923.**Duplicitní hematologické malignity - nálezy průtokové cytometrie**

Novák Martin, Pikalová Zuzana, Procházka Vít, Szotkowski Tomáš, Pika Tomáš

(HOK FN, Olomouc; III. INT FN, Olomouc)

Vícečetné zhoubné nádory jsou onemocněním postihujícím 17,4 % mužů a 25,5 % žen v produktivním věku. Na jejich vzniku se podílejí jak vlivy iatrogenní (aktinoterapie, chemoterapie), tak faktory vyplývající z biologické podstaty nádorových onemocnění (fragilita genomu, chromozomální aberace, chybné exprese kompetentních genů, alterace imunity, atd.) Na pracovišti průtokové cytometrie HOK FN Olomouc jsme v letech 2008 – 2011 diagnostikovali 7 případů duplicit hematologických malignit. Jednalo se o 3 případy souběhu CML a B-CLL, 1x MDS a B-CLL, 1 x MDS a B-CLL s pozdější progresí MDS do AML, 1 x mnohotný myelom s B-CLL, 1 x HCL a B-CLL, 1 x AML a Hodgkinův lymfom. Převládající zastoupení B-CLL vyplývá z alterace imunity nemocných a z dlouhého trvání nemoci, kdy dochází ke kumulaci onkogenních stimulů. Cytometrická detekce nádorových duplicit klade vysoké nároky na kvalitu laboratorní práce. Nezbytnou podmínkou je zvládnutí metodiky vícebarevné průtokové cytometrie, která umožňuje odlišení jednotlivých nádorových klonů, vysoká úroveň mezilaboratorní spolupráce i spolupráce klinika a laboratoří. Je nutno mít vždy na paměti, že nalezený nádorový klon nemusí být jediným ve vzorku přítomným. Podpořeno grantem Univerzity Palackého v Olomouci LF-2011-006.

P50 / 1922.**Vliv DMSO na viabilitu štěpu krvetvorných buněk**

Novák Martin, Horáková Lenka, Pikalová Zuzana, Skoumalová Ivana

(HOK FN, Olomouc)

Transplantace krvetvorných buněk zůstává jedinou kurativní strategií v terapii mnoha hematologických malignit. Ne vždy je možno nemocnému podat čerstvý štěp, v takovýchto případech je nezbytná konzervace hlubokým zamražením. Jedním z ukazatelů kvality štěpu je jeho viabilita, tedy procentuální zastoupení živých buněk. K ochraně před destruktivním působením krystalizace vody v buňkách je rutinně používána kryoprotektivní látka dimethylsulfoxid (DMSO), která účinně zabraňuje tvorbě krystalického ledu. Součástí našeho komplexního vyšetření kvality štěpu je i stanovení viability, které provádíme pomocí průtokové cytometrie za použití interkalantního barviva 7-AAD. 7-amino aktinomycin neprochází membránou živých buněk, umožňuje tedy selektivní stanovení buněk mrtvých. V našem sledování jsme porovnávali viabilitu čerstvého štěpu bez konzervačních přísad okamžitě po ukončení separace se vzorkem chráněným kryoprotektivní směsí zamraženém v programovaném zamrazovači Ice-Cube na teplotu -120°C a následně uloženém na 24 hodin v kontejneru s tekutým dusíkem

při teplotě -196°C. Viabilita čerstvého štěpu byla signifikantně vyšší (medián 98,05 %; n = 23) než viabilita štěpu po kryoprotekci a 24 hodinovém zamražení (medián 69,1 %; n = 23). Dalším sledováním dlouhodobě zamraženého štěpu již nebyl zjištěn signifikantní pokles viability. Kryoprotektivum DMSO zjevně snižuje viabilitu štěpu krvetvorných buněk. Zásadní otázkou našeho dalšího výzkumu zůstává přesná identifikace mrtvých buněk, respektive stanovení viability nikoli štěpu jako celku, ale především CD34 pozitivních progenitorových buněk. Předběžné výsledky totiž nasvědčují tomu, že odolnost CD34 pozitivních buněk vůči toxickému působení kryoprotektiv je ve srovnání s ostatními buňkami výrazně vyšší, což odpovídá dlouhodobým klinickým zkušenostem s úspěšnými transplantacemi zamrazovaných štěpů chráněných DMSO. Podpořeno grantem Univerzity Palackého v Olomouci LF-2011-006.

P51 / 1884.**Morfologie periférnej krvi a pre-analytická fáza**

Lipšic Tomáš

(Klinika laboratornej medicíny, HTO – OÚSA, Bratislava – SK)

S rozvojom progresívnych technológií sa zabúdalo stále viac, že predmeton spracovania/analýzy je biologický materiál a stav vzorky je primárny a rozhodujúci pre správnu analýzu a hodnotenie. In vitro vyšetrenia spracúvajú vzorku "vyňatú" z prirodzeného prostredia a v novom prostredí je vystavená množstvu "nefyziologických" vplyvov. Dlhé roky sa predpokladalo, že ak sú krvný obraz/morfológia periférnej krvi rutinne vyšetrené do 3-4 hodín po odbere vzorky a sú transportované/skladované pri teplote 20-22°C – nedochádza k významnej zmene kvantity a kvality hodnotených parametrov. Dokonca tiež sa tradovalo, že časový faktor až do limitu 24 hodín nie je rozhodujúci pre obdržanie relevantných hodnôt hematologického vyšetrenia periférnej krvi. Ukázalo sa že predpoklady, ako aj pôvodná logistika už nie sú pravdou a realitou ani pre analyzátorové vyšetrenia, ale menovite pre vyšetrenia morfológické. V posledných rokoch centralizácia klinických laboratórií (CoreLab) dramaticky zmenila logistiku a teda čas medzi odberom vzorky a jej numerickým aj morfológickým vyšetrením, ako aj podmienky transportu/skladovania vzoriek. Značná časť vzoriek je transportovaná v dlhších časových intervaloch alebo aj na dlhé vzdialenosti. Takáto pre-analytická fáza, pokiaľ nie je adekvátne limitovaná a je bez kontroly teploty prostredia/vzoriek spôsobuje zmeny a poškodenie buniek a následne znehodnocuje výsledky analýz. Obvyklé zmeny morfológie spôsobené časovou/teplotnou expozíciou (pri 20°C): Erytrocyty: makrocytóza, sférocytóza, poikilocyty, schistocyty, krenované bunky. Leukocyty všeobecne: kondenzácia a fragmentácia chromatinu, lobulácia jadier, tenké/dlhé interlobárne mostíčky, fragmentácia cytoplazmy. Granulocyty: zväčšenie, porucha membrány, degranulácia, vakuolizácia, apoptóza. Trombocy-

ty: degranulácia, makro-Tr, nízké hodnotenie Zmeny spôsobené dlhým alebo nesprávnym skladovaním/transportom vzoriek krvi môže potencovať už prítomná patológia buniek (a naopak) a môžu viesť tak k numerickým ako aj morfológickým výrazným artefaktom a následne k nesprávnym údajom/analýzám. To môže byť príčinou nespoľahlivých výsledkov, interferencií s klinickou diagnózou, poškodenia pacienta a v konečnom dôsledku aj zvýšenia nákladov na zdravotnú starostlivosť. Jednoznačne sa nastoľuje potreba štandardizovať pre-analytickú fázu pre hematologické vyšetrenia periférnej krvi a stanovit' limity pre ich transport/skladovanie.

MNOHOČETNÝ MYELOM

P52 / 2080.

Prognostický význam morfológického hodnotení nádorových buniek u mnohočetného myelomu

Al-sahmani Mohammed, Trnavská Irena, Antošová Monika, Antošová Libuše, Kissová Jarmila, Kaiserová Petra, Adam Zdeněk, Buliková Alena, Penka Miroslav, Hájek Roman

(Laborať experimentálnej hematológie a bunčnej imunoterapie, Oddelení klinickej hematológie, Fakultní nemocnice, Brno; Babákové výzkumné centrum - Česká myelomová skupina, ILBIT, LF MU, Brno; Interní hematologická klinika, FN Brno a LF MU, Brno; Oddelení klinickej hematológie, FN, Brno)

Materiál a metódy: Do analýzy boli zařazené dvě skupiny nemocných s MM. První skupinu tvořilo 45 nově diagnostikovaných nemocných s MM., kteří podstoupili primoléčbu thalidomidem (skupina T). Druhou skupinu nemocných zahrnovalo 86 nemocných v prvním relapsu MM bez autologní transplantace kostní dřeně, kteří byli léčeni protokoly s thalidomidem a bortezomibem (Velcade) v různých kombinacích (skupina B). Bylo hodnoceno procentuální zastoupení podtypů PB v kostní dřeni na základě progresivní analýzy nukleolu, chromatinu a nukleocelulárního poměru (N/C). Kombinace těchto tří prvků vytváří osm podtypů P000-P111 a čtyři subklasifikace plazmatických buněk. Výsledky: Zralé PB (P000, P001) byly nalezeny u 53,3 % (sk.T) a 53,5 % (sk.B) nemocných; proplazmocyty I (P010, P011, P100) u 22,2 % (sk.T) a 24,4 % (sk.B) nemocných; proplazmocyty II (P101, P110) u 22,2 % (sk.T) a 22,1 % (sk.B) nemocných a plazmablasty P111 u 1,0 % (sk.T) a 0 % (sk. B). Nemocní podstupující primoléčbou mají statisticky významný vztah mezi proplazmocyty II P110 a celkovou léčebnou odpovědí ($p = 0,033$) Nemocní skupiny B s hodnotou zralých PB P000 pod 10 % má mnohem kratší medián přežití oproti ostatním skupinám při rozdělení dle kvartilů (37,7 měsíců vs. 62,9 měsíců vs. 89,8 měsíců a vs. 88,8 měsíců; $p = 0,044$). Podobně byl rozdíl při analýze zralých BP P001 při rozdělení dle tercilů (medián 39,2 měsíců, 69,5 měsíců a 89,3 měsíců; $p=0,032$). Nemocní s vyšší infiltrací proplazmocyty I P010 než medián 15 %

měli kratší přežití (medián OS 50,3 měsíců vs. 74,9 měsíců; $p=0,024$) a totéž platilo pro hodnocení proplazmocyty II P110 (medián OS 41,3 měsíců vs. 74,9 měsíců; $p=0,011$). Korelace skupiny nemocných (sk.T) ve 3. stádiu dle ISS ve srovnání s 1. a 2. stádiem dle ISS vykazuje trend, kdy byly nalezeny vyšší hodnoty proplazmocyty II P110 (medián 22,0 vs. 13,0; $p = 0,055$). Závěr: Morfológické hodnotení nebo spíše číselné hodnotení plazmatických buněk v kostní dřeni stále zůstává základním diagnostickým kritériem MM i v době genomických, proteomických a cytomických analýz. Přesnější morfológické hodnotení 8 subtypů plazmatických buněk v kostní dřeni přináší významné prognostické informace a jsou nezbytné pro zpracování protokolů s použitím imunomodulačních a inhibitorů proteasomu léků a díky níž byla již dříve prokázána statistická významnost v éře konvenční chemoterapie a autologních transplantace. Podpořeno projekty: MSM0021622434, LC06027, NS10387, NS10408 a NS10406.

P53 / 1999.

Analýza fenotypu plazmocyty a korelace s cytogenetickými a morfológickými nálezy u mnohočetného myelomu

Kovářová Lucie, Suská Renata, Al-Sahmani Mohamed, Varmužová Tamara, Zarbochová Pavla, Grešlíková Henrieta, Němec Pavel, Burešová Ivana, Kupská Renata, Mut-hu Raja Karthick Raja, Štossová Jana, Mikulášová Aneta, Kuglík Petr, Penka Miroslav, Hájek Roman
(Oddelení klinickej hematológie, FN, PMDV, Brno; Interní hematologická klinika, FN, PMDV, Brno; Babákové výzkumný institut, LF MU, Brno)

Úvod Mnohočetný myelom (MM) je charakterizován přítomností maligních plazmocyty (PC), které jsou fenotypově velmi různorodé. Fenotyp PC může odpovídat přítomnosti určitých genetických abnormalit a/nebo morfológických podtypů, což znamená, že exprese vybraných markerů by mohla souviset s prognózou pacienta. Cíl Analýza vztahu mezi antigenním profilem, cytogenetickými aberacemi a morfológií PC u pacientů s MM. Pacienti a metódy Bylo analyzováno 134 nově diagnostikovaných neléčených pacientů s MM, medián věku 67 let (38-88). PC byly průtokovou cytometrií identifikovány jako CD38+CD138+ buňky kostní dřeně a na těchto byla dále studována exprese znaků CD19, CD20, CD27, CD28, CD56 a CD117. V rámci separovaných PC byly pomocí interfázni fluorescenční in situ hybridizace (FISH) analyzovány del(13)(q14), del(17)(p13), IGH disrupce, t(4;14)(p16.3;q32), zisk 1q21 a hyperdiploidie. Morfológická analýza subtypů PC byla založena na progresivní analýze jádra, jaderného chromatinu a poměru jádro/cytoplazma (N/C). Výsledky Medián PC byl 15,5% (0,1-80,4). Klonální CD19+ PC byly nalezeny u 1 pacienta s del (13)(q14), zatímco exprese CD56 byla zjištěna u 79,1% (106/134) pacientů a korelovala s nižší expresí CD20 a CD28

($p < 0,001$). CD56+ PC odpovídaly častěji proplazmocy-
tům typu II a naopak CD56- PC většinou odpovídaly vy-
zrálejšími formám plazmocy-
tů. Expresí CD20 na PC by-
la nalezena u 8,2% (11/134) pacientů a významně ko-
relovala s vyšší expresí CD28, CD117 a nižší expresí
CD56. PC exprimující CD20 byly překvapivě vyzrálej-
ší než CD20- PC. Pacienti s vyšším zastoupením CD56+
PC méně exprimovali znak CD27 ($p < 0,001$) a naopak
CD27+ PC odpovídaly zralejšími formám plazmocy-
tů. Expresí CD28 na PC byla nalezena u 24,6% (33/134)
pacientů a korelovala s expresí CD20. Nepřítomnost
CD28 na PC korelovala s nálezem proplazmocy-
tů I a II typu častěji než u CD28+ PC. Přítomnost CD117+ PC
byla zjištěna u 31,3% (42/134) pacientů a korelovala
s hyperdiploidií [41,0% vs. 0,0%, $p < 0,05$], naopak chy-
bění CD117 na PC odpovídalo del(13)(q14) [34,0% vs.
1,2%, $p < 0,01$]. Shrnutí/Závěr Plazmatické buňky jsou
velmi různorodé, co se týče fenotypového, cytogenetic-
kého a morfolo-
gického profilu. Ukazuje se, že znak
CD117 (resp. jeho pozitivita a/nebo negativita) je jedi-
ným ukazatelem odpovídajícím chromozomální abnor-
malitě, zatímco jednoznačná spojitost s morfolo-
gií pro-
kázána nebyla. Podpořeno GAČR 301/09/P457, MŠMT
LC06027, MSM0021622434, IGA 10408-3, IGA 10406-
3, IGA 10207-3 a GAČR P304/10/1395 granty.

P54 / 1974.

Přínos projektu časného záchytu mnohočetného myelomu – Projekt CRAB

Straub Jan, Špička Ivan

(I. interní klinika - klinika hematologie VFN a I.LF-UK,
Praha; Česká myelomová skupina)

Mnohočetný myelom patří mezi nemoci s velmi vari-
abilními iniciačními projevy. Svoji incidencí cca 4 paci-
enti/100.000 obyvatel se řadí mezi vzácná onemocnění.
Iniciální projevy mnohočetného myelomu přivádí většinu
pacientů do ambulancí jak praktických lékařů, tak dal-
ších specialistů z řad neurologů, ortopedů, fyzioterapeu-
tů, nefrologů, či revmatologů. Přestože léčebné výsledky
se díky moderní léčbě u MM stále zlepšují, stále je zásad-
ním faktorem včasnost diagnózy. Toto platí zejména ve
vztahu ke kvalitě života těchto nemocných. Díky včasné
diagnóze lze předejít irreverzibilním komplikacím neuro-
logickým, renálním či kostním. Průzkum prováděný v ČR
v roce 2007 prokázal, že až 39% pacientů bylo odesláno
k hematologovi pozdě, 21% mělo neurologický deficit,
37% patologickou frakturu a 8% bylo při diagnóze MM
v dialyzačním programu pro renální selhání na podkladě
myelomové ledviny. Proto Česká myelomová skupina vy-
tvořila edukační projekt cílený na lékaře primárního kon-
taktu s cílem tuto situaci zlepšit. V letech 2007 – 2010
proběhla rozsáhlá edukační kampaň formou seminářů,
přednášek na kongresech, či e-learningových prezentací.
V roce 2010 probíhala v ČR druhá vlna šetření včasnos-
ti záchytu MM pomocí patientských dotazníků s násled-
ným lékařským vyhodnocením. Celkem bude vyhodno-

ceno cca 160 dotazníků nemocných s nově diagnostiko-
vaným myelomem v roce 2010. V době zaslání abstrak-
tu probíhá analýza. Finální výsledky budou prezentová-
ny formou posteru se srovnáním výsledků z roku 2007.

P55 / 1966.

