


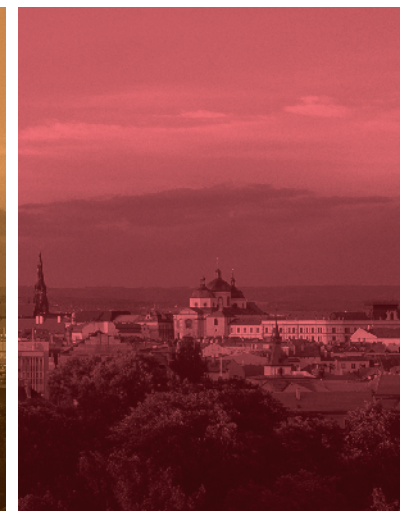


**RÁDI VÁS V OLOMOUCI
UVIDÍME I PŘÍŠTÍ ROK**

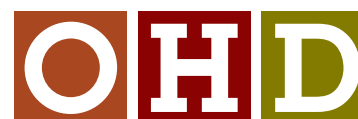
XXIX. Olomoucké hematologické dny 1.–3. 6. 2015

www.olhemdny.cz

SBORNÍK ABSTRAKT  XXVIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí



SBORNÍK ABSTRAKT



XXVIII. Olomoucké hematologické dny
s mezinárodní účastí

XVIII. Konference ošetřovatelství
a zdravotních laborantů

7th Symposium on Advances
in Molecular Hematology



Haimaom
Nadace na podporu transplantace kostní dřeně

Akreditováno EHA

www.olhemdny.cz



1. – 3. 6. 2014 / Olomouc
NH Olomouc Congress a OMEGA centrum

POŘÁDAJÍ

Česká hematologická společnost ČLS JEP
Sekce onkologie České asociace sester
Hemato-onkologická klinika LF UP v Olomouci
HAIMAOM, nadace na podporu transplantace kostní dřeně
Lékařská fakulta UP v Olomouci



Haimaom
Nadace na podporu transplantace kostní dřeně



Lékařská fakulta
Univerzity Palackého
v Olomouci

POD ZÁŠTITOU

děkana LF UP v Olomouci prof. MUDr. M. Koláře, Ph.D.
rektora UP v Olomouci prof. Mgr. J. Millera, MA, Ph.D.
hejtmana Olomouckého kraje Ing. J. Rozbořila
předsedy ČHS JEP doc. MUDr. J. Čermáka, CSc.
ředitele Fakultní nemocnice Olomouc doc. MUDr. R. Havlíka, Ph.D.

GENERÁLNÍ PARTNEŘI

Novartis s.r.o. / Takeda Pharmaceuticals Czech Republic s.r.o.



HLAVNÍ PARTNEŘI

Roche s.r.o. / GlaxoSmithKline s.r.o. / Janssen-Cilag s.r.o.



VÝZNAMNÍ PARTNEŘI

Terumo BCT Europe N.V. / Sysmex CZ s.r.o. / Pfizer s.r.o. / Bristol Myers Squibb s.r.o. / Astellas Pharma s.r.o.



PARTNEŘI

Medista spol.s.r.o. / 4LIFE Pharma CZ s.r.o. / Amgen s.r.o. / AOP Orphan Pharmaceuticals AG / Baxter Czech s.r.o. / Biohem s.r.o. / Celgene s.r.o. / CSL Behring s.r.o. / Exbio Praha, a.s. / Fresenius Kabi s.r.o. / Grifols s.r.o. / I.T.A.-Intertact s.r.o. / Merck Sharp & Dohme s.r.o. / Octapharma CZ s.r.o. / Sandoz s.r.o. / Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o. / sanofi - aventis s.r.o. / The Binding Site s.r.o. / Werfen Czech s.r.o. / Hospira Czech Republic s.r.o.

ZA PODPORY



Redigy Internet
<http://www.redigy.cz>

SOLEN
MEDICAL EDUCATION

OBSAH

HODGKINŮV LYMFOM I	2
WIEDERMANNNOVA PŘEDNÁŠKA	2
HODGKINŮV LYMFOM II	3
ERYTHROPOIESIS	3
KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ 1	6
LEUKEMIA AND LYMPHOMA	9
KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ 2	11
HODGKINŮV LYMFOM III	13
TRANSPLANTACE KRVETVORNÝCH BUNĚK	14
CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE A MYELOPROLIFERATIVNÍ NEMOC	18
KONFERENCE ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ 1	20
HODGKINŮV LYMFOM IV	22
MYELOYDYSPLASTICKÝ SYNDROM	24
MNOHOČETNÝ MYELOM	28
KONFERENCE ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ 2	32
NHL	35
AKUTNÍ LEUKÉMIE	38
CLL	42
VARIA	45

E-POSTERY

OŠETŘOVATELSTVÍ	49
TRANSPLANTACE	52
MDS	55
CML A MPN	60
MNOHOČETNÝ MYELOM	65
NHL	68
CLL	72
AKUTNÍ LEUKÉMIE	76
TRANSFUZNÍ PROBLEMATIKA	79

Sborník abstrakt vydalo

Vydavatelství UP Olomouc
 Univerzita Palackého v Olomouci
 Křížkovského 8
 771 47 Olomouc
 ISBN 978-80-244-4099-6
 Olomouc, 2014
 Neprodejná publikace
 1. vydání

Odpovědní redaktoři:

Doc. MUDr. Edgar Faber, CSc.
 Mgr. Václav Kajaba, Ph.D.

HODGKINŮV LYMFOM I

2511.

Epidemiologie, incidence a prevalence Hodgkinova lymfomu v ČR a ve světě

Mociková H. (Interní hematologická klinika, FNKV, Praha)

2519.

Biologické spektrum Hodgkinových lymfómů

Plank L. (Ústav patologické anatomie, JLF UK a UN v Martine a Martinské biotické centrum, s.r.o., Martin – SVK)

2547.

Postavení 18F-FDG PET/CT v určení stádia a hodnocení léčebné odpovědi u nemocných s Hodgkinovým lymfomem

Papajík T., Mysliveček M., Kapitáňová Z., Henzlová L. (Hemato-onkologická klinika, FNOL a LF UP, Olomouc; Klinika nukleární medicíny, FNOL a LF UP, Olomouc)

WIEDERMANNŮVA PŘEDNÁŠKA

Recent advances in management of Hodgkin's lymphoma

Engert A. (University Hospital of Cologne, Cologne – DEU)

Slavnostní přednáška k 1 000 provedených transplantací krvinek v Olomouci.

2623.

Dlouhodobé výsledky transplantací krvinek na Hemato-onkologické klinice v Olomouci

Faber E., Raida L., Szotkowská R., Rusiňáková Z., Skoumalová I., Navrátilová J., Divoká M., Horáková L., Marešová I., Papajík T., Procházka V., Jarošová M., Ščudla V., Bačovský J., Píka T., Minařík J., Mrázek F., Ambrůzová Z., Indrák K. (Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc; III. interní klinika – NRE, FN a LF UP, Olomouc; Ústav imunologie, LF UP, Olomouc)

Úvod: Program transplantací krvinek (TKB) byl na HOK FN Olomouc zahájen v březnu 1997 provedením první autologní (auto)TKB. První alogenní (alo)TKB od příbuzenského dárce pak byla provedena v roce 1999 a od nepříbuzného dobrovolného dárce v roce 2004. Během roku 2014 by měl celkový počet TKB překročit 1000 výkonů, což nás vede k bilancování uplynulých 17 let transplantačního programu.

Výsledky: Přehled počtů TKB podle základních diagnóz a typu TKB k datu přípravy souhrnu je uveden v tabulce. Během let docházelo ke změnám v podpůrné péči, bylo upuštěno od prevence fluorochinolonů. U autoTKB prováděných u lymfomů převládala snaha transplantovat vysoce rizikové pacienty v rámci primární léčby. Koncepte časné autoTKB v rámci primární léčby mnohočetného myelomu se zásadně neměnila, čtvrtina nemocných byla retransplantována při pozdější progresi onemocnění. Možnost oddálení první autoTKB zkoumá aktuálně probíhající randomizovaná studie. U aloTKB lze sledovat jednoznačný trend jejich indikačního rozšíření u starších pacientů, což vyplývá ze stále větších zkušeností s využitím přípravných režimů s redukovanou toxicitou. K aloTKB jsou také stále častěji indikováni pacienti s chronickou lymfocytární leukémií (CLL), nehodgkinskými lymfomy (NHL) nebo myelodysplastickými syndromy (MDS). V rámci obecného hodnocení dlouhodobě získávaných dat se celková úmrtnost na peri- a potransplantační komplikace (TRM) u autoTKB pohybuje pod 0,1 %. U aloTKB činila celková TRM 27 %, avšak v průběhu posledních 5 let již došlo k jejímu poklesu na 19 %. Budou prezentovány výsledky přežití pacientů s vybranými diagnózami.

Závěry: AutoTKB jsou v současnosti na našem pracovišti spojeny s minimálním rizikem TRM. Nárůst zkušeností, jež se promítá do specifického přístupu k nemocným, vede k neustálému poklesu jak TRM, tak celkové mortality po aloTKB a výsledky jsou stejně jako u autoTKB srovnatelné s domácími i zahraničními centry.

Poděkování: Podpořeno grantem UP LF-2014-001. Za podporu a spolupráci děkujeme Českému národnímu registru dárců dřeně v Plzni a nadaci HAIMAOM.