Detection of new protein alterations in human B-lymphoblastoid cell line ARH-77 after bortezomib treatment

Potáčková Anna, Štossová Jana, Zahradová Lenka, Zao-
ralová Romana, Burešová Ivana, Zdráhal Zbyněk, Hájek
Roman

(Babákův výzkumný institut, Lékařská fakulta, MU, Brno;
Interní hematologická klinika FN, Brno; Oddělení
funkční genomiky a proteomiky, Ústav experimentální bi-
ologie, PřF MU, Brno)

Targeting the ubiquitin-proteasome pathway with pro-
teasome inhibitor bortezomib has emerged as a promising
approach for treatment of several malignancies. To app-
roach complex mechanisms of apoptosis and cell death,
we performed a proteomic screen using combination of
two dimensional gel electrophoresis and tandem mass
spectrometry to evaluate the protein determinants that
confer sensitivity to bortezomib (Velcade®). Due to the
importance of proteasome in multiple cellular processes,
activation or inhibition of the proteasome is expected to
affect many vital cellular functions. We have identified
a number of protein alterations that belong to multiple ce-
llular pathways mainly orchestrating programmed cell de-
ath in ARH-77 cells after bortezomib treatment: Borte-
zomib significantly decreased levels of proteins involved
in proteasome degradation process and in protein and nu-
cleotide synthesis, including Ki nuclear autoantigen, gua-
nine monophosphate synthetase and lysyl-tRNA synthe-
tase. We observed also downregulation of L-lactate de-
hydrogenase, Cu/Zn-superoxide dismutase and expressi-
on increase of glycerol-3-phosphate dehydrogenase - spe-
cific aspects of altered mitochondrial homeostasis and ly-
sosomal-mediated degradation of mitochondria. Mito-
chondrial impairment is associated with increased produc-
tion of reactive oxygen species and oxidative damage of
cell. Bortezomib also affects other cellular processes, such
as regulation of protein stability, response to stress stimu-
li (heat shock proteins) and cytoskeletal structure (actins).
Many of identified proteins in this study have not been
reported in direct connection with bortezomib treatment
yet. On the other hand, the summary outcome resulting
from the known biological functions of these proteins cor-
relates with the data published in earlier studies and pro-
posed mechanism of bortezomib. This work was suppor-
ted by grants of The Ministry of Education, Youth and
Sports: LC06027, MSM0021622434 and by the IGA pro-
ject of Ministry of Health of the Czech Republic
NS10408, NS10387.

P56 / 1955.**Nestin – prognostický a myelom-specifický marker pro mnohočetný myelom?**

Šváchová Hana, Pour Luděk, Kovářová Lucie, Zaoralová Romana, Štossová Jana, Sáblíková Barbora, Mužíková Jana, Hájek Roman

(*Babákův výzkumný institut, Lékařská fakulta MU, Brno; Interní hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Brno; Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice, Brno*)

Úvod: Protein nestin je považován za charakteristický marker multipotentních prekurzorů přítomných v embryonálních a fetálních tkáních. Expres nestinu byla detekována v mnoha solidních nádorech a je považována za vhodný diagnostický a prognostický ukazatel malignity a potenciální marker nádorových kmenových buněk solidních nádorů. V naší předchozí práci jsme jako první detekovali protein nestin ve zralých CD138+38+ plazmatických buňkách (PC) mnohočetného myelomu (MM). Statistická analýza prokázala signifikantní rozdíly mezi pacienty s MM a kontrolní skupinou. Tyto pilotní výsledky naznačují, že nestin nepochybně zasluhuje naši pozornost a objasnění jeho role v patogenezi MM. Cílem této práce bylo analyzovat vztah mezi expresí nestinu v CD138+38+PC a přítomností cytogenetických abnormalit v CD138+PC. Podcílem práce bylo ověřit roli nestinu jako možného myelom-specifického markeru CD138+PC u MM. Metody: Do analýzy bylo zařazeno 68 pacientů s MM (35M/33Ž; median věku 68 let). Mononukleární buňky kostní dřeně (KDMNC) byly analyzovány pomocí 3-barevné průtokové cytometrie. Expres nestinu byla hodnocena jako procento nestin-positivních PC (%Nes+PC) a pomocí medianu fluorescenční intenzity (MFI). Přítomnost cytogenetických aberací – del(13q14), del(17p53), IgH disrupce, zisk 1q21 a hyperdiploidie (HY) – byla hodnocena metodou interfázni FISH. Rozdíly v expresi nestinu mezi pacienty s/bez cytogenetické aberace byly hodnoceny neparametrickým Mann-Whitney testem. Kvalitativní hodnocení exprese nestinu bylo provedeno metodou western blot u 7 pacientů v CD138+PC a CD138-KDMNC. Výsledky: Flowcytometrie: pacienti s MM měli medián % Nes+PC 27.6% (rozsah, 0.0%-98.9%) a medián MFI 4.2 (rozsah, 1.8-86.7). Statistická analýza prokázala signifikantní rozdíly v %Nes+PC ($p < 0.001$) a MFI ($p < 0.001$) mezi skupinami 1q21-positivní a 1q21-negativní ($p < 0.001$), a v MFI ($p = 0.014$) mezi skupinami HY-positivní a HY-negativní. Western blot: exprese nestinu byla potvrzena u 7 vzorků v CD138+PC a vyloučena v CD138-KDMNC. Závěr: Výsledky naší práce prokázaly, že vysoké procento Nes+PC i hladiny nestinu jsou asociovány se ziskem 1q21, naopak nízké hladiny nestinu byla spojena s hyperdiploidií. Expres nestinu nebyla prokázána v CD138-frakci KDMNC. Tyto výsledky indikují, že nestin by se mohl stát novým prognostickým parametrem asociovaným s nepříznivou prognózou a specifickým markerem CD138+PC u MM. Grantová podpora: MŠMT ČR LC06027, MSM002-1622434; GAČR P304/10/1395; IGA NS10406, NS10207.

P57 / 1935.**Vybrané jednonukleotidové polymorfizmy spojené s rizikem vzniku žilní tromboembolie u pacientů s mnohočetným myelomem léčených thalidomidem**

Almáši Martina, Ševčíková Sabina, Slabý Ondřej, Kaiserová Petra, Maisnar Vladimír, Penka Miroslav, Pika Tomáš, Pour Luděk, Radocha Jakub, Ščudla Vlastimil, Šváchová Hana, Hájek Roman

(*Babákův výzkumný institut, LF, MU, Brno; 2. Interní klinika - oddělení klinické hematologie, FN, Hradec Králové; Oddělení klinické hematologie, FN, Brno; III. interní klinika - nefrologická, revmatologická a endokrinologická, FN, Olomouc; Interní hematoonkologická klinika, FN, Brno; Interní hematoonkologická klinika, FN, Brno; LEHABI, oddělení klinické hematologie, FN, Brno*)

Úvod: Častým vedlejším účinkem léčby thalidomidem u nemocných s mnohočetným myelomem (MM) je žilní tromboembolie (VTE). V naší retrospektivní studii jsme analyzovali kandidátní jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs) - C1NP (rs7011), CETP (rs289747), ALDH1A1 (rs610529), CDKN1A (rs3829963), GAN (rs2608555), ALDH1A1 (rs168351) a VEGF (rs699947), které byly identifikovány ve velké celogenomové asociační studii, do které byly kandidátní SNPs vybrány na základě projektu „Bank On A Cure“ (3404 SNPs). Autoři této studie vytvořili klasifikační strom sestavený z těchto polymorfizmů k předpovědi rizika vzniku VTE u MM pacientů, léčených thalidomidem. Metody: Genomová DNA byla izolována z periferní krve pomocí MagNA Pure DNA izolátoru (Roche). Genotypy těchto polymorfizmů byly testovány pomocí TaqMan real-time PCR alelické diskriminace u 111 nemocných s MM (58 žen / 53 mužů). Všichni nemocní byli léčeni thalidomidem, přičemž 85,6 % (95/111) bylo léčeno režimem CTD (cyklofosamid, thalidomid, dexame-tazon), u všech byla podávána trombo-profylaxe nízkomolekulárními hepariny (LMWHs). Hardy-Weinbergova rovnováha (HWE), 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. Výsledky: Nepotvrdili jsme schopnost klasifikačního stromu předpovědět riziko VTE na našem souboru nemocných, do kterého bylo zařazeno 19 % (21/111) nemocných s trombózou léčených v centrech České myelomové skupiny – FN Brno, Olomouc a Hradec Králové. Nicméně u nemocných s trombózou jsme našli statisticky významně vyšší frekvenci genotypu AC v genu CDKN1A (42.9 % vs. 16.7 %; ORs=3.64) v porovnání s genotypem CC ($p = 0.015$). Nemocní s kombinovaným genotypem AG plus GG v genu CETP měli 2,73 krát (95%CI: 0,91-8,13) vyšší riziko vzniku VTE než nemocní s genotypem AA, tyto výsledky, stejně jako polymorfizmy ostatních genů, věk a pohlaví pacientů neměly statisticky významný vliv na riziko vzniku VTE. Závěr: Další studium genetických polymorfizmů spojených s výskytem trombózy může napomoci k efektivnějším a racionálnějším profylaktickým opatřením této

komplikace léčby u pacientů s MM. Podporováno: LC06027, MSMT0021622434, NT11154

P58 / 1905.

Modifikované dávkovanie režimu VMP (bortezomib+melfalan+prednizón) u pacientov s mnohopočetným myelómom (MM)

Masárová Katarína, Mistrík Martin

(Klinika hematológie a transfuziológie, Univerzitná nemocnica, Bratislava – SK)

Cieľ: stanoviť účinnosť a bezpečnosť modifikovaného režimu VMP (Velcade + Melfalan + prednizón), s podaním bortezomibu 1x týždenne u pacientov s MM nevhodných na transplantáciu. Metódy: podľa SPC sa bortezomid v režime VMP podáva v dávke 1,3 mg/m² v prvých 4 cykloch 2x týždenne a v nasledujúcich 5 cykloch 1x týždenne počas 9 šesťtýždňových cyklov. VMP režim dosiahol ORR 71%, CR 30%, PR 41%. V roku 2008 bola publikovaná štúdia s modifikovaným podávaním bortezomibu v režime VMP, ktorý sa podával počas 9 päťtýždňových cyklov v dávke 1,3 mg/m² 1x týždenne. Pri tejto zmene účinnosť zostala zachovaná (ORR 81%, CR 21%), avšak výskyt nežiadúcich účinkov sa výrazne znížil: polyneuropatia (PN) ^{3/4} z 13% na 2=, počet prerušení liečby bol 10%. Publikované výsledky nás viedli k podávaniu VMP režimu v päťtýždňových cykloch s podaním bortezomibu. 1x týždenne (1,3mg/m² v deň 1, 8, 15, 22), melfalanu 9mg/m² a prednizónu 60 mg/m² v dňoch 1-4. Výsledky: od apríla 2009 sme zozbierali súbor 30 pacientov, medián línií predchádzajúcej liečby 3. V súčasnosti hodnotíme 25 pacientov, ktorí absolvovali minimálne 4 cykly liečby. Dosiahnuté výsledky: ORR 58%, CR 29%, PR 29%. Nezaznamenali sme PN ^{3/4} stupňa, hematologickú toxicitu ^{3/4} stupňa, či predčasné ukončenie liečby kvôli nežiadúcim účinkom. Medián počtu podaných cyklov bol 8, priemer 6,9. Záver: Na základe našich skúseností môžeme potvrdiť účinnosť modifikovaného dávkovania VMP režimu u MM pacientov nevhodných na transplantáciu pri minimalizácii nežiadúcich účinkov ^{3/4} stupňa a prerušenia liečby.

P59 / 1976.

Cast nephropathy and acute renal failure - recovery of renal function with bortezomib based therapy and Theralite® membrane hemodialysis.

Špička Ivan, Polakovič V., Švára F., Straub J., Trněný M., Lopot F.

(1st Medical Department – Clinical Department of Haematology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General Teaching Hospital. Prague; Department of Nephrology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital, Prague)

Up to 50% of newly diagnosed multiple myeloma (MM) patients can present with renal insufficiency, 20%

with severe renal impairment and 10% requiring dialysis. Bortezomib with high-dose dexamethasone is considered as the treatment of choice for such patients. Moreover, extended hemodialysis using a high cut-off dialyzer (HCO-HD) is a novel method which removes large quantities of free light chains in patients with multiple myeloma. This is the first report of the effect of the combination of chemotherapy and HCO-HD on serum free light chain concentrations and renal recovery in patients with myeloma kidney (cast nephropathy) and dialysis-dependent acute renal failure in Czech republic. Case report: 50 year old woman was diagnosed with multiple myeloma (MM) with a severe renal insufficiency. She was started on therapy by Velcade® + dexamethasone per established protocol, planned for 4 cycles, finished by autologous stem cell transplantation. Within one week her kidney function crashed - she developed uremic symptoms and blood biochemistry showed progression to renal failure (urea 55 mmol/l, Cr 968 umol/l). Urgent HD was started but she remained oligo-anuric for next several weeks. High free light chain kappa (FLC-κ) concentration was detected (1352.5 mg/l, normal range 3.3-19.4), suggesting negative impact of light chain production on worsening of her kidney function. In this setting, we decided to introduce Theralite® dialysers (Gambro Dialysers GmbH, Hechingen, Germany) to facilitate free light chain removal to restore renal function, if possible. She was dialysed 3 times a week (6-6-5 hours), the Velcade® administration was scheduled always shortly after her HD to minimize drug removal. Her chemotherapy course was uncomplicated and since the 2.cycle 50 mg of cyclophosphamide daily was added to increase suppression of light chain production. After a month of this combined therapy patient started to restore significant diuresis and slowly increasing renal function. After 15 weeks of combined chemotherapy + Theralite® membrane HD, her kidney function reached Crr 0,32 ml/s (19,2 ml/min) and we were able to stop renal replacement therapy. In this case, decrease in serum FLC-@ concentrations and recovery of renal function is likely to be a combined effect of both chemotherapy and Theralite® membrane HDs.

P60 / 1917.

Association of mitotic genes expression and centrosome amplification in multiple myeloma

Dementyeva Elena, Sevcikova Sabina, Kryukov Fedor, Nemeč Pavel, Kuglik Petr, Hajek Roman

(University Research Centre, Czech Myeloma Group, Babak Research Institute, Masaryk University, Brno; Laboratory of Molecular Cytogenetics, Department of Genetics and Molecular Biology, Institute of Experimental Biology, Masaryk University, Brno)

Introduction: Centrosome amplification (CA) may lead to genomic instability of malignant plasma cells in multiple myeloma (MM). Study objective was to evaluate association of CA with expression of genes control-

ling centrosome duplication. Methods: Centrin number was used to define presence of CA in PCs (CD138+) of MM patients: more than 4 signals were considered to be positive. Samples with $\geq 10\%$ of PCs with >4 fluorescence signals of centrin were considered CA positive. 18 MM patients were evaluated for CA in PCs. The patients' characteristics were: males/females 9/9, median age of 69 years, newly diagnosed and relapsed patients. qRT-PCR (6 CA positive vs 12 CA negative patients) were performed on PC focusing on chosen genes. Results: Gene expression analysis showed significant increase in relative quantification coefficient R of following genes (data presented as median [range]): AURKA 0.11 [0.02-0.26] vs 0.34 [0.11-0.9], PCNT 0.51 [0.11-1.52] vs 1.84 [0.51-3.20] and TACC3 0.2 [0.03-0.45] vs 0.82 [0.04-2.63] for CA negative vs CA positive patients, resp. ($p < 0.03$). Also, coefficient R of genes PCNT, AURKB, AURKA, CCNB2, PLK4, HMMR, TACC3 was strongly correlated with percentage of CA positive PC ($r_s > 0.5$, $p < 0.05$). Conclusion: In this study, we showed close interaction between presence of CA and expression of genes controlling centrosome duplication (PCNT, AURKB, AURKA, CCNB2, PLK4, HMMR, TACC3). Some of these genes (AURKA, PCNT and TACC3) reflect even CA positivity of patients. Acknowledgment: This work was supported by grants NT11154, NS10207, NS10406, NS10408, LC06027, MSM0021622434, GAP304/10/1395.

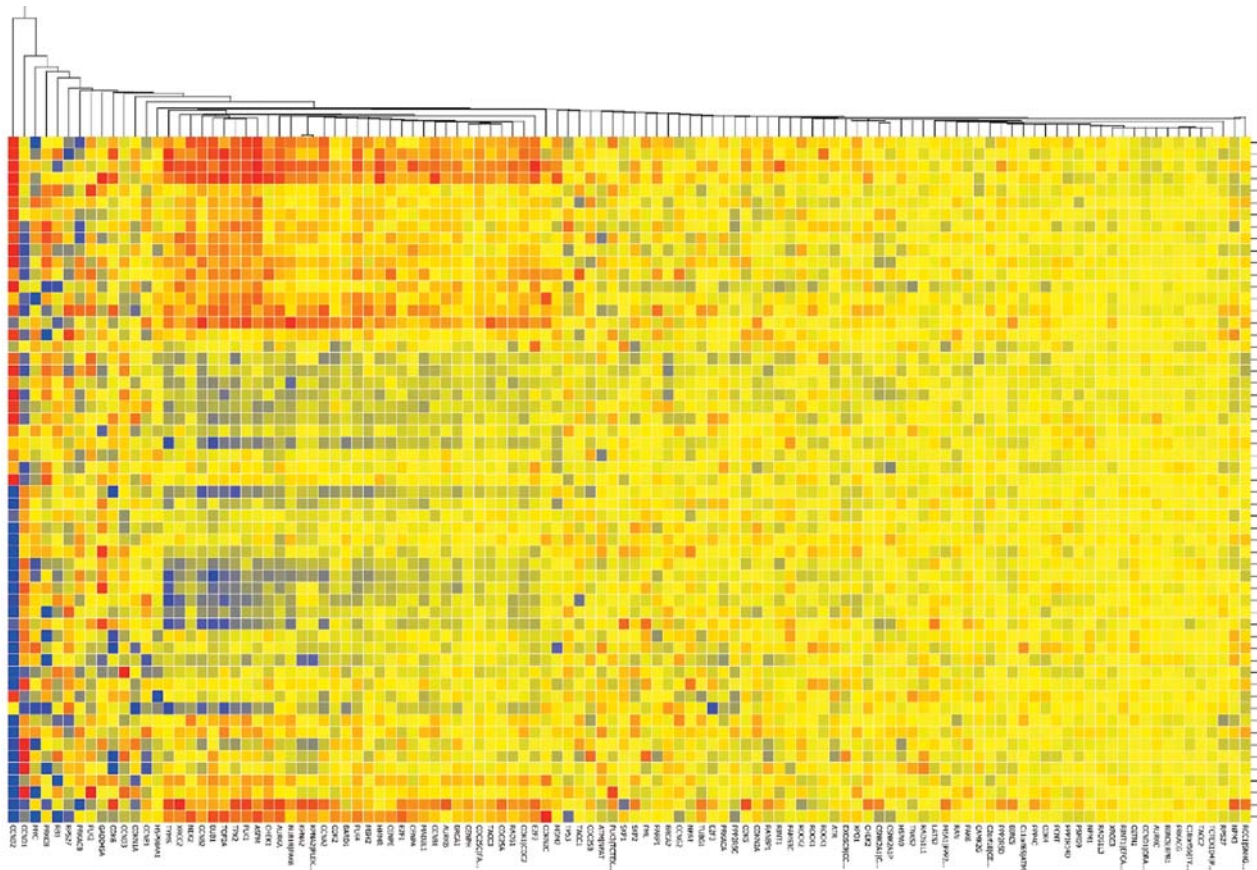
P61 / 1916.