HODGKINŮV LYMFOM II

2525.

Léčba časných stádií Hodgkinova lymfomu

Král Z. (Interní hematologická a onkologická klinika, LF MU a FN, Brno)

2522.

Léčba pokročilých stádií Hodgkinova lymfomu

Marková J. (Interní hematologická klinika, FNKV a 3. LF UK, Praha)

2517.

Současný koncept léčby Hodgkinova lymfomu u dětí a dospívajících

Čepelová M., Novák Z., Bělohávek O., Kynčl M., Malinová B., Kodet R., Kabičková E., Drahokoupilová E., Kruseová J., Buriánková E., Starý J., Geierová M., Lukš A. (Klinika dětské hematologie a onkologie, FN Motol, 2. LF UK, Praha; Dětská klinika, FN, Olomouc; Oddělení nukleární medicíny a PET centrum, Nemocnice Na Homolce, Praha; Klinika zobrazovacích metod, FN Motol, 2. LF UK, Praha; Radioterapeuticko-onkologické oddělení, FN Motol, 2. LF UK, Praha; Ústav patologie a molekulární medicíny, FN Motol, 2. LF UK, Praha; PET centrum, FN, Olomouc; Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP, Olomouc)

2521.

Léčba starších nemocných s Hodgkinovým lymfomem

Procházka V., Papajík T., Indrák K. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Dedikace: IGA-LF-2014-001.

ERYTHROPOIESIS

2593.

Úloha hem oxygenázy 1 v erytroidní diferenciaci

Garcia-Santos Daniel, Horváthová M., Sheftel A., Poňka P. (Departments of Physiology and Medicine and Lady Davis Institute, McGill University, Montréal, QC – CAN; Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc – CZE)

Heme is essential for the function of all aerobic cells. However, it can be toxic when it occurs in a non-protein bound form; cells maintain a fine balance between heme synthesis and catabolism. The only physiological mechanism of heme degradation is by heme oxygenases (HO). The heme-inducible isoform, HO-1, has been extensively studied in numerous non-erythroid cells, but virtually nothing is known about the expression and potential significance of HO-1 in developing red blood cells. We have demonstrated that HO-1 is present in erythroid progenitors. However, we have also found, rather unexpectedly, that the expression of HO-1 increases during erythroid differentiation. Overexpression of HO-1 in erythroid cells impairs hemoglobin synthesis suggesting that this enzyme could play a role in some pathophysiological conditions such as an unbalanced globin synthesis in thalassemias. In contrast, HO-1 absence enhances hemoglobinization in cultured erythroid cells.

In conclusion, our results bring to light the importance of HO-1 expression for erythroid development and expand our knowledge about the fine regulation of hemoglobin synthesis in erythroid cells. Our findings indicate that HO-1 plays an important role as a co-regulator of the erythroid differentiation process. Moreover, HO-1 expression must be tightly regulated during red blood cell development. Considering the fact that erythroid cells need heme and can degrade “free” heme, as documented

in our study, these cells probably do not need to export heme as proposed by others (Quigley et al. Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis; Cell 118:757-766, 2004).

2630.

Hepcidin levels in Diamond-Blackfan anemia reflect erythropoietic activity and different treatment strategies

Pospíšilová D., Holub D., Zídová Z., Sulovská L., Houda J., Mihál V., Hadačová I., Radová L., Džubák P., Hajdúch M., Divoký V., Horvathová M. (Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital, Olomouc; Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc; Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc; Department of Pediatric Hematology and Oncology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, Prague; Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno)

Diamond-Blackfan anemia, a rare congenital red cell aplasia, is clinically and genetically heterogeneous disorder. Approximately one-third of patients develop transfusion-acquired iron overload. However, in contrast to anemias with ineffective erythropoiesis, the knowledge of the regulation of iron metabolism in Diamond-Blackfan anemia is limited. We evaluated selected markers of erythropoietic activity and iron status including the key regulator of iron homeostasis, hepcidin, in a cohort of Diamond-Blackfan anemia patients from the Czech National Diamond-Blackfan anemia Registry. We observed that hepcidin levels inversely correlate with erythropoietic activity and positively with ferritin and erythropoietin levels. In transfusion-dependent Diamond-Blackfan anemia patients, hepcidin levels were proportional to iron loading, suggesting the absence of an erythroid-derived suppressor of hepcidin synthesis. On the other hand, Diamond-Blackfan anemia patients receiving steroids or those in remission with restored erythropoiesis attenuated hepcidin expression. Elevated levels of growth differentiation factor 15 were associated with the presence of apoptotic erythroblasts in the bone marrow of Diamond-Blackfan anemia patients but did not correlate with hepcidin or hepcidin-ferritin ratio. Our data suggest that diverse levels of hepcidin and iron overload in Diamond-Blackfan anemia patients reflect the variable erythropoietic activity in their bone marrow. It remains to be addressed whether this heterogeneity is, besides different treatment strategies, underlined also by different disease-causing mutations.

This work was supported by grant No. NT/11059 (Ministry of Health, Czech Republic) and partially by grants No. LF_2013_010 and LF_2013_015 (Internal Grant Agency of Palacky University). DH, PD and M Hajduch were supported by CZ.1.05/2.1.00/01.0030 (Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic), M Horvathova, LS, and VD were supported by NT/13587 (Ministry of Health, Czech Republic) and M Horvathova and VD partially by P305/11/1745 (Czech Science Foundation). LR was supported by 306242 NGS-PTL (the FP7 grant).

2584.

JAK2 E846D zárodočná mutácia asociovaná s erytrocytózou spôsobuje zvýšenú a predĺženú aktiváciu STAT5

Kapralova K., Horvathova M., Kucerova J., Pospíšilová D., Leroy Emilie, Constantinescu S. N., Divoký V. (Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc – CZE; Department of Pediatrics, University Hospital and Faculty of Medicine and Dentistry, Olomouc – CZE; Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels – BEL; Université catholique de Louvain, de Duve Institute, Brussels – BEL)

The role of somatic JAK2 mutations in clonal myeloproliferative neoplasms has been well established. Recently, germline JAK2 mutations were associated with polyclonal hereditary thrombocytosis. Here we studied a patient with congenital erythrocytosis who inherited two heterozygous mutations, E846D in JAK2 from the mother and Q157H in PHD2 from the father. In vitro, the patient's as well as the parents' erythroid progenitors exhibited erythropoietin (EPO) hypersensitivity. Using a cellular model we characterized mechanisms by which JAK2 E846D contributes to erythrocytosis. We observed similarities between JAK2 E846D-mediated signaling and signaling induced by erythropoietin receptor gain-of-function mutations found in primary familiar and congenital polycythemia; the mutation causes prolonged EPO-induced phosphorylation of JAK2 and STAT5 and

promotes EPO-induced cell cycle progression and survival at low EPO concentrations. In silico analyses of the impact of JAK2 E846D predicted prolonged kinase activation after cytokine stimulation and showed that E846 belongs to a region in space where exon 12 mutations in polycythemia vera or mutations in hereditary thrombocytosis were reported. Our study also suggested that for its full phenotypic expression, the JAK2 E846D mutation requires cooperation with an additional lesion. We demonstrate, that this cooperative mechanism is an inappropriately increased signaling mediated by hypoxia sensing pathway. Acknowledgements.

This work was supported by Czech Science Foundation Project P301/12/1503 (PI Divoky), Czech Ministry of Health Project NT13587-4, and partially by Education for Competitiveness Operational Programme project CZ.1.07/2.3.00/20.0164 and Palacky University (LF_2014_011).

2536.

Two novel missense mutations in PIEZO1 in six patients with dehydrated hereditary stomatocytosis – implications for genotype-to-phenotype correlation

Kořalková P., van Wijk R. (Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc – CZE; Department of Clinical Chemistry and Haematology, University Medical Center Utrecht, Utrecht – NLD)

Hereditary stomatocytosis is a rare cause of hereditary hemolytic anemia. It concerns a heterogeneous group of disorders characterized by altered cellular hydration state. Dehydrated hereditary stomatocytosis (DHSt), also known as hereditary xerocytosis, is among this group of so called channelopathies of the red blood. It is an autosomal dominant disorder and recently mutations in PIEZO1 have been linked to this disease. PIEZO1 encodes a mechanosensitive ion channel protein. As result of mutation DHSt red blood cells exhibit impaired potassium and sodium balance leading to their dehydration. DHSt is characterized by mild to moderate hemolytic anemia and may present with pseudohyperkalemia and perinatal edema. We here describe the molecular characterization of six DHSt patients from three unrelated families. All patients exhibited mild to moderate macrocytic hemolytic anemia. DHSt was established using osmotic gradient ektacytometry by Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LoRRca, Mechatronics, Hoorn, The Netherlands) showing a characteristic left shift of the curve. Subsequent DNA analysis revealed four different mutations in PIEZO1, two of which were novel (Table, novel mutations in bold). The two novel mutations c.6262C>G and c.1276C>T both segregated with disease in the respective families. Furthermore, both Arg2088 and Cys426 concern residues that are highly conserved in PIEZO1 (<http://genome.ucsc.edu/>). Moreover, in silico analysis by PolyPhen and SIFT predict that substitution with, respectively, glycine and arginine is not tolerated. Therefore, we conclude that both mutations underlie the observed phenotype of DHSt in the concerning families. Interestingly, the p.(Cys426Arg) mutation is the most N-terminal mutation identified so far in PIEZO1. Intriguingly, a second mutation was identified in patient 2 from family 1. This mutation predicts the deletion of one out of four lysine residues between amino acids 2166-2169, and was previously reported in association with DHSt. The mutation was inherited from the patient's mother who was completely asymptomatic and hematologically normal. Notably, the clinical phenotype of patient 1 was more severe when compared to that of his brother (patient 3) and father (patient 1). Altogether, these findings suggest a complex genotype to phenotype relationship between PIEZO1 mutations and the DHSt phenotype.