Centrosome associated gene expression profile in multiple myeloma

Kryukov Fedor, Nemeč Pavel, Dementyeva Elena, Kuglik Petr, Hajek Roman

(University Research Centre, Czech Myeloma Group, Babak Research Institute, Masaryk University, Brno; Laboratory of Molecular Cytogenetics, Department of Genetics and Molecular Biology, Institute of Experimental Biology, Masaryk University, Brno)

Background: Multiple myeloma (MM) is a lymphoproliferative disease characterized by the clonal expansion of neoplastic plasma cells within the bone marrow. The genome of the malignant plasma cells is extremely unstable characterized by a complex combination of structure and numerical abnormalities. It's suggested that centrosome abnormalities (CA), of which centrosome amplification is the most prominent, occurs early in MM pathogenesis and increases with disease progression. Aims: The objective of our study was to evaluate changes expression profile of genes involved centrosome structure/function in MM with known role in oncogenesis. Methods: 57 patients were evaluated for gene expression profiling of PCs. CD138+ cells were separated by MACS. Total RNA was transcribed into cDNA (Ambion WT Sense Target assay), labeled and hybridized to the Affymetrix GeneChip Human Gene ST 1.0 array according to a standard protocol. Acquisition of Affymetrix array images, RMA



normalization algorithm and hierarchical clustering algorithm with Euclidean similarity measure were performed using appropriate software. A total of 100 genes were selected for clustering. All of these genes are known to be involved in regulating centrosome duplication and function with known role in oncogenesis. Results: We have found one distinct cluster of 36 genes. Based on ontology following gene groups can be distinguished: the genes associated in cell-cycle, including CDK1 and CDK2 families, E2F and Plk families AURKA and NEK2; kinetochore and microtubule attachment genes (AURKB, BIRC5, CENP family); mitotic checkpoint genes presented by BUB1 and MUD2 families; DNA damage checkpoint genes presented with centrosome amplification suppressors, integrity and reduplicate regulators (RAD51, XRCC2, MSH2, CHEK1) and structural genes presented with TUBG1. The rest of genes from revealed cluster (HMMR, TACC3, TOP2A, BRCA1 and BARD1) are also closely functionally connected with mentioned gene groups. Conclusion: In our study, we showed distinct cluster of 36 mitotic genes involved in centrosome abnormality in MM. Similarity of expression profile in revealed cluster gives us possibility to suspect that these genes are involved in MM cell oncogenesis as a whole complex. This fact needs more detailed investigation. We anticipate to gain insights into pathogenesis and possible crucial role of CA in myeloma genesis. Acknowledgment: This study was supported by grants IGA NS10207 and IGA NT1154.

P62 / 2033.

Delece TP53 u nemocných s mnohočetným myelomem – srovnání nálezů v době diagnózy a relapsu onemocnění

Mičková Pavla, Balcárková Jana, Pika Tomáš, Ščudla Vlastimil, Hanzlíková Jana, Prekopová Ivana, Kropáčková Jitka, Holzerová Milena, Chytilíková Radka, Indrák Karel, Jarošová Marie

(Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc; III. interní klinika FN a LF UP, Olomouc)

Mnohočetný myelom (MM) je plasmocelulární maligní onemocnění, postihující plasmatické buňky v terminálním vývojovém stádiu s dokončenou somatickou hypermutací i přesmykem imunoglobulinových tříd. Cytogenetické a molekulárně cytogenetické studie odhalily opakující se chromosomové změny prognostického významu, z nichž do skupiny vysoce rizikových cytogenetických změn patří t(4;14), t(14;16) a delece 17p zahrnující gen TP53. Nemocní s těmito změnami mají výrazně kratší event-free survival (EFS) i celkové přežití (OS). Cílem práce bylo určení frekvence a typu delece genu TP53 (17p13) v souboru 37 nemocných s MM, kteří byli diagnostikováni a léčeni na III. interní klinice FN v Olomouci v letech 2000-2011. Soubor tvořilo 17 mužů a 20 žen s mediánem věku 61 let. Cytogenetická a molekulárně cytogenetická vyšetření byla provedena na nestimulovaných

buňkách kostní dřeně, s minimálním zastoupením 10 % plasmatických buněk. U 26 nemocných bylo cytogenetické vyšetření provedeno v době diagnózy a v relapsu MM, 5 nemocných v době diagnózy MGUS s následným přechodem do MM a u 6 nemocných byla vyšetřena KD pouze v průběhu 2 relapsů. K hodnocení typu delece TP53 (17p13) a její frekvence byla u všech 37 nemocných použita metoda FICTION se sondou LSI p53 (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) v kombinaci s centromerickou sondou pro chromosom 17 (Abbott Molecular). Hodnota cut off pro deleci byla 20 % a hodnoceno bylo minimálně 100 plasmatických buněk. Dva nemocní s komplexním karyotypem byli vyšetřeni metodou MFISH, 4 nemocní metodou CGH a nebo arrayCGH. Monoalelická delece genu TP53 byla nalezena u 6 (19 %) nemocných. U jednoho nemocného byla delece prokázána v době diagnózy, u tří nemocných v průběhu relapsu onemocnění a u jednoho nemocného ve stádiu přechodu MGUS do MM. V jednom případě byla delece genu TP53 prokázána v době diagnózy i relapsu onemocnění, jedna nemocná měla monosomii chromosomu 17. Bialeická delece genu TP53 nebyla v souboru nemocných prokázána. Naše výsledky analýzy delece TP53 v souboru 37 nemocných s MM odhalily deleci u 19 % nemocných, což je ve shodě s literárními údaji. Vzhledem k prognostickému významu doporučuje i Evropská myelomová síť (EMN) rutinní vyšetřování delece TP53. Práce je podporována grantem MSM 6198959205

MOLECULAR HEMATOLOGY

P63 / 2070.

Advanced 8-colour flow cytometry in analysis of monoclonal gammopathies

Kovářová Lucie, Šváchová Hana, Varmužová Tamara, Štossová Jana, Ševčíková Sabina, Penka Miroslav, Hájek Roman

(OKH, FN, PMDV, Brno; BVI, LF MU, Brno)

Flow cytometry (FC) is currently not a necessary method in monoclonal gammopathy (MG) analysis; however, technological advances together with new findings reveal the need of immunophenotyping because of its diagnostic, prognostic and predictive significance. Most flow cytometers is able to analyse 6-8 fluorescences, so polychromatic assays could be used for PC analyses, not only to confirm clonality, but also to find possible clonal myeloma progenitors and/or for analysis of adhesion molecules and their involvement in the interaction of plasma cells (PCs) with the microenvironment of bone marrow. The aim of this work is to confirm the benefit of 8-colours flow cytometry for its use in clinical practice and research. Total of 30 newly diagnosed MGs was analysed what include monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), multiple myeloma (MM) and/or other PC-related disorders. Combinations of surface and/or cytoplasmic markers with normal (CD19, CD27, CD38,

CD44, CD45, CD54), aberrant (CD28, CD33, CD56, FGFR3) and/or asynchronous (nestin, CD20, CD117) expression on CD38+CD138+ PCs were used together with cytoplasmic light chains analysis. Subpopulations of CD19+CD138- B cells according to their differentiation state (sIgD, sIgM, CD20, CD24, CD27, CD38, CD45) were analysed as well. All analyses were done in 8-colour setting. Percentage of PCs easily identified MM with higher bone marrow infiltration, but in asymptomatic MM and/or MGUS cases was more important discrimination between normal and clonal PCs according to the expression of CD19 and CD56. Detailed analysis of PC subpopulations (CD19/CD56) was not sufficient in some cases, so cytoplasmic expression of kappa/lambda was added to detect clonal cells. Non-myelomatous neoplastic PCs together with clonal B cell were identified in Waldenstrom's Macroglobulinemia. Other analysed markers were differently expressed, but their prognostic and/or predictive significance has to be proved. Using 8-colour FC improved detailed analysis of B and PC subpopulations and helps to discriminate between normal and pathological cells what is important for detection even of a small clone of pathological cells. This could also help better understand the process of neoplastic transformation of normal to clonal cell. Supported by GAČR 301/09/P457, MŠMT LC06027, MSM0021622434, IGA 10408-3, IGA 10406-3 and GAČR P304/10/1395 grants.

OŠETŘOVATELSTVÍ

P64 / 2054.

Léčebná leukaferéza při výrazné hyperleukocytose u nově diagnostikovaných pacientů s CML

Zbořilová Romana, Skoumalová Ivana, Starostová Lenka, Labudíková Monika, Faber Edgar
(HOK FN, Olomouc)

Chronická myeloidní leukemie je v éře současné terapie – inhibitorů TKI léčebně dobře ovlivnitelné onemocnění s dobrou prognózou dalšího života pro nemocné. Výrazné zvýšení počtu bílých krvinek při diagnóze může však znamenat možnou komplikaci při zahájení léčby stran hrozícího syndromu z překotného rozpadu buněk. V letech 2006 – 2011 jsme na separační jednotce řešili 5 pacientů s leukocytosou nad 400 tis. Leukocytů (medián 562 tisíc). U 3 pacientů jsme provedli 2 separace, u 1 pacienta 1 separaci a v 1 případě bylo nutných 5 separací. 4 pacienti měli v době diagnózy klinické potíže, 1 pacientka byla zcela symptomatická. Nejčastějšími komplikacemi při zjištění hyperleukocytóze byli dušnost, zvýšená krvácivost, pocení, únava, zvětšené uzliny, váhový úbytek, splenomegalie a u jednoho z pacientů priapismus. Během 1 procedury jsme v mediánu snížili počet leukocytů o 163 tisíc, čas procedury byl v mediánu 100 min, objem produktu pak v mediánu 1377 ml. Ve 3 případech byl výkon proveden cestou periferních žil, 2x byla nutná kanylace centrální žíly.

V současné době jsou 3 pacienti na terapii imatinibem (1 pacient v kompletní, 1 pacient ve velké a 1 pacient v parciální cytogenetické odpovědi), 1 pacient na terapii nilotinibem ve velké molekulární odpovědi, 1 pacient zemřel na časnou progresi nemoci (blastický zvrát). Léčebná leukaferéza je u extrémních leukocytos při diagnóze CML vysoce účinná a bezpečná metoda. Snižuje riziko Tumor Lysis syndromu při následné terapii, která je pak nemocnými lépe tolerována. Naše zkušenosti ukazují, že vysoké vstupní počty leukocytů nezhoršují prognosu nemocných.

P65 / 2003.

Spirituální péče jako součást komplexní péče o hematoonkologicky nemocné

Čermáková Markéta, Řehořová Iva, Ilemová Veronika, Rollová Olga, Blažková Alena, Buchalová Edita
(I. interní klinika VFN a I. LF UK, Praha)

Úvod: Přístup k hematoonkologickým pacientům měl být holistický. Pacient musí mít uspokojeny potřeby biologické, psychické, sociální i spirituální. Uspokojení všech těchto potřeb ovlivňuje kvalitu života nemocných. Na našem pracovišti chceme poskytovat co nejkvalitnější péči, a proto saturujeme všechny výše zmíněné potřeby. Uvědomujeme si, že je třeba pečovat i o personál, který také má psychické a spirituální potřeby. Proto máme nemocničního kaplana, který slouží pacientům jen na naší klinice a je členem multidisciplinárního týmu, který pečuje o nemocné, což není v České republice úplně obvyklé. Cíl: Dosažení co nejvyšší kvality péče a tím dobré kvality života pacientů. Metoda: Na péči o nemocné se podílí multidisciplinární tým, který je složen z lékařů, všeobecných sester, ostatního zdravotnického personálu a nemocničního kaplana. Nemocniční kaplan je na klinice přítomen 3 dny v týdnu, kdy navštěvuje nemocné a je k dispozici také zdravotnickému personálu. Kaplan vykoná zhruba 30 návštěv týdně. Většina pacientů využívá služeb nemocničního kaplana už od počátku onemocnění až po autologní transplantaci kmenových krvetvorných buněk. Hlavní témata rozhovorů jsou nemoc, rodina, smysl života pacientů, smyslu jejich aktuální životní situace. Pomáhá nemocným vidět jejich život a další možnosti jiného pohledu. Velmi důležité je, že kaplan je plně integrován do multidisciplinárního týmu, i proto je jeho služba pacienty přijímána jako běžná součást péče i v tak ateistické zemi, jakou je Česká republika. Úzká spolupráce se sestrami je velmi důležitá. Sestry jsou o spirituální péči dobře informovány, a proto jsou schopny vytipovat pacienty, kteří by tuto péči potřebovali a umí ji pacientovi vhodně nabídnout. Informují také kaplana a o potřebách pacientů, čímž je celá služba mnohem efektivnější. Závěr: Díky poskytování spirituální péče jako součásti komplexní péče, je prostředí kliniky pro nemocné i ošetřující personál přátelštější a kvalita života pacientů je vyšší.

P66 / 1930.**Komplikace a léčba paravenózního úniku doxorubicinu u pacientky s Non-Hodgkinským lymfomem, kazuistika**

Vavrouchová Kateřina, Létalová Eva, Streit Libor, Marečková Jitka, Šmardová Lenka, Šálek David, Charouzková Jana

(Masarykův onkologický ústav, Brno; Interní hematologická klinika, FN a LF Masarykovy univerzity, Brno; Klinika popálenin a rekonstrukční chirurgie, FN a LF Masarykovy univerzity, Brno)

Úvod: Paravenózní únik některých cytostatik je obávou lokální komplikací při jejich podání vzhledem k následné iritaci tkání s rozvojem nekróz a defektů kůže, podkoží a někdy i svalů. Nekrózy se obvykle špatně hojí a způsobují pacientům velké problémy jak kosmetické, tak i funkční. K paravazaci dochází nejčastěji při poškození žíly, do které je zavedená flexila či jehla nebo při dislokaci konce flexily mimo žílu. Potenciál jednotlivých cytostatik k poškození tkáně je rozdílný, mezi nejvíce nekrotizující látky patří antracykliny, vinka alkaloidy a taxány. Popis případu: 75letá pacientka s Non-Hodgkinským lymfomem (difúzní velkobuněčný B lymfom) byla diagnostikována na IHOK v květnu 2009 ve IV klinickém stadiu, IPI 5. Celkem absolvovala bez větších obtíží a plně ambulantně 6 cyklů chemoterapie R-CHOP (rituximab, cyklofosamid, doxorubicin, vincristin a prednison). Při podání posledního cyklu chemoterapie v listopadu 2009 došlo na stacionáři k paravenóznímu úniku asi 50 ml roztoku doxorubicinu do levé kubitální oblasti. Maximální možné množství bylo odsáto jehlou, oblast ledována a ošetřena Dolobene gelem. Za 2 dny byla pacientka hospitalizována vzhledem k rozsáhlému otoku končetiny a vzniku několika puchýřů naplněných serózní tekutinou k preventivnímu podání antibiotik a antikoagulační léčbě. Za hospitalizace došlo k samovolnému vyprázdnění puchýřů a sloupenutí kůže, spodina defektu se pokryla nekrózou. Nález řešen zprvu konzervativně (mastný tyl, obložky s Octeniseptem) a opakovanými nekrektomiemi v celkové anestézii. Vzniklý defekt velikosti 7x12 cm v oblasti levé kubitální a levého předloktí byl nakonec v led-



nu 2010 definitivně vyřešen autotransplatací tenkého mesohvaného DE štěpu odebraného z levého stehna. V průběhu několika měsíců se postupně zlepšily i funkční vlastnosti levé končetiny (omezení extenze vlivem kontraktur). V červnu 2010 však došlo u pacientky k systémovému relapsu základního onemocnění a i přes podání paliativní chemoterapie (vepesid a dexamethazon) se zhoršuje její celkový klinický stav. Pacientka byla předána k symptomatické péči do hospicového zařízení. Diskuze a závěr: V kazuistice prezentujeme (včetně podrobné fotodokumentace) komplikovaný postup při řešení paravenózního úniku doxorubicinu. Vzhledem k náročnosti ošetrovatelské péče a výrazného dyskomfortu pro pacienta, zůstává nejdůležitějším doporučením jeho prevence – zejména výběrem vhodné žíly, pravidelnými kontrolami místa vpichu a důkladným poučením pacienta.

P67 / 2050.**Naše zkušenosti s podáním ofatumumabu u nemocných s fludarabin rezistentní CLL**

Starostová Lenka, Kubová Zuzana, Labudíková Monika, Uvázlová Eva, Zbořilová Romana, Papajík Tomáš
(HOK FN, Olomouc)

Ofatumumab, obchodní název Arzerra, je novým přírůstkem do stále početnější rodiny monoklonálních protilátek. V současnosti již tyto protilátky dělíme do I., II. a III. generace, a to dle podílu myší a humánní komponenty imunoglobulinové molekuly. Mechanismus účinku ofatumumabu je dán schopností vázat se na malou i velkou kličku molekuly CD20, s tím spojené pomalejší uvolňováním z vazby na antigen a výraznější komplemenem zprostředkovaná cytotoxicita (bez zvýšené toxicity). Podání sólo ofatumumabu u našich pacientů, bylo umožněno díky firmě GlaxoSmithKline, která Arzerru poskytla zdarma v rámci humanitárního programu. Léčebné schéma je rozloženo do 12 dávek a to: D1-D8 a týden a D9-D12 pak jednou za čtyři týdny. Doporučená dávka pro první infuzi je 300 mg a pro všechny následující infuze pak 2000 mg v 1000ml fyziologického roztoku. Jako premedikace je standardně podáváno 8-16 mg Dexamedu, 1 tbl. Paralenu 500 mg a 1 tbl. Apo-Ceritizinu 10 mg. Rychlost podání se pak řídí doporučením výrobce, kdy úvodní rychlost první a druhé infuze je 12 ml/hodinu a v průběhu ji lze zdvojnásobit každých 30 minut až na maximum 200 ml/hod. Další infuze zahajujeme rychlostí 25 ml/hodinu, a každých 30 minut zrychlujeme na maximum 400 ml/hodinu. Náš soubor čítal jedenáct pacientů - 3 ženy a 8 mužů, dva pacienti léčbu nedokončili (jeden pro edém plic, druhému byl nalezen alogenní dárce kmenových buněk. Medián věku pak byl 60 let (33 – 70). Trvání choroby bylo v mediánu 59 měsíců (19 – 138) a všichni v předchozí terapii prodělali léčbu Mabtherou. První dvě dávky jsme na naší klinice standardně podali za hospitalizace, všechny ostatní pak v ambulantním režimu. Vedlejší nežádoucí účinky, které se objevily, lze rozdělit do tří skupin: nežádoucí účinky souvisej-

cí přímo s podáním infuze, hematologická toxicita a přidružené nfekce. Nežádoucích účinků souvisejících přímo s podáním infuze jsme zaznamenali 8x u celkového počtu 5 pacientů. Všechny tyto potíže jsme hodnotili jako mírné, řešili jsme je krátkodobým přerušáním infuze, aplikací Hydrocortisonu a ty následně velmi rychle ustoupily. Dle našich zkušeností lze tedy o ofatumumabu říct, že ačkoli byli do naší skupiny zařazeni pacienti s nehorší prognózou, jeho podání je pro ně relativně bezpečné, pohodlné (ambulantní režim), pacienty velmi dobře tolerované a s minimální toxicitou. Vedlo přinejmenším ke stabilizaci jejich onemocnění a určitě výrazně přispělo ke zlepšení kvality jejich života.

P68 / 2036.

Ošetrovatelská kazuistika klienta/pacienta s akutní GvHD jako časté komplikace po alogenní transplantaci

Štulpová Hana, Raida Luděk, Vodičková Marcela, Lysák Radek

(Hemato-onkologická klinika, Olomouc; Oddělení plastické a estetické chirurgie, Olomouc)

Cílem mé přednášky je vás seznámit s onemocněním GvHD (graft-versus-host disease) jako časté komplikace po alogenní transplantaci a s ošetrovatelskou kazuistikou klienta/pacienta po alogenní nepřibuzenské transplantaci, u kterého se již zmíněné GvHD vyskytlo. Pacientovi byla zjištěna zcela náhodně bicytopenie a diagnostikován MDS (myelo-dysplastický syndrom), který byl po cytogenetické stránce hodnocen jako sekundární malignita. Doposud nebyl pro závažné hematologické onemocnění léčen. Byl indikován k provedení alogenní nepřibuzenské transplantaci. Průběh hospitalizace na transplantační jednotce mu zkomplikovalo již zmíněné GvHD, které mělo zpočátku nenápadné projevy. Následkem komplikací se zdravotní stav pacienta zhoršil natolik, že došlo k selhávání renálních funkcí. Byla indikována podpůrná dialýza. GvHD postihlo kůži, zejména na hlavě, trupu, dlaních a ploskách dolních končetin. Tato komplikace si vyžádala konzultaci s manažérkou ran i plastickým chirurgem. Nyní jsme díky intenzivnímu ošetřování kožních defektů, pravidelným převazům a komplexní ošetrovatelské péči docílili značného zlepšení. Ve své přednášce vám tak přiblížím péči o klienta/pacienta s GvHD, ošetrovatelské diagnózy, které byly v daný okamžik pro klienta prioritní. Domnívám se, že by pro vás mohla být zajímavá i obrázková fotodokumentace kožních projevů GvHD (zejména pozitivní vývoj hojení kožních defektů).

P69 / 1926.

Péče o hematologického pacienta na jednotce intenzivní péče

Rykrová Hana, Cermanová M., Pavlicová V.

(Fakultní nemocnice, II.int.kl.-odd.klin.hematologie, Hradec Králové)

Pacienti přijímaní na hematologickou intenzivní péči jsou ve většině případů v kritickém stavu, vyžadující podporu oběhu a respiračních funkcí. (UPV) Jejich stav navíc zhoršuje imunoprese, těžké krvácivé stavy (DIC, trombocytopenie, koagulopatie). Mají také snížené rezervy organismu. Nejčastější příčinou jejich kritického stavu je sepsa, která musí být včas diagnostikována. Základní léčbou těžkého stavu pacienta je tekutinová resuscitace, zpravidla cestou centrálního venózního katetru. U nemocných monitorujeme EKG, pulsní oxymetrii, CVT, arteriální a venózní krevní plyny, glykémii. Další nedílnou součástí léčby těžké sepse, je antibiotická terapie, podávání krevních derivátů, prevence hluboké žilní trombózy, ventilátorové sepse a stresového vředu. Analgesie a sedace je důležitá k zajištění kvalitního spánku, potlačení bolesti a nadbytečného respiračního úsilí. Základem úspěšné léčby kriticky nemocných je souhra celého zdravotnického personálu jednotky intenzivní péče.

P70 / 2018.

Využití vlhkého hojení ran u hemato-onkologických pacientů

Vodičková Marcela

(Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Hojení ran je komplexní proces obnovy tkání, který se v historii stále vyvíjel, až k dnešní dokonalosti. Péče o kůži patří k prioritám v ošetrovatelském procesu. V ošetřování ran a defektů je nejdůležitější co nejrychleji zajistit regeneraci nebo reparaci poškozené tkáně. Rychlost hojení závisí na hloubce poškození a na prostředí, ve kterém se rána nachází. Systém tzv. vlhké terapie se ukazuje jako optimální pro hojení chronických a komplikovaných ran. Odpovídá aktuálním potřebám pro všechny fáze hojení ran (debridement, granulace, epitelizace). V hojení ran u hemato-onkologických pacientů je velmi důležitý individuální přístup vzhledem k faktorům, které velice ovlivňují proces hojení – snížená imunita při základní chorobě a po podání chemoterapie, přidružené infekce, metabolické a nutriční změny, věk, GVHD, podávání imunopresiv aj. Vlivem rizikových faktorů je hojení defektů velmi zdlouhavé a náročné na trpělivost pacienta i personálu. Během podání chemoterapie a následně při celkové infekci se hojivý proces často úplně zastaví a hojení se o týdny prodlouží. Předkládám dvě kazuistiky ošetřování komplikovaných ran s použitím krytí společnosti Molnlycke Health Care.

P71 / 2016.

Ošetrovatelská péče o nemocného s Hodgkinovým lymfomem

Frančeová Andrea, Tomášková Vendula, Výrutová Radmila

(Hematologicko onkologické oddělení, FN, Plzeň)

Hodgkinova choroba Nemoc vychází z lymfatické tkáně, kterou tvoří především lymfatické uzliny, slezina a játra

ra. Při onemocnění dochází k nebolestivému zduření těch to uzlin. Z postižených uzlin se nádorové lymfocyty šíří lymfatickými cévami do dalších uzlin, později se šíří prostřednictvím krevních cév do dalších orgánů až mohou osídlit prakticky celé tělo. Podle toho, jak velká část organismu je zasažena, rozeznáváme 4 stádia nemoci. Čtvrté stádium je nejpokročilejší, rozsah postižení je největší. Prvotní příčina, proč dojde k rakovině lymfatických uzlin, není známa. Na rozdíl od jiných nádorů nebyly zjištěny ani žádné typické změny chromozomů. Mezi nejčastější příznaky způsobené samotnou nemocí patří: nebolestivé zduření lymfatických uzlin, ztráta chuti k jídlu spojená s hubnutím a ztrátou váhy, silné noční pocení, zvláště ní kolísavý typ teplot (trvajících 4-5 dní, po několikadenní přestávce se opět objevuje). Léčba nespočívá v jednom univerzálním léčebném postupu, ale v celé řadě různých léčebných strategií. Zásadním postupem je léčba chemoterapií - jen v 1. stádiu ozáření (radioterapií) postižené oblasti. Léčba trvá cca 6 měsíců a po komplexním vyšetření se buď ukončí, nebo následuje doplňková radioterapie. Pokud po prvním léčebném cyklu nedojde k úplnému zničení nemoci, následuje další protinádorová chemoterapie a ve vybraných případech je možné provést transplantaci kostní dřeně. Pro způsob léčby je rozhodující rozsah onemocnění. Problematika ošetrovatelské péče se odvíjí od základních příznaků nemoci, od léčebné strategie a možných komplikací. Mezi problémy vyplývající z léčby onemocnění patří nauzea a zvracení při chemoterapii, problémy se žilním přístupem, mukositida, útlum krvetvorby a komplikace při aplikaci krevních derivátů. Autorky referují o ošetrovatelské péči u nemocného s Hodgkinovou chorobou s postižením mediastina.

P72 / 1924.

Kazuistika hojení rány po neurochirurgickém výkonu s následným podáním chemoterapie u pacienta s maligním lymfomem

Brojáčková Dana, Mužíková Dana, Pavlicová Vladislava
(II. interní klinika- oddělení klinické hematologie, FN, Hradec Králové)

Péče o hematologicky nemocné přináší pro ošetřující personál řadu nových poznatků a zkušeností. Léčba hematologických malignit je spjata i s řadou jiných ošetrovatelských problémů. Diagnostika i léčba hematologických onemocnění je někdy doprovázena chirurgickými operačními výkony. Nové poznatky a zkušenosti tak získáváme i mimo jiné v péči o rány. Tato kazuistika se týká ošetřování pooperační rány v sakrální oblasti. Operační výkon byl proveden u 38 - letého pacienta s dlouhodobými problémy hybnosti dolních končetin a bolestmi zad. Po tomto chirurgickém výkonu bylo následně diagnostikováno z histologického materiálu krevní onemocnění „Difúzní velkobuněčný lymfom“. Po určení základní diagnózy bylo nutné u nemocného neprodleně zahájit chemoterapii, která předurčovala zhoršení stavu operační rány, prodloužení léčby a řadu možných infekčních

komplikací při očekávaném dřeňovém útlumu krvetvorby. Pacient B.B. byl na naší kliniku přeložen z Neurochirurgické kliniky FN HK dne 19.2.2010. Hospitalizace trvala do 17.5.2010, kdy byl přeložen na Rehabilitační kliniku FN HK. Chemoterapie byla zahájena dne 23.2.2010. V současné době je pacient po aplikaci 6 cyklů chemoterapie a autologní transplantaci kmenových buněk. Průběh hojení rány spočíval v častých převazech. Stěry z rány, které byly průběžně monitorovány, prokázaly přítomnost gram negativních tyčiček a gram pozitivních koků. I přes tyto infekční komplikace a vzniklým dřeňovým útlumem v důsledku chemoterapie bylo zhojení rány úspěšně ukončeno suturou rány 6.dubna 2010. Celý proces hojení je zdokumentovaný fotograficky. Současně po celou dobu hospitalizace probíhala rehabilitace. Prvních 14 dnů po výkonu byla rehabilitace prováděná na lůžku, poté vsedě s následným nácvikem chůze v chodítku a o berlích. Chůze o berlích trvá i v současné době. Při ošetřování rány jsme spolupracovali s chirurgickou klinikou FN Hradec Králové.

ZDRAVOTNÍ LABORANTI

P73 / 1938.

Podmínky správné výrobní praxe (Good Manufacturing Practice – GMP) v čistých prostorách Masarykovy univerzity

Mužíková Jana, Smejkalová Jana, Hrušková Dana, Poláková Helena, Kyjovská Drahomíra, Vidláková Petra, Mollová Klára, Vopěnková Kateřina, Foltánková Veronika, Hájek Roman

(Babákův výzkumný institut, Čisté prostory - LEHABI, Masarykova univerzita, LF, Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, Oddělení klinické hematologie, FN, Brno)

ÚVOD: Masarykova univerzita disponuje povolením k výrobě léčivých přípravků v oblasti „Autologní a alogenní hodnocené léčivé přípravky vyrobené kultivací hematopoetických a nehematopoetických kmenových buněk a imunokompetentních buněk in vitro včetně jejich deplece“ a je držitelem „Certifikátu GMP pro výrobce“, (Good Manufacturing Practice), což znamená zápis do databáze EudraGMP. Výroba v Čistých prostorech je pravidelně kontrolována inspektory SÚKL (Státní ústav kontroly léčiv). Veškeré autologní asepticky vyráběné léčivé přípravky v Čistých prostorech Masarykovy univerzity musí být vyráběny asepticky, za dodržení přísných podmínek GMP. Povolení k výrobě léčivých přípravků uděluje SÚKL. Dodržování podmínek GMP jsou klíčovým krokem pro bezpečnou aplikaci nekomerčně vyrobených léčivých přípravků pro klinické studie. Čisté prostory představují systém laboratoří s vlastním vzduchotechnickým systémem. Specifické nastavení přetlaků mezi jednotlivými laboratořemi vymezuje různé třídy čistoty A - D. Pracovníci se v Čistých prostorech pohybují v oblečení pro Čisté prostory odpovídající jednotlivým třídám

čistoty. CÍL: Výroba léčivých přípravků v Čistých prostorech v podmínkách GMP a s tím související dodržování podmínek GMP. SOUBOR PACIENTŮ/METODY: Léčivé přípravky jsou vyráběny pro pacienty zařazené do klinických studií nebo jsou vyráběny léčivé přípravky pro pacienty smluvních subjektů. Dodržování podmínek GMP dle zákona 378/2007 – Zákon o léčivech a Pokynů pro správnou výrobní praxi, VYR-32. VÝSLEDKY: Léčivé přípravky jsou připravovány asepticky, výroba je monitorována z hlediska mikrobiální a částicové kontaminace, jsou monitorováni pracovníci. Léčivé přípravky podléhají výstupní kontrole bezpečnosti a jakosti a jsou propuštěny kvalifikovanou osobou. V rámci plnění podmínek GMP jsou prováděny pravidelné externí a interní audity, kontroly jakosti léčivých přípravků, pravidelné validace, řešeny neshody. ZÁVĚR: Masarykova univerzita získala povolení k výrobě v listopadu 2006. Od té doby úspěšně prošla dalšími dvěma inspekcemi SÚKL. Na základě získaných poznatků z poslední inspekce byl dne 28.1.2011 výrobcí znovu vydán Certifikát GMP pro výrobce. Tím bylo prokázáno, že v Čistých prostorech Masarykovy univerzity jsou dodržována pravidla GMP. Je podporováno výzkumnými projekty MSM0021622434, LC06027 a výzkumnými granty IGA NS10387, NT11154.

P74 / 1913.

Výsledky separací plazmatických buněk z transportovaných vzorků kostní dřeně

Kyjovská Drahomíra, Hanáková Božena, Pour Luděk, Burešová Ivana, Štossová Jana, Čumová Jana, Hájek Roman (FN, OKH-LEHABI, Brno; Univerzitní výzkumné centrum - Česká myelomová skupina (URC-CMG), LF MU, Brno)

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je v České republice relativně vzácné nádorové onemocnění s incidencí 4/100 tis. obyvatel za rok. Naší snahou proto bylo získat další množství biologického materiálu pro výzkum v oblasti MM. V loňském roce jsme zahájili svoz nativních vzorků kostní dřeně (KD) z několika center v České republice a v zahraničí (SR, Polsko). Tato práce prezentuje výsledky resp. úspěšnost separací plazmatických buněk (PB) z těchto vzorků po dvou letech projektu. Materiál a metody: Celkem bylo zpracováno 219 vzorků KD získaných od pacientů v různých klinických stádiích MM z 8 různých externích pracovišť. Vzorky KD byly transportovány při teplotě do 25 °C a zpracovány s prodlevou 3-30 hodin našimi standardními postupy. U transportovaných vzorků byla pomocí průtokové cytometrie hodnocena čistota separovaných buněk (% CD138+ buněk) a stanoven absolutní počet buněk pozitivní frakce. Výsledky: Z 219 vzorků s mediánem 18 ml (2 – 25 ml) KD bylo přímo po gradientové izolaci mononukleární frakce pro nízkou celkovou buněčnost anebo nízké zastoupení PB zamraženo bez separace celkem 52 (23,7 %) vzorků. Medián čistoty separovaných PB byl 96,3% (15,0 – 99,8%) s mediánem absolutního počtu buněk pozitivní frakce 0,66 x 10⁶ (0,00 – 73,60 x 10⁶). U transportovaných vzor-

ků PB o čistotě >70% resp. >80% je prováděno cytogenetické vyšetření chromozomálních změn u MM (88,1 % vzorků) a komplexní genomový screening pomocí techniky CGH (26,2 % vzorků). Závěr: Během přípravy projektu transportu vzorků se jako největší rizikový faktor projevil pokles exprese klíčového znaku CD138, kterým identifikujeme buňky pro separaci. V reálné praxi se ale tento pokles v období prvních 3 – 30 hodin po odběru projevuje jen velmi mírně a nekoliduje s kvalitou separace. Dosažené výsledky čistot frakce PB jsou srovnatelné s netransportovanými odběry realizovanými ve stejném období. Zvažovaná (nákladná a ne zcela spolehlivá) stabilizace transportovaného materiálu se ukázala jako zbytečná a transport nativní KD v protisrážlivém roztoku (EDTA nebo heparin) jako vyhovující. Tato práce byla podpořena granty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky LC06027, MSM0021622434 a grantem IGA NS10406.

P75 / 1906.