Supported by the grant IGA_LF_2014_011 (Internal Grant Agency of Palacky University).

2622.

Hodgkinův lymfom v přehleduVokurka S. (*Hemato-onkologické odd., FN, Plzeň*)

Hodgkinův lymfom (HL) je zhoubné nádorové onemocnění lymfatických uzlin. Typickým histologickým znakem nádoru je přítomnost Hodgkinových a Sternberg-Reed(ové) buněk. Příčina rozvoje není zcela jasná, význam mají genetické vlivy, imunitní poruchy a také nejspíše virové infekce (Einstein-Barrové - EBV virus). HL představuje 1 % všech nádorů, onemocní 2–3 pacienti z 100 000 obyvatel, častěji mladší muži věku 20–30 let, ale i starší. Hlavním projevem jsou zvětšené uzliny většinou v horní polovině těla, mohou být nevysvětlitelné horečky, noční pocení, hubnutí, svědění kůže, bolest uzlin po alkoholu. V detekci lokalizace lymfomu, určení jeho rozsahu a na určení výsledku léčby se významně uplatňuje PET/CT vyšetření. Hodgkinův lymfom je léčitelný chemoterapií a radioterapií, přičemž složení konkrétních léčebných protokolů závisí především na stádiu (rozsahu) nemoci a rizikových faktorech. Časná stádia (st. I. – II.) využívají kombinace menšího počtu cyklů chemoterapie (2–4) a ozáření. Pokročilá stádia (III. – IV.) jsou léčena více cykly chemoterapie (4–6) a ozáření jen do případně zbytkové nádorové masy. Standardní režimy chemoterapie pro léčbu HL jsou ABVD (adriamycin, bleomycin, vinblastin a dakarbazin) nebo intenzivní BEACOPP (bleomycin, etoposid, adriamycin, cyklofosamid, vincristin, prokarbazin a prednison). U pacientů s nepokročilou nemocí lze dosáhnout vyléčení u 90 %, u pokročilé nemoci je úspěšnost přibližně 80 %. Osud pacientů se vstupně špatnou léčebnou odpovědí je nepříznivý. Lymfom může recidivovat, nejčastěji do tří let. Komplikací léčby jsou dlouhodobé následky – poruchy gonád, sekundární malignity, plicní a kardiovaskulární postižení a dysfunkce štítné žlázy. Pravděpodobnost stavu bez sekundární malignity v době do 15 let po léčbě HL se pohybuje okolo 87 %.

2576.

Management používání PICC katétrů v MOÚŠýkorová Z., Kocourková J. (*Masarykův onkologický ústav, Brno*)

Sestry se v moderní ošetrovatelské péči stále častěji setkávají s novým typem centrálního žilního vstupu, zavedeným z periferie tzv. PICC. Tento katétr, společně s portem, patří mezi dlouhodobé žilní vstupy. Použití PICC u onkologických pacientů přináší proti použití tradiční „flexily“ zvýšenou míru bezpečí a prevence extravazace při aplikaci cytostatik. Prezentace shrnuje organizační a ošetrovatelskou agendu, porovnává indikace k zavedení PICC a portu, definuje specifika péče o tento typ katétru. Detailně pojednává o vedení dokumentace v nemocničním informačním systému a Průkazu pacienta. Součástí sdělení je kazuistika a analýza komplikací u souboru 52 pacientů. V závěru prezentace jsou shrnuty kompetence a úkoly sestry v péči o PICC od teoretické přípravy přes vlastní ošetrovatelskou péči, edukaci pacienta a rodiny až po dokumentaci.

2533.

Význam kryoterapie dutiny ústní a výskyt mukositivity dutiny ústní a gastrointestinálního traktu po vysokodávkované chemoterapiiŠemrová L., Němcová A., Brandejsová R., Bystřická E., Chvojková I., Vokurka S. (*Hematologicko-onkologické oddělení, Autologní JIP, FN, Plzeň; Hematologicko-onkologické oddělení, FN, Plzeň*)

Úvod: Mukositivity dutiny ústní (MDÚ) a GIT je významná komplikace po autologní transplantaci kostní dřeně.

Cíl: Ověřit výskyt MDÚ, GIT a možnost ovlivnění kryoterapií. Metodika: Prospektivně bylo sledováno celkem 245 pacientů po autologní transplantaci krvinek. Po léčbě Melphalanem bylo 161 a po BEAMu bylo 84 pacientů. Kryoterapii nemělo prvních 154 pacientů, protože ta byla kompletně zavedena do ošetrovatelského protokolu až v r. 2009. Sledoval se výskyt MDÚ a mukositivity GIT (průjmovité stolice po transplantaci bez průkazu infekčního agens), potřeba analgetik (např. tramadol) a i.v. ATB.

Výsledky: MDÚ byla častěji u pacientů po BEAM 41 % než po Melphalanu 26 % ($p=0,01$). Více u žen (48 %) než mužů (36 %) ($p=0,05$). U mukositivity GIT byl výskyt procentuálně podobný – po

BEAMu byla u 56 % a po Melphalanu u 36 % pacientů ($p=0,002$). U žen opět více 47 % oproti mužům 28 % ($p=0,003$). Pacientů s kryoterapií bylo celkem 91. MDÚ se vyskytla u 33 %. Bez kryoterapie jich bylo 154 a MDÚ vznikla u 68 % ($p=0,0001$). Doba trvání MDÚ byla 1,8 (1–14) vs. 4,7 (1–24) dne ($p=0,0001$). Léčba bolesti MDÚ analgetiky u pacientů s kryoterapií byla u 6,5 %, bez kryoterapie u 23 % (0,008). Potřeba i.v. ATB byla u obou skupin stejná 62 % vs. 60 % ($p=0,59$). Výskyt febrilií v neutropénii bez jasné etiologie bylo u obou skupin téměř srovnatelné: 32 % vs. 37 % ($p=0,48$). Rozdíly mezi skupinami ve věku, pohlaví a délce útlumu krvetvorby nebyly žádné.

Závěr: MDÚ a GIT má obdobný průběh. Ženy a protokol BEAM jsou rizikovější skupinou k výskytu MDÚ. Kryoterapií DÚ výrazně snižujeme obtíže spojené s mukositivity. Spotřeba analgetik je tak nižší. Bohužel však nemá vliv na snížení výskytu febrilií v neutropénii a redukci ATB. Nejspíš proto, že zůstává výrazně postižena sliznice GIT mukositivity, kterou nelze v současné době ovlivnit.

2655.

Dekubity, aneb umíme je správně zhodnotit?Křpatová J. (*Klinika nemocí kožních a pohlavních, FN a LF UK, Hradec Králové*)

Dekubitus je místní buněčné poškození tkáně, vzniká v důsledku přímého tlaku, tření, imobility a celkového zhoršeného stavu pacienta. Dekubitus postihuje kůži, svaly, šlachy až kost. Sestra musí umět správně najít a popsat problém pacienta a dekubitus pro nás znamená ošetrovatelský problém. V poslední době je snaha hovořit o problému vzniku dekubitů, o jejich terapii a zejména o prevenci dekubitů nejen mezi zdravotníky, ale i mezi laickou veřejností a je snaha s tématem prevence seznámit i politiky z důvodu potřeby vynakládání větších finančních prostředků právě na preventivní opatření. Evropský poradní panel pro dekubity – EPUAP šíří osvětu mezi světovou populaci, říká, že je to historický a mezinárodní problém, že dekubity jsou nežádoucí a lze jim velice dobře předcházet. Tato organizace vznikla před 15-ti lety v Londýně, aby spojila vědce s cílem „Zajistit úlevu lidem s dekubitem nebo těm, kteří jsou v riziku ohrožení vznikem dekubitu“. Česká republika se také zapojila do boje s dekubity, s pomocí ČAS byly přeloženy materiály, letáky, které jsou šířeny mezi laickou veřejností i zdravotníky. Dne 21. listopadu loňského roku proběhl světový den „STOP“ dekubitům. Dekubity a jejich sledování je jedním z indikátorů kvality sledovaných v naší nemocnici a bohužel jsme dospěli k názoru, že ne všichni zdravotníci dokáží správně zhodnotit stadium dekubitu a proto jsme se rozhodli s proškolením zdravotníků v této tematice.

2589.

Kontakt s pozůstalými v prostředí fakultní nemocniceGrossová Klementová R., Zítková M. (*Klinika nemocí plicních a TBC, FN, Brno; Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno*)

Úvod: Ošetrovatelský personál není v současné době systematicky školen ve složité a citlivé problematice, jakou bezesporu komunikace s pozůstalými je. Poslední čas, který zdravotničtí pracovníci věnují zemřelému a pozůstalým a zejména způsob, jakým personál realizuje komunikaci, jeho vyjádřená všímavost, takt i nabídnutí pomoci jsou faktory, podle kterých je hodnocena kvalita péče. Proto byl v roce 2013 ve FN Brno zahájen projekt s názvem Metodika kontaktu nelékařských zdravotnických pracovníků (NLZP) s pozůstalými. Tento projekt je „Podpořen MZ ČR-RVO (FNBR, 65269705)“. Metoda V rámci první fáze projektu jsme se soustředily na získání informací týkajících se jednotlivých aspektů realizovaného kontaktu NLZP s pozůstalými v prostředí FN. Data byla získána pomocí anonymního nestandardizovaného dotazníku v rozsahu 25 otázek. Získaná data byla zpracována pomocí statistických metod.

Výsledky: Sledovaný soubor tvořilo 105 respondentů. Ze šetření byli vyřazeni 4 respondenti, kteří uvedli, že nemají praktickou zkušenost s předáváním pozůstalosti. Praktikovaný způsob předávání osobních věcí pozůstalým vnímá jako vhodný 60 % dotázaných, 36,2 % jej hodnotí jako nevhodný. 37,9 % NLZP nevhodnost vidí v nevhodném prostředí, 24,1 % v nedostatku soukromí, shodně 17,2 % vnímá jako nevhodné nedostatky klidu a praktikované uložení věcí. 3,4 % uvedlo obtížnost pro pozůstalé. Obsah rozhovoru NLZP s pozůstalými je dle vyjádření respondentů tvořen: 7,6 % se věnuje pouze formálním záležitostem a předání věcí, 28,6 % uvádí navíc realizaci pohovoru a 63,8 % uvádí kromě výše zmíněného ještě pomoc a radu pozůstalým. Průměrný čas věnovaný formálním záležitostem při kontaktu s pozůstalými byl respondenty uveden v délce 14,9 minut (me-

dián 15 min., 2 a max. 60 minut). Čas věnovaný následnému rozhovoru byl zjištěn dlouhý v průměru 8,75 minut (medián 5, min. 0, max. 30 minut). Dle vyjádření respondentů pozůstale nejvíce zajímavá jak vyřídít pohřeb v 43,0 %, jak probíhalo umírání uvedlo jako často kladenou otázku pozůstalými 23,4 % respondentů, 14,8 % se ptá na uložení cenností a 11,0 % dotázaných uvedlo nejčastější otázku na umístění těla zemřelého.

Závěr: Pro pozůstalé, které ztráta blízké osoby vždy velmi bolestivě zasáhne, je velmi důležité, aby krátký rozhovor s ošetřovatelským pracovníkem byl maximálně využit k pomoci pozůstalým. Také předání osobních věcí by mělo probíhat eticky a s taktem tak, aby bylo možné předejít dalším, možná někdy i zbytečným traumatům pozůstalých.

2569.

Rizikové a protektivní faktory syndromu vyhoření u všeobecných sester

Vévoda J., Ježorská Š. (Ústav společenských a humanitních věd, FZV UP, Olomouc)

Mezi faktory ovlivňující fluktuaci všeobecných sester patří mimo syndrom vyhoření i nízká motivace a nízká pracovní spokojenost. Pro snížení fluktuace je vhodné sledovat, jak se tyto faktory vzájemně ovlivňují. Cílem výzkumu bylo zjištění míry syndromu vyhoření, zátěže, sociální opory, poznání osobních priorit faktorů pracovního prostředí všeobecných sester, vnímání naplňování těchto priorit a jejich vzájemného vztahu u všeobecných sester pracujících ve fakultních nemocnicích. Ke zjištění vzájemných vztahů mezi proměnnými byl zvolen kvantitativní přístup. Data byla získávána baterií dotazníků, kterou tvořil standardizovaný dotazník MBI (Maslach Burnout Inventory), OSI-R (Inventoriám zaměřenaneckého stresu) a dotazník vlastní konstrukce vytvořený na principech Herzbergovy motivační teorie. Respondenti byli vybráni na základě prostého záměrného výběru s jediným kritériem. Výběrový soubor tvořilo 1 845 všeobecných sester pracujících ve Fakultní nemocnici Olomouc (708) a Všeobecné fakultní nemocnici Praha (1 137). Ve vysokém stupni emočního vyčerpání se nacházelo 756 sester a 531 bylo ve vysokém stupni depersonalizace. Jak výzkum odhalil, na vniku syndromu vyhoření se podílí přetížení v roli sestry, což potvrzuje signifikantní pozitivní vztah mezi mírou vyhoření a mírou zátěže (přetížení, $r = 0,204$ $p < 0,01$). Ukázalo se, že faktor pracovní spokojenosti – mzda signifikantně neovlivňuje vznik syndromu vyhoření. Jako významný protektivní faktor vyhoření působí sociální opora, neboť byla zjištěna existence signifikantního vztahu mezi mírou syndromu vyhoření a mírou sociální opory ze strany spolupracovníků (peer-support, $r = -0,335$ $p < 0,01$). Na žebříčku osobních preferencí všeobecných sester mají nejvyšší pracovní hodnotu faktory mzda, péče o pacienty a jistota pracovního místa. Mezi nejvíce divergující faktory osobních preferencí a jejich vnímané saturace patřila mzda a jistota pracovního místa. Výsledky potvrzují protektivní vliv saturace určitých faktorů pracovního prostředí. Výzkum prokázal význam sociální opory jako protektivního faktoru ve vztahu k syndromu vyhoření. Rostoucí vnímání saturace faktoru péče o pacienty a zvyšující se míra sociální opory a působí na snížení míry vyhoření u všeobecných sester. Dedikováno Studentské grantové soutěži Univerzity Palackého v Olomouci: Motivační faktory pracovního prostředí u všeobecných sester pracujících ve Fakultní nemocnici Olomouc a Praha (FZV_2014_009).

2628.

Příprava dárce a odběr krveotvorných buněk pro alogenní transplantaci – ošetřovatelská péče

Hlínková P., Sůvová J., Březinová I., Bystřická E. (Hematologicko onkologické oddělení, FN, Plzeň)

Téma naší prezentace se týká problematiky ošetřovatelské péče o nepřibuzného dárce krveotvorných buněk. Odborná a kvalitní péče musí být dárci poskytována od prvních kroků, které začínají vyhledáváním dárce, až po poslední, kterým je propuštění dárce z hospitalizace. Ošetřovatelská péče o dárce krveotvorných buněk má svá specifika. Odběr krveotvorných buněk je možný provádět dvěma způsoby – z lopaty kosti kyčelní v celkové anestezii nebo separací buněk z periferní krve po předchozí přípravě růstovým faktorem granulopoézy. Oba způsoby odběru představují pro dárce určitá rizika. Tomu je nutné přizpůsobit ošetřovatelskou péči. Týká se to nejen oblasti péče o fyzické potřeby, ale zejména o psychickou pohodu dárce. Ošetřovatelská péče musí zabezpečovat minimalizaci rizika vzniku nežádoucích reakcí a potíží, které mohou u dárce nastat ve spojení s darováním transplantátu. Důkladná a opakovaná edukace dárce před odběrem i po odběru krveotvorných buněk, trpělivost a empatie personálu přispívá velkou měrou k úspěšnému zvládnutí celého procesu dárceotvornosti.

LEUKEMIA AND LYMPHOMA

Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms

Cross N.C.P. (Southampton, UK)

2632.

The effect of L-asparaginase on mTORC1 pathway in leukemic cells.

Heřmanová I., Vališ K., Nůšková H., Houštek J., Carracedo A., Trka J., Starková J. (Childhood Leukaemia Investigation Prague, Department of Pediatric Hematology/Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague – CZE; Laboratory of Molecular Structure Characterization Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague – CZE; Department of Bioenergetics, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague – CZE; CIC bioGUNE, Technology Park of Bizkaia – ESP; Ikerbasque, Bilbao – ESP)

L-asparaginase (L-asp) is one of the key components used in the therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). This enzyme depletes extracellular asparagine and glutamine. Our aim was to elucidate the mechanism underlying the cytotoxic effect of L-asp. Our previous results showed that L-asp inhibits mTORC1 targets regulating mRNA translation. Moreover, L-asp induced metabolic reprogramming in favor to fatty acid oxidation (FAO). In our current work we studied the effect of L-asp on mTORC1, metabolism and connection between these two processes. Recent studies identified mTORC1 as a regulator of de-novo pyrimidine synthesis through carbamoyl-phosphate synthetase (CAD). We detected dephosphorylation of CAD in L-asp treated ALL cell lines and ALL primary samples, indicating decrease of de-novo pyrimidine synthesis. This result was confirmed by analysis of metabolites of the pyrimidines by UPLC-ToF-MS. L-asp caused significant decrease of N-Carbamyl-aspartate, uridine monophosphate and uridine in ALL cell lines. Autophagy, a catabolic process important in nutrient limited conditions is increased during mTORC1 inhibition. We measured the marker of autophagy LC3 in ALL cell lines and primary samples treated with L-asp. There was an increase of LC3II, confirming our previous results that the depletion of asparagine and glutamine in leukemic cells triggers nutrient turnover. Next, we wanted to elucidate whether L-asp inhibits mTORC1 through RagB, the key protein mediating response to general amino acid deprivation and if there is a connection between mTORC1 pathways and metabolism. We have established leukemic cell line with overexpressed RagB wild type and mutant using lentiviral transduction. This mutation causes constitutive activation of mTORC1 pathway despite deprivation of amino acids. RagB mutation prevented mTORC1 inhibition by L-asp. Interestingly, RagB mutant cells maintained similar metabolic response to L-asp treatment as wild type cells. Importantly, we have optimized doses of mTORC1 inhibitor, rapamycin that potentiates the cytotoxic effect of L-asp in leukemic cell lines. In conclusion, L-asp inhibits de-novo DNA synthesis, protein translation and activates autophagy all through mTORC1. Metabolic processes on the other hand are RagB-mTORC1 independent. Moreover, apoptotic effect of L-asp is enhanced by mTORC1 inhibitor. Our results open new strategies in treatment of ALL patients resistant to L-asp. GAUK 632513, IGANT12429, UNCE204012

2616.