Porovnání metod izolace RNA za účelem zkrácení času standardizované metodiky pro monitorování hladiny BCR-ABL transkriptu s ohledem na její kvalitu a množství

Vlčanová Kateřina, Otáhalová Eva, Broučková Adéla, Vilímová Zuzana, Zemanová Karla, Machová Kateřina (Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku, Odd. molekulární genetiky, ÚHKT, Praha)

Izolace kvalitní a stabilní RNA je kritický bodem pro sledování exprese cílových genů pro klinickou praxi. Množství získané RNA zase významně promlouvá do analytické citlivosti kvantifikace sledovaných transkriptů. V naší laboratoři sledujeme hladinu BCR-ABL transkriptů v celkových leukocytech periferní krve pacientů s chronickou myeloidní leukémií v průběhu cílené léčby inhibitory tyrozinových kináz pomocí standardizované kvantitativní reverzní transkriptázové real-time PCR. Nejcitlivější metodu v současné době představuje nested PCR, tu využíváme pro sledování minimální reziduální nemoci u pacientů po transplantaci kostní dřeně a u pacientů, kteří na léčbu TKI odpovídějí kompletní molekulární remisí. Dle současného protokolu izolujeme RNA metodou fenol-chloroformové extrakce z ITG (guanidin isothiokyanát) lyzátu leukocytů. Z hlediska materiálového je tento přístup levný, avšak časově náročný. Pro časovou úsporu jsme již dříve testovali různé automatizované přístupy, avšak kvalita a množství RNA nebyla pro naše účely uspokojivá. Rozhodli jsme se testovat neautomatizované, ale oproti postupu s ITG rychlejší přístupy využívající roztok Trizol™ (Invitrogene) a kit QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen). Rozhodujícími faktory pro porovnávání jsou kvalita RNA, jejíž integritu a čistotu sledujeme pomocí Bioanalyzery (Agilent Technologies) a množství, které stanovujeme pomocí spektrofotometru (NanoDrop Technologies). V neposlední řadě jsou hodnoceny i ekonomické dopady. Postupy jsou testovány na souboru 30 vzorků periferní krve pacientů. Kromě pa-

rametrů RNA porovnáváme možné dopady na citlivost real-time PCR BCR-ABL a kontrolního genu B2M a sledujeme míru ovlivnění konečného výsledku. Principy metod: izolace RNA kyselou fenol-chloroformovou extrakcí z ITG lyzátu a pomocí Trizolu je založena na separaci fází, odděluje proteiny a DNA od RNA. RNA je následně precipitována roztokem izopropanolu a promývána 70% etanolem. Vlastní izolaci nejdříve předchází osmotická lýza periferní krve pro získání leukocytů a jejich následná lyzace pomocí ITG nebo Trizolu. Při použití kitu QIAamp RNA Blood Mini Kit jsou z periferní krve vyizolovány leukocyty, které jsou lyzovány RLT pufrem (na bázi guanidin isothiokyanátu). Buněčný lyzáát je pak nanášen na křemičitou membránu kolonky, na kterou je RNA vázána, všechny ostatní složky výchozího materiálu jsou postupným procesem vyplavovány. Čistá RNA je v konečném kroku z membrány kolonky uvolněna a rozpuštěna ve vodném roztoku.

P76 / 1894.

Interpretace nestandardních výsledků z hematologického analyzátoru

Dvořáková Barbora, Holzmannová Hana, Blatný Jan
(FN, Oddělení dětské hematologie, Brno)

V naší laboratoři pracujeme s hematologickým analyzátozem firmy Sysmex - 2100. I přes velkou spolehlivost analyzátoru může v některých případech docházet k vydávání nestandardních výsledků krevního obrazu z několika příčin: 1/ Přítomnost chladových protilátek - nesrovnalosti v měřených i vypočítaných parametrech červené řady. 2/ Snížení počtu trombocytů v důsledku reakce trombocytů na protisrážlivý roztok K3EDTA, v němž v některých případech dochází ke shlukování trombocytů. Ty jsou následně analyzátozem chybně odečteny. Při tomto zjištění měříme následně vzorek odebraný do citrátu nebo zkumavek TromboExact. Trombocyty jsou sníženy i při výskytu sraženin ve vzorku. Tento odběr není validní a musí být odebrán vzorek nový. 3/ Při výskytu normoblastů v periferní krvi mohou být naměřeny falešně vysoké hodnoty leukocytů. Analyzátor nás na tuto skutečnost upozorní chybovým hlášením „normoblasty“. Tento vzorek přeměříme pomocí optického detektoru. Rádi bychom v tomto sdělení poukázali na nepřesnost některých měřených parametrů v důsledku výše zmíněných příčin, které nemůže ovlivnit ani správný odběr krevního obrazu, ale zachytí je pečlivá kontrolní práce laboranta a následná konzultace s lékařem – hematologem.

P77 / 1893.

Krevní obraz novorozence a jeho specifika

Holzmannová Hana, Dvořáková Barbora, Slánská Markéta, Blatný Jan
(Oddělení dětské hematologie, FN, Brno)

Při hodnocení krevního obrazu je nutné posuzovat jednotlivé parametry a jejich souvislosti vzhledem k věku pa-

cienta. Dítě není „malý dospělý“ - jeho největší růst a vývoj probíhá v prvním roce života a až v období puberty dosahují orgány krevetvorby velikostí a funkcí orgánů dospělého. Novorozenecký věk je období od 0. – 28. dne věku, v pediatrii se užívá termín „úzké novorozenecké období“ 0. – 7. den věku. V neonatologii a pediatrii často posuzujeme krevní obraz u předčasně narozených dětí, tedy dětí narozených před 38. týdnem gravidity. Novorozenecká erytropoéza se vyznačuje některými specifiky: zvýšenou hladinou erytropoetinu, zvýšeným počtem retikulocytů – 5. -7. den po porodu klesá retikulocytóza pod 1%. V periferní krvi novorozence je fyziologický výskyt normoblastů, které mizí z oběhu mezi 2. – 4. dnem po porodu. Novorozenecké erytrocyty mají vyšší hodnotu MCV než erytrocyty dospělého. V našem sdělení se zabýváme hodnotami fyziologického krevního obrazu u novorozence včetně morfoloogických nálezů. Pro laboratorní vyhodnocení výsledků je důležité znát kromě diagnózy, léčby atd. zejména fyziologické rozmezí hodnot jednotlivých parametrů krevního obrazu příslušejících danému věku pacienta.

P78 / 1891.

Pracovní rozsah a další parametry metody stanovení volného hemoglobinu v plazmě

Schönfeldová Eva, Chrastinová L., Štikarová J., Hlaváčková A., Veselá B., Suttnar J., Dyr J. E.
(Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha)

Hemoglobin (Hb) je transportní hemoprotein červených krvinek. Z diagnostického hlediska je důležité sledovat koncentraci extrakorpuskulárního hemoglobinu u pacientů s hemolytickými anémiemi, po transfúzních komplikacích, po transplantaci kostní dřeně, při operacích srdce, jakož i v transfuziologii při kontrole stavu skladované krve. V krvi se nachází oxyforma hemoglobinu, která se po nějaké době přemění na jiné formy (deoxyhemoglobin, methemoglobin, karboxyhemoglobin). Jednotlivé formy hemoglobinu se liší spektrofotometrickými vlastnostmi. Metoda stanovení volného hemoglobinu v plazmě je založena na měření absorbance při 415 nm a 460 nm, kde hemoglobin a bilirubin-albuminový komplex mají svá maxima. Metoda umožňuje stanovit nízké, nicméně již patologické koncentrace hemoglobinu v plazmě. Z naměřených absorbancí se koncentrace hemoglobinu a bilirubinu vypočte pomocí Lambert-Beerova zákona. Naším cílem bylo určit pracovní rozsah, mez stanovitelnosti a mez detekce předkládané metody. Ke zjištění pracovního rozsahu metody bylo třeba připravit zásobní roztok hemoglobinu a určit jeho stálost. Spektrum zásobního roztoku hemoglobinu bylo proměřeno v rozmezí 350-600 nm a jeho koncentrace byla vypočtena na základě znalosti E5401%= 8,5. Byla zjištěna mez stanovitelnosti (23,1 ± 0,4) mg/l a horní mez detekce (313,1 ± 5,1)mg/l. Vzorky plazmy s vyšší koncentrací volného hemoglobinu je nutné ředit fyziologickým roztokem. Ředění plazmy nemá vliv na zjištěnou koncentraci Hb ve vzorku. Zá-

sobní roztok volného hemoglobinu, tedy jeho oxyforma, je stabilní šest hodin. Poté se může přeměňovat na jiné formy Hb. Proto je nutné vzorky krve dodat do laboratoře a zpracovat během 6 hodin. Vzorky připravené přidáním zásobního roztoku k chudé plazmě jsou stabilní v rozmezí teplot 25-35 °C. Není tedy nutné monitorovat teplotu v laboratoři. Poděkování: tato práce vznikla díky grantu IGA MZd NS 10633-3/2009 a VZ MZd 02373601

P79 / 1874.

Akutní leukemie

Kalašová Jitka, Letenská M., Bergerová L., Černíková H., Kocingerová R., Papáčková A. (*ÚHKT, Praha*)

Akutní leukemie představují skupinu zhoubných onemocnění krvetvorby, která vzniká maligní transformací hematopoetické kmenové buňky. Jde o nádorové onemocnění krvetvorné tkáně, při kterém dochází k akumulaci nezralých krevních elementů v kostní dřeni a zdravá krvetvorba bývá potlačena. Leukemické buňky jsou přítomny v kostní dřeni, obvodové krvi, mohou infiltrovat sle-

zinu, játra, centrální nervový systém a lymfatické uzliny. U nemocných se toto onemocnění nejčastěji projevuje únavou, krvácivými či infekčními komplikacemi. Nejdůležitějším diagnostickým cílem je rozlišení akutní myeloidní leukemie (AML) a akutní lymfoblastické leukemie (ALL), protože léčba u těchto typů leukemií je odlišná. U AML jsou myeloidní blasty velké buňky, mají jemný jaderný chromatin s jedním i více naznačenými nukleoly a bazofilní cytoplazmu, která může být bez granul, či jsou v ní přítomna azurofilní granula a někdy také Auerovy tyče. Lymfoblasty jsou různě velké buňky častěji s nepravidelností v kontuře jádra, s vysokým poměrem N/C, s jemně hrudkovitým chromatinem, někdy se zřetelnými nukleoly. Cytoplazma je někdy jen málo zřetelná, u některých podtypů ALL je prostornější a silně bazofilní. Podskupiny AML blíže určíme pomocí cytochemického vyšetření a průtokovou cytometrií (FCM), diagnóza ALL je stanovena FCM. Na našem pracovišti je diagnóza akutní leukemie stanovena po změření krevního obrazu a s pečlivým mikroskopickým zhodnocením nátěru periferní krve a aspirátu kostní dřene, který je doplněn cytochemickým vyšetřením.

1997.

Extramedulárny relaps u pacienta s AML, vo forme izolovaného myeloidného sarkómu CNS

Michalková Jana, Martišová Michaela, Mistrík Martin
(Klinika hematológie a transfuziológie LFUK a SZU, Bratislava - SK)

Úvod: AML M4(FAB) tvorí 15-20% zo všetkých podtypov AML u dospelých. Myeloidný sarkóm (MS) je tumor tvorený myeloblastami, lokalizovaný mimo kostnej drene. Často vzniká pri AML M4 a M5 (FAB), pri cyto-genetických abnormalitách t(8,21) a inv(16), pri koexpresii T bb. markerov (CD 13, CD 14), pri hyperleukocytóze. Vzácná je infiltrácia CNS vo forme solídneho tumoru. K MS sa treba stavať ako k AML a podľa toho aj liečiť systémovou chemoterapiou. Vhodná je kombinácia s lokálnou RAT. Vzácné môže MS vzniknúť ako jediná manifestácia relapsu ochorenia. Ide o systémový relaps a nie iba lokaliz. proces. Pacient a priebeh: 46 ročný pacient s dg. AML M4(FAB), od r. 2006. Vstupne hyperleukocytóza 272 G/l a hepatosplenomegália. Cytologicky 54% infiltrácia KD, flowcytometricky (HLA-DR, CD4, CD13, CD33, CDw65, CD45), cytogeneticky negat. Absolvoval indukčnú CHT (AraC+daunorubicin+etoposid) s dosiahnutím parciálnej remisie. Podaná reindukčná CHT - kompletná remisia. Následne 3x konsolidačná CHT (HD AraC). Pac. nemal HLA zhodného príbuzného ani nepríbuzného darcu. Bol pravidelne sledovaný do 11/07, potom sa opakovane odmietol dostaviť na kontrolu. V 4/2010 bol hospitalizovaný na neurologickej klinike pre syndrom neúplnej transverzálnej miechovej lézie v úrovni Th10. Na CT chrbtice hypodenzná zóna v úrovni Th9 (18x9mm), infiltrácia stavcov Th10-L4. Na MR aj infiltrácia epidurálne+edém miechy. Realizovaná laminektómia a parciálna resekcia tumoru. Histologický nález: myeloidný sarkóm (MPO+, CD33+, CD43+). Pac. odmietol ďalšiu liečbu. V 7/2010 opäť hospitalizovaný pre paraparézu DK s poruchou citlivosti. Na MR obraz progresie tumoru. Vykonaná dekompresia miechy a pac. preložený na našu kliniku. Trepanobiopsia KD nepotvrdila dreňový relaps. Po absolvovaní RAT (TD 36 Gy), podaná reindukčná CHT (AraC+mitoxantron) a 2x konsolidačná CHT (HD-AraC). Na kontrolnom MR vyš. chrbtice bez zmien signálu miechy, infiltrácia stavcov v regresii. Pacient. Má t.č. HLA zhodného darcu krvotvorných buniek. Plán nepríbuzenskej TKB v apríli-máji 2011. Záver: AML M4(FAB) sa spája s vysokým rizikom extramedulárnej infiltrácie. Z nepriaznivých prognost. faktorov boli u nášho pacienta: hyperleukocytóza, infiltrácia pečene a sleziny a dosiahnutie parc. remisie po indukcii. Relaps ochorenia sa manifestoval ako myeloidný sarkóm CNS. Liečime ho rovnako ako systémové ochorenie.

1928.

Případ agresivní B-CLL

Starostka David, Mikula Peter, Novosadová Libuše, Vránová Milena
(Oddělení klinické hematologie, Nemocnice s poliklinikou, Havířov)

Vstupní údaje: muž, ročník 1941, metabolický syndrom, diagnóza B-CLL v červnu 2008 (subjektivně asymptomatická nemoc, krční a axilární uzliny do 30 mm, nitrobrříšní uzliny 40 mm, slezina 150 mm, lymfocytóza 45.5 giga/l bez anémie či trombocytopenie). Nemutovaný stav IgVH genu, trisomie 13. chromozómu s delecí 13q14, 75% difúzní infiltrace kostní dřene. Průběh onemocnění: září 2008 papulózní exantém ramene (histologická verifikace postižení kůže B-CLL), listopad 2008 progresse adenomegalie, splenomegalie a kožního nálezu. V říjnu 2009 parciální remise nemoci po 5 cyklech fludarabin + cyklofosfamid + rituximab a 3 cyklech solo-rituximab. Progrese B-CLL v srpnu 2010: pancytopenie s trilineárnými dyshemopoetickými rysy a 60% infiltrací kostní dřene při B-CLL, trisomie 13. chromozómu s delecí 13q14 a delece 6q21. Léčba 2. linie: vysokodávkovaný methylprednisolon s rituximabem. Po druhém cyklu léčby prohloubení cytopenie, sinusitida, parotitida, neurologický deficit, organický psychosyndrom a hyperkalcémie s renální insuficiencí. V diferenciální diagnostice progresse základní nemoci s event. transformací, neuroinfekce, progresivní multifokální leukoencefalopatie a ischemické postižení CNS. Exitus letalis za 20 dní od přijetí k hospitalizaci. Sekční nález: masivní generalizace B-CLL, infiltrace uzlin, jater, sleziny, ledvin, kalvy, žeber, sterna, obratlů a mozkových plen, těžká arteriosklerosa a nefrosklerosa. Závěr: případ mimořádně agresivní B-CLL - nepříznivý prognostický profil, iniciální kožní léze, klonální vývoj - delece 6q21, hyperkalcémie v důsledku osteolýzy, postižení CNS prokázané post mortem.

1929.

Manažment gravidity u pacientky s CML v chronickej fáze – kazuistika

Sninská Zuzana, Martišová Michaela
(Klinika hematológie a transfuziológie LFUK, SZU a UN, Bratislava - SK)

Úvod: Rastúci počet informácií o signálnych cestách bunkového cyklu viedol k výraznému obratu v chápaní molekulárnych procesov zahrnutých v karcinogenéze. Uplynulá dekáda zaznamenala významný pokrok v cielenej liečbe viacerých onkologických ochorení, vrátane chronickej myelocytovej leukémie (CML). Nastolila však aj otázku, či z objavu nových liečebných možností môžu ťažiť aj ženy vo fertilnom veku plánujúce graviditu. Ho-

ci inhibitory tyrozínkinázy (ITK) sú v klinickej praxi už takmer 10 rokov, o ich vplyve na plod a graviditu vieme len málo. Doposiaľ publikované práce ukazujú, že biologická liečba rovnako ako konvenčná chemoterapia môže negatívne ovplyvniť plod a manažment pacientky by mal byť zvážený už v prekoncepčnom období. Podľa súčasných poznatkov sa ITK neodporúčajú podávať v gravidite, na zvieracích modeloch sa dokázal ich teratogénny účinok. Kazuistika: 31 ročnej pacientke bola diagnostikovaná CML v chronickej fáze v septembri 2008. Následne bola zaradená do klinickej štúdie ENESTnd, kde bola randomizovaná na liečbu nilotinibom v dennej dávke 600mg. Liečba prebiehala v období od septembra 2008 do marca 2010, teda 18 mesiacov. Po 1 mesiaci pacientka dosiahla kompletnú hematologickú, po 3 mesiacoch kompletnú cytogenetickú a po 9 mesiacoch kompletnú molekulovú remisiu. Liečba bola ukončená v kompletnej molekulovej remisii pre graviditu, pac. teda v čase koncepcie užívala nilotinib. Počas celého priebehu gravidity bola bez cielenej liečby, pravidelne sledovaná v 2- až 4-týždňových intervaloch. Pacientka si udržala kompletnú hematologickú remisiu a v čase pôrodu bola vo veľkej cytogenetickej remisii (3% Ph+). Pôrod sa uskutočnil sekciou, v októbri 2010 sa narodil zdravý chlapec s hmotnosťou 3620g a dĺžkou 54cm, Apgar skóre 10. Pacientke nebola doporučená laktácia a ihneď po pôrode opätovne zahájila liečbu nilotinibom. Po 3 mesiacoch opäť dosiahla kompletnú molekulovú remisiu och. Záver: Manažment liečby pacientky s CML vo fertílom veku užívajúcej ITK sa začína už v prekoncepčnom období poučením o účinnej antikoncepcii. Pacientka, ktorá otehotnie počas liečby ITK, musí zvážiť riziko rozvoja fetálnych abnormalít plodu pri pokračujúcej liečbe na jednej strane a riziko straty liečebnej odpovede, či relapsu základného ochorenia pri prerušení tejto liečby na strane druhej. ITK by sa po pôrode mali do liečby opätovne ihneď vrátiť, dojčenie sa však v kombinácii s liečbou neodporúča, nakoľko dostupné údaje poukazujú na ich prienik do materského mlieka.