CBFB-MYH11 hypomethylation signature and PBX3 differential methylation revealed by targeted bisulfite sequencing in patients with acute myeloid leukemia

Hájková H., Hsi-Yang Fritz M., Haškovec C., Schwarz J., Šálek C., Marková J., Krejčík Z., Dostálová Merkerová M., Kostečka A., Vostrý M., Fuchs O., Michalová K., Cetkovský P., Beneš V. (ÚHK, Praha – CZE; European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg – DEU; Centrum onkocytogenetiky VFN, Praha – CZE)

Background: Studying DNA methylation changes in the context of structural rearrangements and point mutations as well as gene expression changes enables the identification of genes that are important for disease onset and progression in different subtypes of acute myeloid leukemia (AML) patients. The aim of this study was to identify specific methylation and expression profiles in AML patients with different molecular background and clinical status, and to find differentially methylated genes with potential impact on AML pathogenesis based on the correlation of methylation and expression data. Methods: The primary method of studying DNA methylation changes was targeted

bisulfite sequencing capturing approximately 84 megabases (Mb) of the genome in 14 diagnostic AML patients and a healthy donors' CD34+ pool. Subsequently, selected DNA methylation changes were confirmed by 454 bisulfite pyrosequencing in a larger cohort of samples. Furthermore, we addressed gene expression by microarray profiling.

Results: Here, we report a novel hypomethylation pattern, specific to CBFB-MYH11 fusion resulting from inv(16) rearrangement that is associated with genes previously described as upregulated in inv(16) AML – namely MN1, SPARC, ST18, DHRS3, FAM171A and BAHCC1. We assume that this hypomethylation occurs in genes whose overexpression is crucial to inv(16) leukemogenesis. Further by comparing targeted methylation and microarray expression data, PBX3 differential methylation was found to correlate with its gene expression. PBX3 has been recently shown to be a key partner of HOX genes during leukemogenesis. This is the first study showing that differential methylation of an area located downstream of the PBX3 transcription start site is associated with levels of PBX3 expression.

Conclusions: Altogether, our results demonstrate the potential of the targeted approach for DNA methylation studies to reveal new regulatory regions involved in leukemic pathogenesis. This study was supported by the project (Ministry of Health, Czech Republic) for conceptual development of research organization (00023736, IHBT).

2552.

Correlation of CEBP α status, aberrant expression of CD2 antigen and molecular genetic subtype in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia

Slámová L., Starková J., Fišer K., Froňková E., Rezková Řezníčková L., Kubříčanová-Žaliová M., Polgárová K., Stary J., Trka J., Hrušák O., Mejstříková E. (Department of Pediatric Hematology and Oncology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, Prague)

CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBP α) is a transcription factor involved in myeloid differentiation, artificial reprogramming. CEBP α gene can be regulated through DNA methylation. Recently we identified a rapid transdifferentiation into monocytic lineage in part of CD2pos patients with B cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) together with demethylation status of CEBPA promoter. We hypothesized that transdifferentiation depends on expression of cytokine receptors for GM-CSF, M-CSF. Only limited data are available regarding CEBPA promoter methylation and gene expression in BCP-ALL. Bisulfite sequencing was designed for 24 CpG dinucleotides of CEBPA promoter, localized from -295 to -593bp upstream of the TSS. Methylation status of CEBPA promoter was analyzed in five subtypes of BCP-ALL: MLL gene rearranged, hyperdiploid, mBCR-ABLpos, ETV6-RUNX1pos, other BCP-ALL (no hyperdiploidy, MLL gene rearrangement, BCR-ABL or ETV6-RUNX1 fusion gene). Hypermethylation of CEBPA promoter was found in MLL-rearranged, hyperdiploid, ETV6-RUNX1pos BCP-ALL (5/5, 6/6, 4/6). CEBPA promoter was hypomethylated in mBCR-ABLpos (5/5). In other BCP-ALL we detected both hypermethylation (10/39) and hypomethylation of CEBPA promoter (29/39). Significant association between aberrant expression of CD2 antigen and hypomethylated status of CEBPA promoter was found (Fisher exact test, $p < 0.0001$). Transdifferentiation during the early phase of the treatment was discovered in part of CD2pos BCP-ALL (7/16). Hypomethylation in promoter is generally associated with increased level of gene expression this was true for all BCP-ALL except MLL rearranged and BCR-ABLpos (high expression despite hypermethylation in MLL rearranged and low expression despite hypomethylation BCR-ABLpos). Increased expression of mRNA transcript of GM-CSF, M-CSF receptors was found already at diagnosis in CD2pos. During the therapy we proved protein expression of GM-CSF, M-CSF on blasts undergoing transdifferentiation.

Conclusions: Methylation status of CEBPA promoter differs in genetic subtype of BCP-ALL. Level of methylation of CEBPA promoter inversely correlates with CEBP α expression in all BCP-ALL except MLL rearranged, BCR-ABLpos. Hypomethylation of CEBPA promoter in other BCP-ALL correlates with aberrant expression of CD2 antigen on blasts, increased gene expression of CEBP α , GM-CSF, M-CSF and transdifferentiation.

Supported by: GAČR P301/10/1877, GAČR P304/12/2214, GAUK 914613, UNCE 204012, NT13462, NT12397-4

2539.

MicroRNA miR-150 Regulates B-cell Receptor Signaling (BCR) and Disease Aggressiveness in Chronic Lymphocytic Leukemia

Mraz M., Kipps J. T. (Moore Cancer Center, University of California, San Diego, CA – USA; Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno – CZE; Dept of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital, Brno – CZE)

Introduction: The expression of miRNAs is known to associate with biology of CLL (Calin et al. NEJM, 2005; Mraz et al. Blood, 2012; Mraz et al. Leukemia, 2009). In this study we screened for abundantly expressed miRNAs in CLL cells (TaqMan miRNA Cards, 750 miRNAs) hypothesizing that miRNAs with strong expression are more likely significantly involved in the regulation of key cell functions.

Results: We identified miR-150 as the most abundant miRNA in CLL cells, and observed that its lower levels associated with unmutated IGHV, ZAP-70 positivity and stronger response to stimulation of BCR with anti-IgM ($P < 0.05$). To describe the genes regulated by miR-150 we performed transcriptome analyses of 100 CLL samples. This identified low expression of 2 genes with evolutionary conserved binding sites for miR-150 (GAB1 and FOXP1) in CLL cells expressing its high levels. The immunoblot analysis of GAB1 and FOXP1 confirmed their higher protein levels in cases with low miR-150 expression ($P < 0.005$) and the transfection of CLL cells with artificial miR-150 led to GAB1/FOXP1 down-regulation. The cloning of GAB1/FOXP1 3UTRs in to luciferase vectors evidenced direct regulation of these genes by miR-150. GAB1 is an adaptor molecule is required for amplification of PI3K signaling after BCR stimulation (Ingham et al. 2001). FOXP1 is a transcription factor implicated in B cell development and the progression of several B-cell lymphomas (Hu et al. 2006). Importantly, the silencing of GAB1 by siRNA in cell lines directly decreased their responsiveness to BCR crosslinking, and affected pAkt levels. CLL cells with higher expression of GAB1 or FOXP1 were more responsive to BCR stimulation in vitro and higher expression of each associates with shorter overall survival (OS) (13.9 vs. 22.7 yrs, 13.9 vs. 21.1 yrs; $N = 154$; $P < 0.05$). Most notably, a reverse trend was observed for miR-150, where higher levels were associated with significantly longer OS (not-reached vs. 13.9 yrs, $N = 154$, $P = 0.006$) in a multivariate analysis, which included other 8 routinely used prognostic markers. These results represent the first example of BCR-signaling being regulated by a miRNA in the biology of B cells. The investigation of miR-150 role in other B cell malignancies is ongoing.

Supported by: EHA Research Fellowship award; SoMoPro II Programme; IGA MZ CR NT11218-6/2010; CZ.1.07/2.4.00/17.0042; CZ.1.07/2.3.00/30.0009; co-financed from EU, South-Moravian region and Czech Rep.

KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ 2

2658.

Zdravotnická dokumentace z pohledu práva, kazuistiky z praxe
Šustek P., Šíroková L. (Centrum zdravotnického práva, PrF UK, Praha)

2656.

Poškození fertility a možnosti jejího řešení u hematoonkologických pacientů

Šmardová L., Huser M., Michalka J., Žáková J., Janíková A., Črha I., Král Z., Ventruba P., Mayer J. (Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; Gynekologicko-porodnická klinika, FN, Brno)

2595.