1868.

Nová mutace fibrinogenu v coiled-coil regionu ovplyvňujúci polymeraci fibrinu, fibrinolýzu a agregaci krevních destiček

Reicheltová Zuzana, Májek Pavel, Riedel Tomáš, Suttar Jiří, Štikarová Jana, Kotlín Roman, Dyr Jan E.
(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Varianty fibrinogenu bývajú často využívané ke studiu struktury a funkcie fibrinogenu, interakcií regionů jeho molekuly, polymerace fibrinu atd. Předmětem této studie bylo sledovat vliv nové mutace v coiled-coil regionu fibrinogenu na jeho funkci. U pacienta s trombofilií byly provedeny základní koagulační testy. Dalšími použitými metodami byly SDS-PAGE, DNA analýza, imunologické stanovení hladiny fibrinogenu, skenovací elektronová mikroskopie, odštěpování fibrinopeptidů, vytváření fibrino-

vého klotu po iniciaci trombinem a reptilasou, fibrinolýza a agregace krevních destiček. Byla nalezena nová heterozygotní bodová mutace v A α řetězci fibrinogenu na pozici 98, kde je zaměněn Phe za Ile. Tento fibrinogen byl pojmenován Vizovice. Mutace se nachází v RGDF sekvenci (A α 95-98) v coiled-coil regionu, v blízkosti důležitého místa, kde dochází ke štěpení plasminem, a kryptického místa zodpovědného za laterální asociaci protofibril. Přestože při analýze odštěpování fibrinopeptidů nebyly nalezeny žádné odlišnosti ve srovnání s normálním fibrinogenem, finální turbidita byla výrazně snížena jak při polymeraci iniciované trombinem, tak reptilasou. Mutace výrazně ovlivňuje fibrinolýzu a způsobuje zvýšenou agregaci krevních destiček v přítomnosti ADP i TRAP. Oproti normálním fibrinovým vláknům byly vlákna u fibrinogenu Vizovice signifikantně tenčí s výrazně odlišnou morfologií. Data prokázala, že mutace má výrazný vliv na funkci fibrinogenu, které se projevují například zvýšenou agregací krevních destiček. Opožděná fibrinolýza, abnormální morfologie fibrinové sítě a zvýšená agregace krevních destiček mohou být přímou příčinou trombotických komplikací pacienta. Poděkování: Tato práce byla podpořena granty AVČR KAN200670701, VZ ÚHK MZ 02373601 a MZ NS10633-3/2009.

1994.

Heparinom indukovaná trombocytopenia - kazuistika

Plameňová Ivana, Chudej Juraj
(KHaT JLF UK a U, Martin - SK)

Heparinom indukovaná trombocytopenia (HIT) je životohrožujúca komplikácia liečby heparinom. HIT je charakteristická súčasťou prítomnosťou trombocytopenie a trombózy v artériovom alebo venóznom systéme, nebýva spojená s krvácanými prejavmi. Prokoagulačný stav pri HIT je spôsobený imúnne podmienenou aktiváciou trombocytov (Tr) protilátkami proti komplexu heparín-doštičkový faktor 4 (PF4). Na vznik HIT treba myslieť pri poklese počtu Tr o >50% oproti ich hodnote pred začatím liečby heparinom medzi 5.-15. dňom liečby. Už pri podozrení na HIT je potrebné vysadiť heparín a pokračovať v antikoagulačnej liečbe alternatívnymi antikoagulanciami (napr. lepirudin, priamy inhibítor trombínu). Autori uvádzajú kazuistiku pacienta so životohrožujúcou masívnou pľúcnou embóliou, v liečbe ktorej bola použitá trombolytická liečba nasledovaná kontinuálnou infúziou UFH, počas ktorej došlo k progresii nálezu na angiopulmoCT vyšetrení a zhoršeniu klinického obrazu, poklesu počtu Tr a vzniku HIT. Životohrožujúci stav sa podarilo úspešne zvládnuť fondaparínom, ktorý bol použitý z vitálnej indikácie pre aktuálnu nedostupnosť lepirudínu. Fondaparín sa viže na PF4, ale nedokázala sa skrížená reaktivita s HIT-protilátkami, preto je jeho podanie v indikácii HIT možné (stupeň odporúčania IIC, ACCP 2008).

1911.**Sekundárna AML ako komplikácia liečby relabujúceho Hodgkinovho lymfómu**

Kotuličová Daniela, Chudej Juraj, Chudý Peter, Čamajová Radoslava, Pizurová Renáta

(Klinika hematológie a transfuziológie JLF UK a UNM, Martin - SK)

Klasický Hodgkinov lymfóm sa vo všeobecnosti spája s dobrou prognózou a relatívne priaznivým priebehom. Relabujúci priebeh tohto ochorenia si vyžaduje agresívnejšiu liečbu, ktorá sa spája s rizikom vzniku neskorých komplikácií. Autori v kazuistike prezentujú prípad 52-ročného muža, ktorému bol v 07/2007 diagnostikovaný klasický Hodgkinov lymfóm, typ nodulárna skleróza (podtyp NS1), klinické štádium III.A (generalizovaná periférna, mediastinálna a retroperitoneálna lymfadenopatia, bez infiltrácie kostnej drene). V I. cykle liečby absolvoval 8 kúr chemoterapie schémy ABVD a v 04/2008 dosiahol kompletnú remisiu základného ochorenia verifikovanú PET/CT. O necelý rok neskôr bol u pacienta pozorovaný 1. relaps základného ochorenia (cervikálna lymfadenopatia vľavo). Preto bol zahájený II. cyklus chemoterapie 3xDHAP a 4xENAP, na ktorom dosiahol 2. kompletnú remisiu verifikovanú PET/CT. Následne plánovaná autológna transplantácia periférnych kmeňových buniek (v 02/2010) nebola realizovaná pre nedostatočnú mobilizáciu CD34+ buniek, napriek podávaniu liečby zvyšujúcej výťažnosť štepu. Pacient bol ďalej v ambulantnom sledovaní, bez výraznejších ťažkostí. V 02/2011 bol na kontrolnom PET/CT popísaný nový nález rozsiahlej lymfadenopatie v oblasti retroperitonea a ojedinelých lymfatických uzlín v mezenteriu. Pre vysoko suspektný 2. relaps základného ochorenia bol pacient hospitalizovaný za účelom zahájenia III. cyklu chemoterapie, restagingovým histologickým vyšetrením kostnej drene sa však dokázala akútna leukémia zo spektra AML. Neskoré komplikácie liečby lymfómom, akými sú aj sekundárne malignity, predstavujú závažný problém. Vzhľadom na kumulatívnu toxicitu predchádzajúcej liečby sú terapeutické možnosti u nich značne obmedzené.

1871.**Rituximab v liečbe Hodgkinovho lymfómu**

Chudej Juraj, Sokol Juraj

(KHaT JLFUK a UNM, Martin - SK)

Patologické, genetické a imunofenotypové diagnostické kritéria pre klasický Hodgkinov lymfóm (cHL) a non-Hodgkinov lymfóm (NHL) jasne definuje WHO klasifikácia krvotvorných neoplázií. Napriek tomu ostrá hranica medzi cHL a NHL neexistuje. „Šedá zóna“ predstavuje prienik hraníc medzi cHL a ďalšími morfológicky a imunofenotypovo príbuznými entitami. Vzájomné konzultácie morfológických, imunofenotypových a molekulových vlastností jednotiek šedej zóny publikovaných v kazuistikách a ich porovnanie, prispelo k redukcii prípadov ocitajúcich sa

v tejto oblasti. Hlavné „šedé zóny“ existujú medzi TCRBCL a DLBCL, cHL a ALCL/DLBCL. Kazuistika: 37-ročný muž od roku 2007 liečený pre diagnózu NHL, typu DLBCL, KŠ I. Po prvej línii liečby (4x R-CHOP) sa dosiahla kompletná remisia. V auguste 2010 zistená hmatná lymfatická uzlina (LU). Stagingové PET-CT potvrdilo početné patologické lymfatické uzliny vľavo na krku. Realizovaná extirpácia LU, kde sa histologicky verifikoval kompozitný malígny lymfóm typu cHL a DLBCL. V súčasnosti je pacient po II. línii liečby 4x R-ABVD/ABVD, bez hmatnej lymfadenopatie, sono nález je negatívny. Záver: Dôvody použitia anti-CD20 aj u cHL sú nasledovné: Reed-Sternbergové (RS) bunky exprimujú CD20, odstránenie CD20 pozitívnych reaktívnych buniek eliminuje signály potrebné na prežívanie malígnych buniek a napomáha aktivácii hosťiteľského imunitného systému, RS kmeňové bunky s najväčšou pravdepodobnosťou exprimujú CD20 antigén.

1973.**Intrapleural administration of bortezomib is effective treatment for myelomatous pleural effusion: a case report and literature review**Klánová Magda, Klener P., Straub J., Trněný M., Špička I. *(1st Medical Department – Clinical Department of Haematology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General Teaching Hospital, Prague)*

Myelomatous pleural effusion (MPE) is an extremely rare manifestation of multiple myeloma (MM). Only few cases have been reported to date. MPE in patients with MM is often associated with high risk disease and poor prognosis despite aggressive treatment. There is no standard treatment strategy for MPE. Majority of cases of MM presenting with MPE were associated with resistance to therapy. Bortezomib (the dipeptide boronic acid analogue) belongs to backbone therapeutics in the treatment of patients with MM. The data concerning intrapleural administration of bortezomib is scarce. A 43-year-old female presented with MM IgG- κ , ISS 1 with extensive extranodal involvement (infiltration of right ovary and left breast with massive chest wall tumor). Initially, the patient was treated with 6 cycles of CTD (cyclophosphamide, thalidomide, dexamethason) with no objective response (stable disease). As the second line therapy, the patient received 2 cycles of velcade+thalidomide resulting in progression of extranodal masses with pleural effusions. At this point, MPE was detected by flow cytometry - the flow cytometry analysis showed 34% plasmacytic infiltration in the pleural effusion. Repeated evacuation of pleural fluid resulted in a short alleviation followed by rapid replenishment of the effusion. The patient was indicated to the third line therapy and received 1 modified cycle of PAD (bortezomib, doxorubicine, dexamethasone), in which on days 8 and 11 of the scheduled 1.5mg/m² bortezomib administration one half of the bortezomib dose (i.e. 0.75mg/m²) was administered intra-

pleurally and the other half (i.e. 0.75mg/m²) intravenously. The patient thus received two doses of intrapleural bortezomib 0.75mg/m² three days apart, namely in an attempt to alleviate the symptoms associated with pleural effusion refractory to thorakocentesis. After intrapleural administration of bortezomib, the patient became thorakocentesis-independent, and in two-week period the CT scan showed significant regression of pleural effusion. Subsequently, the patient received two more cycles of PAD with lenalidomide (added to combination due to progression of extranodal disease). Consequently, tandem autologous and allogeneic stem cell transplantation was planned, however, the patient succumbed to infectious complication. Conclusion: intrapleural administration of bortezomib is effective treatment for MPE.

1965.

Delece dlouhého ramena chromosomu 5 u pacienta s esenciální trombocytémií

Žmolíková Jana, Šimová J., Kubová B., Skalíková R., Heinzová V., Adamová J., Tichý M., Uvířová M., Dvořáčková J.

(CGB laboratoř a.s., Ostrava; Slezská nemocnice, Opava; Ostravská univerzita, Ostrava)

Úvod: Esenciální trombocytémie (ET) je chronické myeloproliferativní onemocnění postihující primárně megakaryocytární linii. Pacienti s ET mají typický klinický náález: trombocytémie v periferní krvi $\geq 450 \times 10^9/L$, v kostní dřeni makrocytární anémie, monolobulované zvětšené megakaryocyty a přibližně v 50% je zjištěna mutace V617F v JAK2 genu. Cytogenetické změny u pacientů s ET jsou poměrně vzácné - pouze asi v 5% je možno nalézt chromosomové změny, u kterých však nebyl potvrzen prognostický význam. Mezi nejfrekventovanější patří trizomie chromosomu 8 a 9 a delece 20q. V několika případech byl popsán pro ET méně obvyklý náález delece dlouhých ramen chromosomu 5 jako jediné aberace v karyotypu, která je typická pro pacienty s myelodysplastickým syndromem (MDS) s izolovanou delecí 5q a počtem blastů v kostní dřeni menším než 5%, tzv. 5q- syndromem. Další klinické znaky 5q- syndromu jsou trombocytémie, hypolobulované menší megakaryocyty, anémie, mírná leukopenie. Kazuistika: 79-ti letý muž byl vyšetřen na hematologii pro anémii, potvrzena anémie s trombocytémií. V biopsii kostní dřene byly nalezeny jak megakaryocyty hyperlobulizované velkých forem, tak hypolobulizované menších forem. Erytropoeza normoblastická, granulopoeza vyzrávající, poměr G:E asi 3:1. Molekulárně-genetickým vyšetřením byla prokázána JAK2 V617F mutace. Klasickou cytogenetickou analýzou buněk kostní dřene a metodou FISH byl stanoven karyotyp 135/200.nuc ish (D5S500,D5S413)x13/46,XY1746,XY,del(5)(q22q35) Závěr: Klinický obraz našeho pacienta s nálezem delece 5q společně s JAK2 V617F mutací vykazuje v souladu s literaturou smíšené rysy ET a 5q- syndromu. WHO klasifikace prozatím doporučuje řadit

toto onemocnění do kategorie MDS s izolovanou delecí 5q, autoři posledních studií se však kloní pro zařazení mezi myelodysplastické/myeloproliferativní neoplazie (MDS/MPN). V případě nálezu delece 5q současně s JAK2 V617F mutací se v literatuře uvádí možnost zhoršení trombocytémie vzhledem k hypersenzitivitě k trombopoietinu způsobené JAK2 V617F mutací a dysregulací trombopoese, za kterou je zodpovědná delece 5q. Cytogenetická a molekulárně-genetická vyšetření dokazují překrývání MDS a MPN, mohou naznačit společné cesty v jejich etiologii a také pomoci v obtížných případech v diferenciální diagnostice a léčebné strategii.

2014.

Terapie systémové mastocytózy - kazuistika

Procházková Jana, Urbanová Renata, Indrák Karel
(Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc)

Systémová mastocytóza je klonální onemocnění hematoetické kmenové buňky, které je řazeno do skupiny myeloproliferativních onemocnění. U většiny pacientů můžeme prokázat bodovou mutaci v genu pro receptor c-KIT, vzácněji jiné bodové mutace. Příznaky onemocnění jsou dány jednak postižením orgánů a tkání při akumulaci patologických mastocytů (kostní dřeň, lymfatické uzliny, slezina, játra, kůže) jednak projevy uvolňování jejich buněčného obsahu (histaminu, cytokinů, interleukinů, proteáz, růstových faktorů apod.). Diagnostika se opírá o průkaz typické bodové mutace, histopatologické vyšetření postižených tkání, zobrazovací vyšetřovací metody a stanovení sérové hladiny tryptázy. V terapii se nejčastěji uplatňují specifické inhibitory tyrozinkináz (v případě pozitivní mutace c-KIT či přítomnosti fúzního genu FIP1L1-PDGFRalfa), purinová analoga (cladribin), interferon alfa a kortikoidy. Nedílnou součástí léčby jsou léky zmírňující symptomy degranulace mastocytů. Předmětem sdělení bude popis případu 55-tiletého pacienta s diagnózou systémové mastocytózy, průběh diagnostiky, terapie a zhodnocení léčebné odpovědi po prvním roce léčby, včetně obrazové dokumentace.

1982.

Kikuchi-Fujimoto lymfadenitida, kazuistika

Kujíčková Jitka, Krpenský Antonín

(Hematologická ambulance, Nemocnice, Kyjov; I. patologiccko-anatomický ústav Fakultní nemocnice u sv. Anny, Brno)

Úvod: Kikuchi-Fujimotova (KF) nemoc neboli histiocytární nekrotizující lymfadenitida je benigní onemocnění postihující nejčastěji krční uzliny. Jedná se o velmi vzácné onemocnění s vyšším výskytem v Asiatické populaci. Přesná incidence není známa. Také etiologie onemocnění není zcela jasná, spekuluje se o možné virové etiologii nebo T-buněčně zprostředkované reakci na neznámý antigenní stimul. Příznaky onemocnění mohou při-

pomínat lymfoproliferatívny onemocnění, s různě vyjádřenými B-symptomy. Generalizovaná lymfadenopatie je vzácná. Diagnóza je stanovená histologicky z biopsie uzliny, většinou v rámci diferenciální diagnostiky lymfoproliferací. Byly popsány případy výskytu KF nemoci v souvislosti s virovou infekcí nebo autoimunitním onemocněním typu systémového lupus erythematoses. Léčba je symptomatická, onemocnění spontánně odezní do několika měsíců, v některých případech jsou podávány kortikoidy. Popis případu: 61 letá žena s půlroční anamnézou zvýšené únavy, pocení a dva měsíce pozvolna narůstající pravostrannou krční lymfadenopatií. Nález: V krevním obraze lehká normocytární anémie, FW mírně zvýšená. UZ krku prokázal zmnožené uzliny do 1,5cm, lymfadenopatie v ostatních lokalizacích neprokázána. Serologická vyšetření včetně zoonoz negativní. Histologický nález uzliny prokázal lymfohistiocytární proliferaci s atypickými imunoblasty. Imunohistochemicky v oblasti zóny nekrotizující infiltrace CD68+ makrofágy a CD8+ T lymfocyty. V screeningu autoprotilátek jen hraniční pozitivita ANA, další provedená vyšetření nesvědčí pro SLE. Léčba: nejprve symptomatická, nesteroidní analgetika a aescin. Po 8 týdnech stacionárního klinického nálezu přidány glukokortikoidy, dexamethazon 20mg den 1-4 a 15-18, celkem dva cykly. Výsledek: Pacientka kortikoidy tolerovala dobře, po prvním cyklu dexamethazonu došlo k parciální regresi nálezu, zmírnilo se pocení i únavy. Po druhém cyklu do dnešního dne nález na krku pozvolna regreduje. Závěr: Po 4 měsících od stanovení diagnózy a po dvou cyklech pulsního dexamethazonu došlo k ústupu B symptomů a pozvolné regresi lymfadenopatie. Nutné další sledování včetně kontrol autoprotilátek a tedy potenciálnímu riziku rozvoje SLE.

1919.

Využitie rádioimunoterapie (RIT) v liečbe malígnych lymfómov – 2 kazuistiky

Pizurová Renáta, Hudeček J., Chudej J., Plameňová I., Režňák I., Marošová A.

(Klinika hematológie a transfuziológie, Univerzitná nemocnica, Martin - SK)

Rádioimunoterapia (RIT) patrí medzi relatívne novšie spôsoby liečby NHL. Jedná sa o liečbu pomocou monoklonálnej protilátky (MoAb) konjugovanej s rádioizotopom a predstavuje nový smer v liečbe malígnych nádorov. Rádioimunoterapia dokáže ničiť nádorové elementy odlišnými mechanizmami než chemoterapia alebo imunoterapia nekonjugovanou protilátkou. Jej princíp využíva na jednej strane protinádorového pôsobenia MoAb samotnej, na druhej strane cieľové ožiarenie nádorového tkaniva naviazaným izotopom. Jej výhodou je, že postihuje všetky ložiská v organizme iba s obmedzeným vystavením zdravého tkaniva rádiácii a je aplikovaná len v jednom sedení, bez nutnosti opakovania aplikácie liečby. V prípade znovuobjavenia sa ochorenia je možné pokračovať v liečbe ďalšími chemoterapeutickými režimami. Prvou Mo-

Ab konjugovanou s rádioizotopom schválenou pre bežné klinické použitie bol 90Y-ibritumomab tiuxetan. Predkladaný poster uvádza 2 kazuistiky pacientov, u ktorých bola podaná RIT liečba s ibritumomabom: 1. pacient s dg. B-NHL, typ folikulárny lymfóm, G1, KŠ IV.B., s výrazným postihnutím, s pretrvávaním postihnutia aj po I. cykle imunoterapie, preto v II. cykle podaná RIT (v 03/2007) s dosiahnutím kompletnej remisie ochorenia. Pacient je dodnes bez potreby ďalšej liečby, v dobrom klinickom stave. 2. pacient s dg. B-NHL, typ folikulárny lymfóm, G2, KŠ IV.B, s rozsiahlym postihnutím, po opakovaných kúrach polychemoterapie (3 cykly), ako 4. cyklus podaná RIT liečba (v 09/2007) s dosiahnutím kompletnej remisie ochorenia, trvajúcej 1 rok. Po roku relaps ochorenia – podaný ďalší cyklus imunochemoterapie (v 01/2009) – s dosiahnutím kompletnej remisie ochorenia, ktorá pretrváva dodnes.

1915.

Diagnostika atypického relapsu B-NHL v oblasti mäkkých tkanív a svalov u pacienta s bimalignitou (kazuistika)

Pizurová Renáta, Hudeček Ján, Hollý Pavol

(Klinika hematologie a transfuziologie, Univerzitná nemocnica, Martin - SK)

Aj keď extranodálna lokalizácia non-hodgkinských lymfómov je relatívne častá (odhaduje sa na 30-40% všetkých pacientov s týmito ochoreniami), postihnutie mäkkých tkanív a svalov sa považuje za vzácné. Na základe doteraz uskutočnených analýz publikovaných súborov pacientov v prácach rôznych autorov sa výskyt týchto postihnutí odhaduje maximálne do 6% zo všetkých extranodálnych lymfómov. Môže ísť buď o primárne extranodálne postihnutie (ktoré je najmenej časté), metastatické postihnutie pri generalizácii ochorenia alebo o difúzne šírenie pri postihnutí priľahlých lymfatických uzlín alebo kostných štruktúr. Klinická manifestácia pri postihnutí mäkkých tkanív je nešpecifická, dominujú lokálne príznaky (edém, lokálna rezistencia). Pri postihnutí svalov sa môže popri očakávaných prejavoch (edém a zväčšenie postihnutého svalu, obmedzenie pohybu u postihnutého svalu, "hrča" / napätie / dyskomfort v postihnutom svale) objaviť aj compartment syndróm a rhabdomyolýza. Z histologického hľadiska ide skôr o B-bunkové lymfómy (viac ako 95% všetkých prípadov), pričom najčastejším typom býva typ DLBCL. Prognóza týchto nádorov nie je (vzhľadom k limitovaným klinickým údajom) jednoznačne udaná, všeobecne sa však považuje za nepriaznivú. Prognóza T-bunkových lymfómov, ktorých je oveľa menej, sa považuje za horšiu ako B-bunkových. V našej prezentácii opisujeme prípad 61-ročného pacienta s dg. B-NHL, typ DLBCL, KŠ I.E.,B, s dokázanou infiltráciou ľavého femuru v distálnej časti, dg. stanovená v 08/2004 so súčasne stanovenou dg. adenokarcinómu prostaty. Od 9/2004 do 12/2004 podaná chemoterapeutická liečba v kombinácii CHOP. Súčasne prebiehala hormonálna liečba na ade-

nokarcinóm prostaty. Následne bolo v liečbe lokalizovanej formy lymfómu pokračované aktinoterapiou, absolvoval rádioterapiu na oblasť ľavého femuru, celková TD 50 Gy. Od 03/2005 pacient bez hematologickej liečby, len pravidelné kontroly, až do apríla 2009. Pokračuje v hormonálnej liečbe pre adenokarcinóm prostaty, liečba ukončená v 3/2005. V 08/2010 zistené bolesti v oblasti pravého ramena, zdiagnostikovaný a potvrdený relaps s infiltráciou mäkkých tkanív a kostrového svalu blastickým B-NHL, CD20+. Zahájená imunochemoterapeutická liečba v kombinácii R-CHOP, po podaní 4. kúr imunochemoterapie robené kontrolné MR vyšetrenie pravého ramena s výraznou regresiou nálezu, t.č. bez patologických ložiskových zmien. T.č. sa u pacienta pokračuje naďalej v liečbe imunochemoterapiou schémy R-CHOP.

1879.

Hemovigilance 2010 - Transfúzní služba a.s.

Wasserburgerová Renata, Urbánková Marie, Švubová Radka, Burianová Daniela, Charalambidu Jedličková Andrea, Knápková Pavla, Dobešová Eva, Prejdová Zdena, Minářová Lenka, Krajsová Ivana, Hnilicová Romana, Píknová Dagmar, Repovský Štefan, Šlězár Jiří, Chmelenská Dagmar, Lasota Zenon, Krátká Marcela
(*Transfúzní služba a.s., Šumperk; Šumperská nemocnice a.s., Šumperk.; Středomoravská nemocniční a.s., odštěpný závod, Přerov; Středomoravská nemocniční a.s., odštěpný závod, Prostějov; Nemocnice s Poliklinikou, Nový Jičín*)

Transfúzní služba a.s. Šumperk Hemovigilance je soubohem systematických činností, které nám umožňují dohled nad všemi postupy v zařízeních transfúzní služby od odběru krve u dárců až po konečnou aplikaci transfúzního přípravku pacientovi. V rámci Hemovigilance se analyzují všechny důležité parametry oblasti dárců krve, laboratorních vyšetření a oblast správné výrobní praxe. Součástí celého transfúzního řetězce je expedice na krevní banky jednotlivých nemocnic, kdy některé transfúzní přípravky se musí přijímat zpět jako reklamace nebo ve formě vratek. Každým rokem je evidováno určité procento potransfúzních reakcí s různým stupněm závažnosti. Epidemiologické sledování dárců krve je rovněž předmětem zájmu Hemovigilance. Potřebné údaje pro statistické zpracování Hemovigilance za rok 2009 a 2010 na Transfúzní službě a.s. v Šumperku a v jejích odběrových střediscích byly vyhodnoceny, ve výsledných výstupech porovnávány shody a rozdíly v postupech na jednotlivých odběrových místech. Naší prioritou je jednotná koordinace všech postupů v systému transfúzních zařízení holdingu AGEL, společná snaha hledat stále nové možnosti zlepšení a vzájemné inspirace, abychom dosáhli maximální kvality a bezpečnosti transfúzních přípravků s minimem nežádoucích účinků hemoterapie.

2083.

Tretia alogénna súrodenecká transplantácia kmeňových krvotvorných buniek u pacienta s akútnou lymfoblastovou leukémiou - kazuistika

Kubalová S., Bojtárová E., Žiaková B., Demečková E., Mistrík M. (*Klinika hematológie a transfuziológie LFUK, SZU a UN, Bratislava - SK*)

Úvod: Alogénna transplantácia krvotvorných buniek (TKB) je najoptimálnejšou konsolidačnou liečbou akútnej lymfoblastovej leukémie (ALL) u dospelých pacientov s vysokým stupňom kurability. Prítomnosť vhodného súrodeneckého darcu umožňuje opakovanú realizáciu TKB aj u relabujúcich ALL. Pacient: 25 ročný pacient s dg. ALL včasného B-fenotypu s koexpresiou CD34 bez cytogenetického a molekulárneho markera s vysokým rizikom bol liečený od októbra 2007. Po dosiahnutí 1. kompletnej remise (1. KR) bola 25.11.2008 zrealizovaná 1. alogénna príbuzenská TKB. Darcom periférnych kmeňových krvotvorných buniek bol HLA identický brat, ABO kompatibilitý. Prípravný režim štandardne pozostával z kombinácie TBI+Cy. Štep obsahoval CD34 pozit.bb. 6.3×10^6 bb/kg hmotnosti pacienta. V rámci profylaxie GvHD bol podávaný MTX a cyklosporín A v dávke 5 mg/kg. Deň +188 (29.5.09) po transplantácii bol diagnostikovaný 1. systémový relaps ochorenia vrátane leukemickej infiltrácie CNS. Pacient absolvoval reindukčnú chemoterapiu (RICHT) vrátane CHT intratekálnej. Po dosiahnutí 2. KR (13.7.2009) bola dňa 19.8.2009 zrealizovaná 2. alogénna príbuzenská TPKB s prípravným režimom dľa schémy Bu+Cy. Štep obsahoval CD34 pozit.bb. 5.46×10^6 /kg hmotnosti pacienta. K posilneniu GvL efektu bola redukovaná imunosupresívna liečba. Po 450 dňoch od 2. TPKB (12.11.2010) bol zaznamenaný 2. relaps ochorenia, imunofenotypovo common-B-ALL s koexpresiou znaku CD38, bez CNS infiltrácie. Po 2. RICHT a dosiahnutí 3. KR. (28.12.2010) sa pacient podrobil 18.1.2011 3. alogénnej transplantácii PKB od rovnakého darcu. Zdrojom kmeňových buniek bola v tomto prípade kostná dreň. TKB sa robila po prípravnom režime podľa upraveného protokolu FLAMSA (namiesto am-sacrinu idarubicin), s intratekálnym podaním 12 mg MTX. Celková výt'aznosť bola $3,17 \times 10^6$ /kg pacienta. Imunosupresívna terapia cyklosporínom A v dávke 5mg/kg pacienta a mykofenolát mofetilom v dávke 15mg/kg bola postupne redukovaná až vysadená. Po zregenerovaní v hemograme bol pacient deň + 30 prepustený domov. Záver: Úspešné opakované alogénne transplantácie krvotvorných buniek sú zriedkavé a sú spojené s vysokou peri a posttransplantačnou mortalitou. Dlhodobé prežívanie (> 2 roky) sa udáva približne v 10%. K relatívne priaznivým faktorom patrí relaps po viac ako 1 roku, prítomnosť cGVHD, kompletná remisia pred TKB a použitie kostnej drene ako zdroja krvotvorných buniek.

Rejstřík autorů

Adam Zdeněk	39, 44, 88	Calábková Lenka	69
Adamová J.	105	Cermanová M.	96
Agut H.	7	Cetkovský Petr	7, 9, 25, 59, 60, 61, 82
Almáši Martina	90	Cmunt Eduard	59, 60, 62
Al-Sahmani Mohamed	88	Conan F.	7
Ambrůzová Zuzana	81	Copáková Lucia	69, 50, 67
Anderson K.C.	42	Čamajová Radoslava	104
Andrýsková Anna	47	Čapková L.	7
Ansell M. Steven	12	Čejková Štěpánka	51
Antošová Libuše	88	Čermák Jaroslav	24, 25, 37, 66, 67, 68
Antošová Monika	88	Čermáková Markéta	34, 94
Augustiňáková Alena	72	Čermáková Z.	40
Bačáková Lucie	71	Černá Michaela	76
Bačovský Jaroslav	38	Černá Olga	24, 59
Bajerová Monika	50	Černá Zdena	21, 48
Balcárková Jana	66, 93	Černíková H.	100
Balhárek Tomáš	17, 50, 57	Čiklová Lada	54
Bártová Eva	43	Čmejla Radek	24, 53
Bašová Petra	31, 37	Čumová Jana	98
Bejdák Petr	83, 84, 85	Čuřík Nikola	31, 37
Belada David	10, 11, 12, 19, 62	Dagrada GianPaolo	43
Beličková Monika	37, 68	David Belada	18
Bělohávková Petra	60, 68	De Paepe Pascale	43
Benedetto Bruno	33	De Wolf-Peeters Christiane	43
Beranová Adéla	80	Deback C.	7
Bergerová L.	100	Dědečková K.	11
Bittóová Martina	14	Delmore J.	42
Bláha Milan	75, 76, 78	Demečková Eva	50, 59, 79, 107
Bláha Vladimír	75	Dementyeva Elena	44, 91, 92
Blahutová Šárka	40	Demitrovičová Ludmila	59
Blatný Jan	99	Dhimolea E.	42
Blažek Bohumír	21, 48	Dietlein M.	11
Blažek Jan	55	Divoká Martina	24, 49, 52, 82
Blažková Alena	94	Divoký Vladimír	23, 24, 36, 69
Bojtárová E.	9, 79, 80, 107	Dobešová Blanka	60
Bortlíček Zbyněk	22	Dobešová Eva	107
Boutolleau D.	7	Dobrovolná Marie	14
Bozová Miroslava	51	Doležalová Magda	30
Brandejsová Renata	30	Doležel Petr	23
Brojáčková Dana	97	Doleželová Kateřina	40
Broučková Adéla	59, 98	Dostálová Merkerová Michaela	68
Brychtová Yvona	16, 22, 61, 62	Doubek Michael	16, 22, 60, 61, 62
Brynda Eduar	71	Drgoňa Luboš	9
Březinová Jana	24, 60, 61	Dudíková Marie	74
Břízová Helena	72	Dušek Ladislav	49, 59, 60
Buchalová Edita	94	Dvořáčková J.	105
Bulíková Alena	85, 88	Dvořáková Barbora	99
Burčková Kateřina	21, 61	Dvořáková Dana	16, 22, 50, 60, 67
Burda Pavel	31, 37	Dvořáková Zdenka	56
Burešová Ivana	44, 88, 89, 98	Dyr Jan E.	68, 71, 72, 99, 103
Buriánková Eva	28	Faber Edgar	10, 16, 18, 32, 33, 52, 56, 59, 69, 79, 85, 94
Burianová Daniela	107		
Bušiková L.	54		
Bystřická Eva	30, 34		

Fábryová Viera	24	Hnilicová Romana	107
Farkašová Anna	50	Hoblová J.	46
Farkašová Denisa	81	Hochová Ivana	24
Fatková Romana	35	Holická Monika	24
Feixová Hana	84	Holíková Marta	19
Ferreiro Julio Finalet	43	Hollý Pavol	106
Filip Stanislav	76, 78	Holusková Iva	47, 75
Filová Elena	71	Holý Ondřej	78
Fišárková H.	46	Holzerová Milena	25, 26, 49, 55, 66, 69, 82, 93
Fišer Karel	21	Holzmannová Hana	99
Flodr Patrik	25, 26, 32	Horáček Jan	51, 86
Flochová Emília	32	Horáková Júlia	16
Foltánková Veronika	97	Horálková Lenka	56, 87
Foralová Renata	9	Horký Ondřej	16
Forgáčová Katarína	77	Hornořová L.	7
Forsterová Kristina	9	Horváthová Monika	24, 36
Frančeová Andrea	96	Hrabánková-Navrátilová Darja	34
Froňková Eva	19, 20, 21, 49, 52	Hrabětová Marcela	15
Fuchs Ota	24, 67	Hrdličková Alena	7, 9, 21, 51
Furková J.	40	Hrdličková R.	40
Galuszková Dana	40, 47, 49, 73, 75, 82	Hrnčířová K.	85
Gašová Zdenka	40	Hrnčířová Kristýna	83, 84
Gazdová Jana	69	Hromková Magdalena	29
Grecová Veronika	21, 51, 52	Hrubá Petra	46, 56
Gregora Evžen	39	Hrubiško Mikuláš	58, 80
Grešlíková Henrieta	44, 88	Hrušák Ondřej	21, 48
Grycová Petra	86	Hrušková Dana	97
Guman Tomáš	9	Hubáček Jaromír	16, 49, 66
Gyrfás Ján	50	Hubáček Petr	7, 9
Haber Jan	9	Hudeček J.	16, 50, 106
Hájek Roman	37, 38, 39, 44, 45, 55, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 97, 98	Humplíková Lenka	82
Hájková Hana	24, 37, 66, 67, 82	Hušková Hana	31
Hak Jiří	21, 48	Charalambidu Jedličková Andrea	107
Halmo Renata	33	Charouzková Jana	95
Halová Kateřina	55	Chiecchio Laura	43
Hanáková Božena	37, 98	Chlupáč Jaroslav	71
Hanzlíková Jana	55, 66, 93	Chmelenská Dagmar	107
Hapalová Jolana	80	Chovancová Jana	22
Hardekopf D. Warren	53	Chrastinová L.	99
Harrison Christine J.	43	Chrenková Oľga	74
Hartl Pavel	30	Chudej Juraj	59, 103, 104, 106
Hastka Jan	85	Chudý Peter	104
Haškovec Cedrik	37, 66, 67	Church K. Amy	12
Hatalová Antónia	58	Chytilíková R.	66
Häutlerová Tereza	47	Chytilíková Radka	25, 26, 55, 93
Hayes C.A.	42	Ilmová Veronika	94
Heiderová Alena	34	Ilencikova Denisa	43
Heinzová V.	105	Indrák Karel	8, 10, 12, 16, 18, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 32, 33, 49, 52, 59, 79, 82, 85, 66, 93, 105
Hemker H. Coenraad	13	Indrácová Vanda	14
Henzlová Lenka	28	Izrael Gergely	14
Heřmanová Zuzana	38	Jabali Yahia	48
Hilská Irena	72	Jacobs H.	42
Hlaváčková A.	99	Jakubikova J.	42
Hlaváčová Monika	14		
Hluší Antonín	10, 70		