Výskyt ran v rámci komplexní onkologické péče

Marečková J., Zítková M., Valentíková N. (Interní hematologická a onkologická klinika, LF MU a FN, Brno; Katedra ošetřovatelství, LF MU, Brno)

Úvod: V rámci léčby onkologických pacientů dochází ke vzniku různých rozsáhlých kožních ran, a to jak akutních, tak chronických. Významnou oblastí porušení integrity kůže jsou rány vzniklé v souvislosti s chirurgickým zákrokem či v souvislosti se základním onkologickým onemocněním tzv. maligních ran. Cílem

kvalitní ošetrovatelské péče je především zajištění co nejoptimálnějšího hojení vzniklých ran. Z důvodu zmapování významných oblastí a faktorů souvisejících s výskytem ran u hematoonkologicky a onkologicky nemocných byla provedena naše studie. Metodika: V období od 2/2012 do 5/2013 byla realizována prospektivní monocentrická deskriptivní studie zaměřená na výskyt kožních ran u nemocných léčených na konkrétním pracovišti. Do sledování bylo zařazeno 547 případů kožních ran. Data byla zaznamenávána do protokolu hodnocení kožní rány. Z následného zpracování bylo vyřazeno 36 případů z důvodu nedostatečného vyplnění dokumentace. Data byla následně zpracována statistickými metodami.

Výsledky: Do analýzy bylo zařazeno 511 případů ran (100 %). Nejčastěji byly zaznamenány rány vzniklé v souvislosti s chirurgickou intervencí či operačním výkonem (35 %), dále 15 % tvořily povrchové kožní léze, 14 % rány v souvislosti s drenážemi a shodně 11 % se vyskytly stomie a poruchy integrity kůže. 10 % tvořily rány ostatní. Výskyt maligních ran byl u 4 % a radiální rána zaznamenána nebyla. 66 % případů ran bylo zachyceno ve stupni poškození neblednoucí hyperémie, u 16 % ran došlo k zasažení podkožní tukové vrstvy a u 12 % ran byl zjištěn vřed. Nejčastější lokalizací rány se ukázala plocha břicha 25 %, 16 % dolní končetiny, 13 % hrudník. Rány byly zaznamenány v průměru 5 den hospitalizace (medián 2 dny, min. 0, max. 63). Kruskal-Wallisovým testem byly potvrzeny statisticky významné rozdíly u dne vzniku rány a typem rány pooperační a maligní ($p=0,000$). Dále byl potvrzen vztah mezi základní diagnosou solidní nádory a velikostí zachycené kožní rány ($p=0,004$). Pearsonovým chí-kvadrátem byl potvrzen vztah mezi typem rány a podávanou nutriční podporou ($p=0,000028$) i celkovým nutričním stavem dle nutričního skóre ($p=0,00274$).

Závěr: Realizovaná analýza ukázala, že péče o rány představuje v rámci komplexní ošetrovatelské péče u onkologicky nemocných významnou oblast. Zdůrazňuje se tím fakt, že péče o onkologicky nemocné klade na ošetřující personál velmi vysoké odborné nároky. V rámci zajištění vysoké kvality péče je velmi vhodné se této oblasti péče i nadále podrobněji věnovat.

2621.

Příprava pacienta a odběr krevetvorných buněk pro autologní transplantaci

Vodičková P., Výrutová R., Bystřická E. (HOO, FN, Plzeň)

Autologní transplantační léčba znamená rychlý postup vedoucí k úplnému zničení nebo k maximální redukci počtu nemocných buněk. Prvním krokem pro provedení tohoto terapeutického postupu je sběr potřebného počtu kmenových krevetvorných buněk, a to podle typu onemocnění a předpokládaného počtu transplantací. S tímto cílem se podává přípravná chemoterapie s následnou aplikací leukocytárního růstového faktoru. Přibližně 10 dnů od podání přípravné chemoterapie dojde, po předchozím poklesu, k následnému vzestupu bílých krvinek, při němž se do periferní krve vyplavují také kmenové krevetvorné buňky, které jsou jinak vázané na struktury kostní dřevě. V době vzestupu leukocytů přichází optimální čas k zahájení sběru kmenových krevetvorných buněk. K tomuto účelu se dnes využívá speciální přístroj–separátor, do nějž se kontinuálně přivádí krev ze žíly a ta se po centrifugaci zase vrací nemocnému zpět do žíly. V centrifuze se krvinky rozdělí dle své specifické hmotnosti a přístroj pak odsává pouze tu vrstvičku, v níž jsou přítomny jednojaderné buňky, mezi které patří i buňky kmenové. Jejich počet ve sběrném vaku se ještě před zmrazením určuje prostřednictvím speciálního laboratorního měření. V tomto příspěvku autorky prezentují péči o pacienta před odběrem a dále pak v průběhu přístrojového odběru krevetvorných buněk. Zmiňují též stručně problematiku zpracování a uskladnění produktu.

2629.

Transplantační léčba očima našich pacientů

Vítková J., Škrobánková A., Faber E., Labudíková M. (HOK, FN, Olomouc)

Letos uplyne 17 let od zahájení transplantačního programu na naší jednotce, současně očekáváme tisíce transplantací, což nás vede k bilancování výsledků. První transplantace byla uskutečněna v březnu 1997, v tomto roce bylo autologně transplantováno 21 pacientů. Začátek příbuzenských alogenních transplantací se datuje na leden 2000. V roce 2000 se počet celkových transplantací zvýšil na 60 a z toho bylo uskutečněno 12 alogenních příbuzenských transplantací. V říjnu 2004 byl první pacient transplantován alogenně nepřibuzensky, do konce roku byla uskutečněna nepřibuzenská transplantace ještě jedna. V tomto roce byl celkový počet transplantací 65 a alogenních příbuzenských 15. Počty transplantací se neustále zvyšují, proto byl operativně zvýšen počet lů-

žek o 2 na JIP 5B. V roce 2013 dosáhl počet celkových transplantací 73, autologních transplantací 46 (8 transplantací provedeno na JIP 5B), 18 nepřibuzenských a 9 příbuzenských alogenních transplantací. Pravidelné interní audity transplantačního programu prováděné od roku 2007 dosvědčují, že se nám daří zlepšovat výsledky a udržovat velmi nízkou potransplantační morbiditu a mortalitu. Především dáme slovo našim pacientům, aby nám přiblížili svůj pohled na léčbu, pobyt na transplantační jednotce a své následné začlenění do běžného života.

HODGKINŮV LYMFOM III

2518.

Nové radioterapeutické techniky v léčbě Hodgkinova lymfomu

Dědečková K., Kubeš J. (Proton Therapy Center, Praha; Ústav radiační onkologie Nemocnice Na Bulovce, Praha)

Sdělení je věnováno postavení moderních technik radioterapie v léčbě Hodgkinova lymfomu a jejich potenciálu při redukcí toxicity léčby. Slibnou metodou pro snížení především pozdní a velmi pozdní toxicity (včetně snížení rizika vzniku sekundárních malignit a kardiovaskulárních onemocnění) je protonová radioterapie. Ostatní moderní techniky radioterapie užívající konvenční fotonové záření (IMRT, VMAT, tomoterapie) mohou naopak často znamenat vyšší riziko indukce sekundárních malignit díky většímu objemu těla, který je vystaven malým a středně vysokým dávkách záření (dávkou od 4Gy a více). Užití protonové RT znamená podstatnou redukci zátěže zdravých tkání (řádově o desítky %). Tato léčba díky fyzikálním vlastnostem protonů (minimální ozáření okolních tkání mimo plánovaný žádoucí cílový objem, který je identický s cílovým objemem konvenční fotonové radioterapie) je schopna zabezpečit ozáření daleko menšího objemu těla, který obdrží nízké a střední dávky záření. Tyto dávky záření nemají podstatnou roli v rozvoji akutní toxicity radioterapie, ale mohou být významné pro vznik funkčního poškození tkání a orgánů a jsou dávány do souvislosti s rozvojem vzniku sekundárních malignit. Klinické užití protonové RT v léčbě lymfomů v České republice bude diskutováno na zasedání Kooperativní lymfomové skupiny v březnu 2014.

2515.

Pozdní následky terapie a sekundární nádory u nemocných s Hodgkinovým lymfomem

Vokurka S. (Hemato-onkologické odd, FN, Plzeň)

Léčba Hodgkinova lymfomu (HL) přináší rizika v podobě pozdních komplikací, mezi které patří - kromě poruchy gonád – především sekundární malignity, plicní a kardiovaskulární poškození a dysfunkce štítné žlázy. Incidence sekundárních malignit po léčbě HL zřetelně přesahuje výskyt jednotlivých primárních malignit v populaci. Pravděpodobnost stavu bez sekundární malignity v době do 15 let po léčbě HL se pohybuje okolo 87 %. Významnou roli v přesnosti údajů o výskytu malignit hraje délka sledování pacientů, zastoupení a charakter léčebných modalit a věkové složení. Ve skupině leukémií (relativní riziko 10–80×) zřetelně převládá sekundární akutní myeloidní leukémie typicky se objevující v rozmezí první dekády po léčbě HL. V případě historického protokolu MOPP bylo kumulativní riziko rozvoje AML během 15 let přibližně 10 %, v rámci ABVD pak do 1 % a v případě BEACOPP okolo 1–2 % do 5 let. Non-hodgkinské lymfomy (relativní riziko 3–35×) mívají incidenci spíše po první dekádě a výskyt je nezávislý na typu původní léčby. Solidní nádory mají dominantní nástup později po první dekádě a hlavní rizikový faktor je radiace a původně i MOPP. Zastoupeny jsou zde především sarkomy měkkých tkání, melanom, karcinom plic, prsu, slinných žláz a štítné žlázy. Karcinomu prsu má udávané riziko rozvoje 20–30 % po aktinoterapii na oblast hrudníku do věku 35 let. Plicní poškození po léčbě HL je specificky vázáno na podávání bleomycinu a výskyt se udává až 18 % s vyšším rizikem po doplněné aktinoterapii do oblasti hrudníku, ve vyšším věku a s renální insuficiencí. Projevy mohou být v průběhu léčby, ale i za několik měsíců, a pod obrazem hypersenzitivní pneumonie a/nebo progresivní plicní fibrózy. V diagnostice se uplatní CT, BAL, biopsie, klinické souvislosti. V léčbě jsou indikovány kortikoidy. Zvláštním fenoménem je i možnost manifestace problému až při oxygenoterapii např. v souvislosti s operačním výkonem. Kardiovaskulární komplikace jsou zastoupeny především zvýšeným rizikem aterosklerotického poškození cév

v ozařovaném poli, a dále pak kardiotoxicitou vázanou na podávání antracyklinů, resp. adriamycinu nad kumulativní dávkou 400mg/m². Akutní nebo subakutní toxicita, během léčby nebo následných týdnů je spíše asymptomatická. Chronické postižení, vyvíjející se měsíce i roky, pak přináší riziko rozvoje dilatační kardiomyopatie s kardiálním selháváním. U pacientů po léčbě HL může být snížena funkce štítné žlázy, obzvláště po aktinoterapii v oblasti, a zůstává i riziko karcinomu.

2512.

Problematika poruchy fertility u nemocných léčených pro Hodgkinův lymfom

Šmardová L., Huser M., Michalka J., Žáková J., Janíková A., Crha I., Král Z., Ventruba P., Mayer J. (Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; Gynekologicko-porodnická klinika, FN, Brno)

2514.

Prognóza pacientů s relabováním/refraktérním Hodgkinovým lymfomem, kteří jsou nevhodní k autologní transplantaci kmenových buněk

Mociková H., Sýkorová A., Štěpánková P., Marková J., Michalka J., Král Z., Belada D. (Interní hematologická klinika, FNKV, Praha; IV. Interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové; Interní hematologická klinika, FN, Brno)

Východiska: Tato retrospektivní studie vyhodnotila z databáze pacientů s Hodgkinovým lymfomem (HL) na jednotlivých pracovištích nemocné s opakovaným relapsem HL nebo s refraktérním HL, kteří nebyli vhodní k autologní transplantaci kmenových buněk (ASCT).

Pacienti a metody: Bylo zdokumentováno 16 pacientů s HL s mediánem věku při diagnóze 56 let (rozsah 21–75), kteří byli nevhodní k ASCT v prvním a dalších relapsech z důvodu: věku, refraktérnosti HL, nedostatečného sběru kmenových buněk, toxicity léčby, nebo z důvodu lokalizovaného relapsu. V léčbě prvního až třetího relapsu byly použity následující režimy: COPP, MOPP + radioterapie, samostatná radioterapie, ABVD, eskalovaný BEACOPP, DHAP, ESAP, MINE, ICE, IGEV, gemcitabin +/- dexamethason, PVAG, GDP.

Výsledky: V mediánu sledování 3 roky od diagnózy 12 pacientů zemřelo, z toho 11 na relaps/progrese HL a 1 pacient na kardiální toxicitu po 3. linii léčby. Z 12 zemřelých pacientů 10 bylo refraktérních již na druhou linii chemoterapie a ani další linie standardní chemoterapie +/- radioterapie nevedly k dlouhodobé remisi. Ze souboru 16 pacientů pouze 4 (25 %) žijí, z toho 2 pacienti jsou v kompletní remisi po 3 liniích léčby, ale se závažnými komplikacemi: jeden s kardiální toxicitou a druhý pacient s renální insuficiencí. Další pacient je v parciální remisi po třetí linii léčby a jeden pacient pokračuje v chemoterapii třetí linie.

Závěr: Vzhledem k nepříznivé prognóze pacientů s HL refraktérních na druhou linii chemoterapie nebo u pacientů s dalším relapsem po druhé linii léčby a nevhodných k autologní transplantaci je indikováno podání Brentuximab vedotinu, který dosahuje celkovou 75% odpověď u relabovaných/refraktérních HL.

TRANSPLANTACE KRVETVORNÝCH BUNĚK

2566.

Alotransplantácia krvotvorných buniek pre myelofibrózu

Mistrik M., Bojtárová E., Sopko L., Al Sabty F., Bátorová A. (KHaT, LF UK a UN, Bratislava – SVK)

Alogénna transplantácia krvotvorných buniek (TKB) je v súčasnosti jedinou liečbou myelofibrózy (MF), ktorá je schopná navodiť kompletnú hematologickú, cytogenetickú a molekulovú remisiu. Pri uvažovaní o TKB si musíme byť vedomý hmatateľného rizika samotného výkonu. Na druhej strane je zrejmé, že s pokročilosťou choroby sa prínos TKB rýchlo znižuje. Hlavným problémom je, že nie je možné poskytnúť jednoznačné odporúčenie koho a kedy transplantovať na základe medicíny dôkazov. Mnohí chorí s MF majú dobrú kvalitu života, dlho prežívajú a ich vystavenie bezprostrednému riziku morbidita a mortality v súvislosti s TKB nie je primerané. Avšak, väčšina chorých s MF nakoniec rozvinie cypopéniu, symptomatickú splenomegaliu a obťažujúce konštitučné symptómy. Niektorí pacienti sa prezentujú alebo rozvinú akcelerovanú fázu a/ alebo transformáciu do akútnej

myeloblastovej leukémie, čo významne skracuje prežívanie a ďalej znižuje prínos TKB. Všeobecne sa TKB odporúča pri MF v strednom -2 a vysokom riziku, ktoré sa určí skórovacími systémami, pretože títo chorí majú median prežitia 2,3–4,8 roka. MF s veľmi vysokým rizikom alebo v akcelerovanej fáze súvisí s mediánom prežívania 9–16 mesiacov, a títo chorí sa musia okamžite transplantovať. Dostupnosť súrodeneckého darcu umožňuje pružné urobenie TKB a otvára širšie terapeutické okno ako TKB od alternatívneho darcu, ktorej logistika je zložitejšia a jej uskutočnenie menej pružné. Nie sú presvedčivé údaje o tom, že mortalitu alotransplantácie pri MF znižuje redukovaný prípravny režim, pretože výskyt nerelapsovej mortality a relapsu ostáva neprijemne vysoký. Preto pri alotransplantácii mladších chorých (vek 40 – 50 r.) sa uprednostňuje intenzívny prípravny režim, ktorý významne znižuje riziko relapsu. U starších chorých, hlavne s komorbiditami, je rozumné použiť redukovaný prípravny režim. V priebehu ostatných 17 rokov sme transplantovali 12 chorých (median veku 44 rokov, rozsah 20–63) pre MF (interval dg – TKB 0,8 r; 0,4–5,2) prevážne periférnymi krvotvornými bunkami (11/12) od HLA identického súrodenca (7/12) po myeloablatívnom (6/12) alebo redukovanom prípravnom režime (6/12). Kompletný chimérizmus dosiahlo 9 chorých, regeneráciu vo všetkých 3 vývojových radoch 10 chorých. Exitovalo 5 chorých (2 progresia choroby a 3 nere-lapsová príčina) a žije 7 chorých median 5,5 roka (0,9–17,4). 3 ročná pravdepodobnosť celkového prežívania (Kaplan – Meier) je 65 %, čo je porovnateľné s publikovanými výsledkami.

2660.

Allogeneic stem cell transplantation for primary myelofibrosis

Žák P., Zavřelová A., Radocha J., Lánská M., Jebavý L. (4th Department of Medicine – Hematology, University Hospital, Hradec Králové)

Purpose: To evaluate allogeneic stem cell transplantation results of patients with myelofibrosis at our transplant center. **Methods:** Between years 2002 and 2012 we performed 10 allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis at our center. Median age at transplantation was 57 years (49–62year). Median time from diagnosis to transplantation was 24 months (6–248 months). We used mainly reduced intensity conditioning with targeted busulfan dose (Bu 8 mg/kg) except 1 patient (fully ablative regimen). 8 patients had unrelated donor and 2 patients had matched related donor. All patients with unrelated donor were given T cell depletion with thymoglobulin. According to dynamic international changes, prognostic scoring system patients score was low intermediate 1, intermediate 2 and high risk in 2, 4, 2 and 2 patients, respectively. One patient had unfavorable karyotype and other patients had normal karyotype or unclassified.

Results: Overall survival in patients was 90 % in median observation time of 18 month (1–138 month). Only 1 patient died early after stem cell transplantation from peracute EBV posttransplantation lymphoproliferative disease. 67 % experienced aGVHD with quick response to corticosteroid therapy and 67 % patients developed chGVHD, which was not debilitating them. We did not register any relapse of disease.