Jančušková Tereza	53	Kohlíková Eva	14
Janíková Andrea	22	Koláčková Monika	24
Janíková Petra	67	Kolář Milan	78
Jankovská Milada	19	Kollinerová Soňa	82
Janotová Iveta	48	Kopecný Jindřich	73
Jarkovský Jiří	27	Koranda Pavel	28
Jarolíková Viera	30	Korecká K.	54
Jarošová Marie	25, 26, 43, 49, 52, 53 55, 59, 66, 82, 93	Kořen J.	39
Jebavý Ladislav	51	Kořístek Zdeněk	16
Jedličková Ivana	71	Kořístka M.	40
Jelinek F. Diane	12	Kostečka Arnošt	24
Jindra Pavel	15, 55	Košťál Milan	76
Jonášová Anna	24, 37, 66	Košťálová Milada	76
Jugová Alžběta	43	Kotlín Roman	103
Jungová Alexandra	15	Kotuličová Daniela	104
Juráňová Jarmila	85, 86	Ko-Tung Chang	36
Jurček Tomáš	60	Kouba Michal	7, 9
Kabátová-Maxová Klára	33, 34	Koudelková Lucie	29
Kabíčková Edita	7, 27	Koudová Monika	14
Kačírková Petra	85	Koukalová Alena	34
Kadlčková Eva	24	Koupilová Milena	56
Kadlecová Jana	86	Kováčová Monika	35
Kahraman D.	11	Kovářová Lucie	37, 45, 88, 90, 93
Kaisarová Petra	37, 88, 90	Koza Vladimír	12, 15, 53, 86
Kajaba Václav	29, 34, 85	Kozák Tomáš	9, 11, 12, 53, 62, 86
Kalandrová Eliška	24	Krajsová Ivana	107
Kalašová Jitka	46, 100	Král Zdeněk	12
Kalina Tomáš	21	Krátká Marcela	107
Kalincová Jana	83, 84	Krčová Věra	70
Kalinová Markéta	72	Krejčí Marta	16, 22, 39, 44
Kamínková Jitka	56	Krejčík Zdeněk	68
Kantorová Barbara	63	Kreutzman Anna	32
Kapitáňová Zuzana	27, 28	Kropáčková Jitka	55, 66, 93
Karas Jan	14	Krpenský Antonín	105
Karas Michal	15, 53, 59, 86	Krupová Kateřina	30
Karásková Eva	23	Kryukov Fedor	44, 91, 92
Karban Josef	31, 54	Křivanová Andrea	44
Kastritis E.	42	Kubalová Stanislava	79, 107
Katrincsáková Beáta	49	Kubová B.	105
Keslova P.	7	Kubová Zuzana	10, 8, 19, 25, 26, 27, 32, 95
Kissová Jarmila	88	Kubričanová Žaliová Markéta	21
Klabusay Martin	22	Kučerová Jana	36
Klamová Hana	56, 57, 59, 60, 61	Kučerová Marie	34
Klánová Magda	104	Kuglík Petr	44, 88, 91, 92
Klapalová Martina	31	Kujíčková Jitka	105
Klásková Kateřina	11, 62	Kulvait Vojtěch	31
Klener P.	104	Kupsa Tomáš	51
Klimeš Daniel	37	Kupská Renata	44, 88
Klincová Mária	44	Kůsová Jana	55
Klippel S.	42	Kušíková Mária	81
Klupal Radek	80	Kuťková Dagmar	42
Klukošová Štefánia	48	Kvasnička J.	54
Knápková Pavla	107	Kviatkovská Zuzana	50
Kobe Carsten	11	Kyjovská Drahomíra	55, 97, 98
Kocingerová R.	100	Kynčl Martin	27
Kocmanová Iva	9, 83, 84	Labudíková Monika	29, 34, 94, 95
Kodet Roman	27, 72	Lacko Anton	74

Lakota Ján	16	Mazal Oldřich	86
Langerová Eva	72	McMillin D.W.	42
Langová Kateřina	10	Mejstříková Ester	7, 21, 27, 48, 49
Langová Marta	74	Mičková Pavla	55, 66, 93
Langrová Hana	75	Mičuda Stanislav	78
Lánská Miriam	75, 76	Mihál Vladimír	21, 48
Lapčíková Anna	85, 86	Michalka Jozef	12, 22
Lasota Zenon	107	Michalková Jana	101
Laubach J.	42	Michálková Kamila	13
Lavická Eva	14	Michalová Jana	77
Lawasut P.	42	Michalová Kyra	24, 43, 59, 61
Legartová Soňa	43	Mikula Peter	101
Leitnerová Michaela	69	Mikulášová Aneta	44, 88
Lelabousse B.	7	Mikulášová Zuzana	69
Lemmens Heidi	43	Mikulenková Dana	45, 46, 85
Lengerová Martina	83, 84, 85	Milojkovic Dragana	31
Létalová Eva	95	Minařík Jiří	28, 38, 39
Letenská M.	46, 100	Minářová Lenka	107
Libiger Jiří	24	Mistrík Martin	16, 50, 58, 59, 67, 72, 79, 80, 81, 91, 101
Lipšic Tomáš	87		
Lochman Pavel	38	Mitsiades Constantine	42
Lopot F.	91	Mitura Juraj	74
Lopotová Tereza	56, 57	Móciková Heidi	11, 12
Lubušký Marek	75	Modrianský Martin	82
Ludíková Barbora	13, 23	Mojzíková Renáta	23, 24, 69
Lukášová Marcela	25	Mokrý Jaroslav	78
Luxová Alena	84	Mollová Klára	97
Lysák Daniel	15	Molnár Marián	70
Lysák Radek	96	Moravcová Jana	56, 57, 60, 61
Macková Klára	55	Motyčková Monika	19, 62
Machová Poláková Kateřina	59, 6, 61, 98	Moučková Darina	57
Maisnar Vladimír	37, 39, 90	Mráz Marek	12, 31
Májek Pavel	68, 71, 72, 103	Mrázek František	81
Majer Michal	14	Mrhalová Marcela	72
Maláková Jana	68	Múdry Petr	9
Malčíková Jitka	61, 63	Müllerová Dana	35
Malinová Karla	22	Mustjoki Satu	32, 85
Mallátová Naďa	9	Muthu Raja Karthick Raja	37, 45, 88
Malý Jaroslav	10, 11, 51, 68, 75, 76	Mužík Jan	49, 59, 60
Marcinek Juraj	17, 50, 57	Mužíková Dana	97
Marečková Andrea	21, 22	Mužíková Jana	90, 97
Marečková Jitka	95	Mužíková Kateřina	9, 19, 20, 21, 51, 52
Marešová Ivana	52	Myslivoček Miroslav	28
Marinov Iuri	84	Nádvorníková Sylvie	56, 59
Marková Jana	11, 12	Naušová Jitka	36
Marková Markéta	7, 14, 25, 59, 61, 82	Navrátil Milan	16
Markuljak Imrich	59	Navrátilová Jana	15
Marošová A.	106	Nečas Emanuel	31, 36, 37, 77
Martinka Ján	80	Nekvindová Jana	68
Martišová Michaela	101	Němec Pavel	44, 88, 44, 91, 92
Masárová Katarína	80, 91	Neničková Marie	74
Masárová Lucia	9	Neuwirtová Radana	24
Matoušková Ivanka	78	Nosál Miloš	67, 72
Matýšková Miloslava	46, 85	Novak J. Anne	12
Mayer Jiří	8, 9, 12, 16, 21, 22, 31, 50, 59, 60, 61, 83, 84, 85	Novák Martin	49, 87
Mazal Jakub	40	Novák Zbyněk	13, 23
		Nováková Ludmila	24, 66

Novosadová Libuše	101	Potáčová Anna	89
Novotný Jiří	69	Poul Hynek	62
Novotová Elena	46	Pour Luděk	39, 44, 90, 98
Nowakowski S. Grzegorz	12	Prajzlerová Klára	80
Obr Aleš	27	Prejdová Zdena	107
Obtřílková Petra	31	Prekopová Ivana	55, 66, 93
Očadlíková Darina	55	Prchal Josef	35
Oltová Alexandra	60	Pribulová Hana	80
Onderková Alice	29	Priester Peter	73
Onderková Jana	81	Procházka Martin	75
Ondráčková Zuzana	57	Procházka Vít	10, 18, 26, 27, 28, 62, 63, 85, 87
Ooi M.G.	42	Procházková Daniela	21, 48
Otáhalová Eva	98	Procházková Jana	10, 70, 105
Pacasová Rita	74	Procházková Jiřina	50
Palašthy Stanislav	16	Pták Jan	70
Paloušová D.	83, 85	Pulejkovič Dejan	27
Palová Miroslava	28	Pytlík Robert	19, 83
Papáčková A.	100	Ráčil Zdeněk	8, 9, 50, 60, 83, 84, 85
Papajík Tomáš	8, 10, 18, 19, 25, 26, 27, 28, 32, 63, 75, 82, 85, 95	Radocha Jakub	39, 90
Partschová Martina	24	Radová Alice	73
Pavlicová Vladislava	34, 96, 97	Raida Luděk	8, 10, 16, 18, 27, 29, 78, 79, 96
Pavlíček Petr	39	Rázga Filip	60
Pavlíková Daniela	58	Reicheltovej Zuzana	68, 71, 103
Pavlová Šárka	61	Rencová Eva	75
Pecka Miroslav	68	Repovský Štefan	76, 107
Pečánková Klára	68	Režňák I.	106
Peková Soňa	53, 86	Riedel Tomáš	71, 103
Pelcová Jana	37	Richardson P.G.	42
Pelková Vendula	21	Richter Jiří	42
Penka Miroslav	37, 88, 90, 93	Rohoň Peter	10, 32, 33, 52, 62
Petera Jiří	73	Rolencová Monika	8, 83
Petrboková Radka	66, 67	Rollová Olga	94
Petřek Martin	81	Ross Fiona M.	43
Pika Tomáš	38, 87, 90, 93	Rozsival Pavel	75
Pikalová Zuzana	26, 49, 66, 82, 87	Rožmanová Šárka	52
Piknová Dagmar	107	Rusiňáková Zuzana	8, 10, 28, 79
Pimková Kristýna	72	Russell Lisa J.	43
Pirnos Jan	19	Ružbacký Rastislav	67
Piterková Lucie	24	Rychtrmocerová Hana	83
Pizurová Renáta	104, 106	Rykrová Hana	96
Plachý Radek	53, 86	Ryšavá Jana	60, 61
Plameňová Ivana	70, 103, 106	Ryšavá R.	39
Plank Lukáš	17, 50, 57	Řehořová Iva	34, 94
Plasil Martin	45	Řezníčková Leona	21, 51, 52
Plevová Karla	61	Sáblíková Barbora	90
Pohlreich D.	7	Sandecská Viera	16, 39
Polák Jaroslav	67, 82	Sauer Pavel	78
Poláková Helena	97	Savvulidi Filipp	31, 36, 37, 77
Polakovič V.	91	Sečkařová Martina	56
Polívková Václava	59	Sedláček Petr	7, 9, 19, 48
Poňka Přemysl	35	Sedláková E.	32
Porkka Kimmo	32	Seibertová Katarina	31
Pospíšil Vít	31, 37	Seifertová Naďa	24
Pospíšilová Dagmar	13, 23, 24, 36	Sejnová Daniela	9
Pospíšilová Pavla	23	Semerák Pavel	51
Pospíšilová Šárka	12, 21, 22, 31, 61	Sevcikova Sabina	44, 91

Schönfeldová Eva	99	Ščudla Vlastimil	38, 39, 90, 93
Schutzová Miroslava	15	Šefc Luděk	36, 77
Schwarz Jiří	66	Ševčíková Eva	9
Sičová Kateřina	10, 49	Ševčíková Sabina	90, 93
Skalíková R.	105	Šimková Michaela	73
Skálová M.	54	Šimkovič Martin	62
Skapa P.	7	Šimová J.	105
Skopalová M.	11	Šišková Magdalena	24
Skoumalová Ivana	33, 56, 87, 94	Šlechtová M.	46
Skraková Marcela	58	Šlězár Jiří	107
Skuhrová Francová Hana	21, 22, 61	Šmardová Lenka	95
Slabý Ondřej	90	Špaček Martin	9, 62
Slánská Markéta	99	Špička Ivan	19, 39, 89, 91, 104
Slavík Luděk	70, 86	Špiříková Ivana	46, 56
Sláviková Margita	47, 73	Šponerová Dana	24
Slepičková Ilona	14	Šrámková Lucie	19
Slezáková Katarína	81	Štefaníková Zdena	58
Slováček Ladislav	73	Štefaníková Zdenka	80
Smejkalová Jana	97	Štěpánková Marika	80
Smetana Jan	44	Štěpánková Pavla	10, 11, 12, 19
Smetana Karel	53	Štěrbá Jaroslav	21, 48
Smolej Lukáš	19, 62	Štikarová Jana	71, 99, 103
Smolová Lada	35	Štossová Jana	37, 44, 88, 89, 90, 93, 98
Smrčková Alena	9	Štulpová Hana	96
Smutná Veronika	49	Šturmová Adéla	33
Sninská Zuzana	101	Šustáčková Gabriela	43
Snopková S.	46	Šváchová Hana	90, 93
Sokol Juraj	104	Šváchová M.	32
Stanislav Filip	73	Švára F.	91
Starostka David	19, 101	Švecová Dagmar	73
Starostová Lenka	94, 95	Švojgr Karel	49
Starý Jan	9, 19, 21, 27, 48, 49	Švubová Radka	107
Stehlík David	83	Tesařová Eva	41
Stehlíková Olga	22	Thürner Daniel	21, 51
Steinerová Kateřina	15, 59	Tichý Boris	21, 22, 61
Stejskalová Ivana	13	Tichý Michal	32, 105
Stemnická Denisa	81	Tichý Miloš	51
Stixová Lenka	43	Tkáčová Vlasta	80, 84
Stopka Tomáš	31, 37	Tomášková Vendula	96
Stossova Jana	45	Tomáška Miroslav	16
Straub Jan	39, 89, 91, 104	Tošková Martina	8, 50, 83, 85
Streit Libor	95	Tóthová Elena	9, 16, 58, 59
Studnička Jan	75	Tousseyn Thomas	43
Studničková Martina	75	Trhlíková Petra	47, 73
Sulovská Lucie	13, 23	Trka Jan	19, 20, 21, 48, 49, 51, 52
Sumerauer David	27	Trnavská Irena	46, 88
Suská Renata	37, 88	Trněný Marek	19, 31, 37, 39, 59, 60, 61, 83, 91, 104
Suttnar Jiří	68, 71, 72, 99, 103	Trnková Marie	29
Svoboda Tomáš	15	Trunda Miroslav	80
Svoreň Zdenko	67	Tupá Miriam	48, 74
Sýkora Viktor	36	Tupý Jaromír	48, 74
Sýkorová Alice	10, 11	Turcsányi Peter	8, 27, 63, 72
Szabóová Žofia	67	Úlehlová Jana	70
Szépe Peter	17, 50, 57	Urbánková Helena	25, 26, 43, 66, 82
Szotkowski Tomáš	10, 16, 49, 66, 75, 87	Urbánková Marie	107
Šálek Cyril	66, 67, 82		
Šálek David	22, 95		
Šauerová Renata	54		

Urbanová Renáta	8, 10, 27, 63, 105	Vozobulová Věra	12, 15
Uvírová M.	105	Vraná Milena	14
Vacková B.	39	Vránová Milena	101
Válková Veronika	14, 82	Vrbacký Filip	68
Valová Taťána	51	Vrbová Olga	86
van de Donk N.	42	Výdra Jan	9, 53, 86
Van Ness Brian	33, 42	Vylitová Lucie	34
Vandenbergh Peter	43	Výrutová Radmila	96
Vargová Karin	31, 37	Wasserburgerová Renata	107
Varmužová Tamara	37, 88, 93	Weinbergerová Barbora	8, 9, 83, 85
Vašatová Martina	51	Wild Alexander	12, 16
Vašíková Alžběta	68	Winterová Jana	8, 83, 85
Vavrouchová Kateřina	95	Witzig E. Thomas	12
Vávrová Jiřina	78	Wlodarska Iwona	43
Venigová Petra	55	Zahradová Lenka	39, 44, 55, 89
Válková Veronika	80	Zachová Silvie	81
Veselá B.	99	Zajac Miroslav	7, 9
Veselá Romana	83	Zaoralová Romana	44, 89, 90
Veselková Jana	46, 56	Zapletalová Jana	38, 52, 82
Vestenická Veronika	72	Zarbochová Pavla	37, 88
Vidláková Petra	55, 97	Zavřelová Alžběta	53
Vilímová Zuzana	98	Zbořilová Romana	94, 95
Vítek Antonín	25, 82	Zdráhal Zbyněk	89
Vítková Jitka	29	Zemanová Karla	59, 61, 98
Vlčanová Kateřina	59, 98	Zemanová Markéta	75
Vlčková Romana	14	Zent S. Clive	12
Vodičková Elena	27	Zikmund Tomáš	31
Vodičková Marcela	96	Zini Gina	85
Vodičková Marta	47	Zítková Marie	34
Voglová Jaroslava	32, 59, 60, 68, 85	Zuna Jan	21, 48, 52
Vokurka Samuel	15, 30	Zwiewka Michal	80
Volejníková Jana	49	Žáčková Daniela	59, 60
Volfová Pavlína	83, 84, 85	Žáčková Markéta	57
Vondráčková B.	54	Žák Pavel	51, 53, 68, 86
Vondráková Jana	8, 10, 24, 79, 85	Žáková Alexandra	40, 73
Vopěnková Kateřina	97	Žejšková Lenka	53, 86
Vostrý Martin	24	Žiaková Barbora	9, 79, 107
Vošahlíková Šárka	80	Žikavská Lubica	19
Votavová Hana	68	Žmolíková Jana	105