Conclusion: Allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis is feasible procedure with extremely good results and very low relapse rate. Due to these results it is possible to do this procedure early in the disease course to decrease transplant related complications and mortality. It is warranted to use T cell depletion with extremely low relapse rate in this kind of patients.

2544.

Alogénna transplantácia krvotvorných buniek pri paroxyzmálnej nočnej hemoglobínúrii

Bojtárová E., Žiaková B., Mistrik M., Bátorová A. (Klinika hematológie a transfuziologie LFUK, SZU a UN, Bratislava – SVK)

Paroxyzmálna nočná hemoglobínúria (PNH) je vzácné získané klonové ochorenie krvotvorných kmeňových buniek, ktoré môže viesť k život ohrozujúcim komplikáciám vrátane intravaskulárnej hemolýzy, trombotických príhod a postihnutia obličiek. Používanie citlivých diagnostických testov a dostupnosť cieľnej liečby, blokujúcej terminálne časti komplementu, prispeli k zlepšeniu prognózy pacientov s PNH. Jedinou kuratívnu liečbou PNH je alogénna transplantácia krvotvorných buniek (TKB), aj keď výsledky neboli v minulosti vždy priaznivé.

Pacienti a metódy: v rokoch 2001–2013 sme uskutočnili alogénnu TKB u 7 pacientov s PNH: u 4 transplantáciu od zhodného súrodenca a u 3 pacientov od zhodného nepríbuzného darcu. Me-

dián věku příjemců bol 33 rokov (rozsah 23 – 60) a darcov 28 rokov (23–37). Medián času od diagnózy do alogénnej TKB bol 9 (1–95) mesiacov. Indikáciou pre alogénnu TKB bola aplastická/hypoplastická kostná dreň u 3 pacientov, ťažký priebeh PNH komplikovaný hemolytickými krízami a/alebo trombózami (4 pacienti), závislosť od tranfúzií (7 pacientov). Prípravny režim obsahoval celotelové ožiarenie a cyklofosamid 60 mg/kg × 2 a antitymocytový globulín (ATG)(3 pacienti), fludarabín (FLU) 30 mg/m² 4 dni a busulfan (BU) 4 mg/kg 2 dni (1 pacient), pred nepríbuzenskou TKB FLU 30 mg/m² 5 dní, BU 4 mg/kg 2 dni a ATG (3 pacienti). Štandardnú profylaxiu GvHD (cyklosporín A+metotrexat, MTX) dostalo 6 pacientov, u 1 pacienta bol MTX pre gastrointestinálne komplikácie nahradený mykofenolátom mofetil. Zdrojom krvotvorných buniek bola kostná dreň (1 pacient) alebo periférna krv (6 pacientov) s mediánom jadrových buniek 8,5 × 10⁸/kg (1,6–12,3) a s mediánom 5,3x10⁶/kg CD34+ buniek (3,7–5,8).

Výsledky: Prihodenie štepú sme zaznamenali u všetkých pacientov: medián počtu neutrofilov nad 0,5 × 10⁹/l, nad 1 × 10⁹/l a počtu trombocytov nad 50x10⁹/l dosiahli pacienti 19 (13–23) dní, 19 (14–26) dní a 14 (13–132) dní po TKB. Akútna GvHD (črevná forma II – III. stupňa) sa vyskytla u 1 pacienta, kožné, slizničné a očné prejavy chronickej GvHD u 2 pacientov. K 28.2.2014 žijú všetci pacienti 63 (12–148) mesiacov po TKB. U všetkých pacientov sme potvrdili kompletný chimérizmus t.j. 100% krvotvorby darcu a kompletné vymiznutie PNH klonu.

Záver: alogénnu TKB je efektívna a bezpečnou kuratívnu liečbou PNH.

2580.

Alogenní transplantce po redukované přípravě (RIT) u pacientů starších 60 let s chronickou lymfatickou leukémií (CLL): srovnatelné výsledky při použití příbuzného či nepříbuzného dárce, časnější indikace k transplantaci by mohla zlepšit výsledky - zkušenosti jednoho centra Karas M., Steinerová K., Svoboda T., Lysák D., Vokurka S., Vozobulová V., Schützová M., Hrabětová M., Jindra P. (Hematologicko-onkologické oddělení, FN, Plzeň)

Background: RIT can improve treatment results among patients (pts) with high-risk or advanced CLL. However, most of pts with CLL are (pts) older than 60 years and published data concerning RIT outcome of this group of elderly pts are limited. To evaluate the potential role of RIT in pts older than 60 years with CLL and the role of use of unrelated donor we retrospectively analysed the results of those pts transplanted in our centre during last 10 years. Patients and methods: from 9/2003 to 9/2013 33 pts with median of age 63 years (range: 60–70 years) with high-risk or advanced CLL (17p-/p53 mutation, chemoresistant CLL, relapse ≤ 24 moths, ≥ 3 treatment lines) underwent RIT (33% related, 67 % unrelated). Source of stem cells was peripheral blood and the conditioning regimen consisted of fludarabine and melphalan (55%) or fludarabine and cyclophosphamide (45 %). Pts undergoing unrelated RIT had comparable prognostic variables as pts undergoing related RIT except of younger age of donors in unrelated RIT.

Results: 91 % of patients engrafted. None of 6 pts in CR before RIT progressed at day +30 after RIT and among 27 pts beyond CR before RIT 89% of them achieved at least PR at day +30. 18 pts (54 %) developed acute GVHD and among 26 evaluable pts 15 (58%) of them developed chronic GVHD. With median follow-up 43 moths (range 3–110 months) 8 pts (24%) are alive in CR. 9 pts (27 %) relapsed or progressed with median time to progression 3 months (range 1–30 months) and died with median time after progression 23 months (range 1–52 months). 16 pts (49%) died due to NRM (94 % infections). NRM till day +100 after RIT was 15%. The estimated probabilities of 3-years PFS and OS are 27 % and 36 %. There were no statistical difference between results of related and unrelated RIT.

Conclusion: in spite of relatively small number of evaluated pts and retrospective type of analysis our data show that RIT even in use of unrelated donor in pts over 60 years of age (often pretreated and with comorbidities) achieves in about 30 % of them long lasting disease control of high-risk or advanced CLL. On the other hand, characteristics of our pts cohort suggest a later indication for RIT in elderly pts with CLL. Later indication for RIT means higher pretreatment and selection of aggressive CLL clones, which probably leads to higher risk of mortality and relapse incidence after RIT. Earlier indication for RIT could improve transplant results in elderly pts with prognostically unfavourable CLL.

2585.

Úspěšnost HSCT u pacientů s AML v závislosti na typu dárce a jeho shodě v HLA systému – retrospektivní studie ÚHK

Vraná M., Dobrovolná M., Marková M., Válková V. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Do retrospektivní analýzy alloHSCT programu u AML pacientů byli zahrnuti pacienti, kteří byli transplantováni v letech 1995–2012. Vlastní analýza byla zpracována na základě dat s poslední aktualizací v květnu 2013. Pacienti byli rozděleni do rizikových skupin podle pokročilosti onemocnění v době transplantace (hodnoceno podle EBMT kritérií). HLA shoda byla definována na úrovni high resolution v lokusech HLA-A, B, C, DRB1 a DQB1 bez rozdílu typu dárce. Skupina zahrnovala 241 AML pacientů (ženy: 126/medián věku při HSCT 47 let; muži: 115/medián věku při HSCT 44 let). Riziková skupina I zahrnovala 142 pacientů, riziková skupina II 59 pacientů, do rizikové skupiny III bylo zahrnuto 32 pacientů. 85 pacientů bylo transplantováno od příbuzného dárce (MRD). 76 (89 %) z nich obdrželo štěp od kompletně shodného dárce (shoda 10/10). 9 pacientů obdrželo štěp od příbuzného dárce s různým stupněm neshody HLA. 156 pacientů bylo transplantováno od nepříbuzných dárců (MUD). 80 z nich (51 %) obdrželo štěp od MUD se shodou 10/10. Ostatní pacienti získali štěp od nepříbuzných dárců s menší mírou shody. U sledovaného souboru byly analyzovány křivky přežití v závislosti na těchto sledovaných parametrech: riziková skupina, pohlaví pacientů, věk při HSCT, přípravný režim, typ dárce, typ transplantovaných buněk, neshody ABO systému, použití ATG v přípravném režimu, shoda HLA. Dle předpokladu byl zjištěn signifikantní rozdíl v délce přežití mezi jednotlivými rizikovými skupinami. Při analýze vlivu HLA shody bylo zjištěno, že délka přežití skupiny pacientů transplantovaných od dárců se shodou HLA 10/10 je signifikantně delší než u ostatních skupin, nicméně rozdíly mezi skupinami HLA 9/10 a 8/10 a méně nebyly statisticky významné. Vliv žádného z ostatních sledovaných parametrů neovlivnil významně délku přežití transplantovaných pacientů AML ve sledované skupině. Na základě těchto výsledků lze shrnout, že ve sledované skupině bylo přežití pacientů AML transplantovaných od nepříbuzných dárců srovnatelné s pacienty transplantovanými od dárců příbuzných. Pro tyto pacienty se jeví jako podstatné nalezení dárce se shodou HLA 10/10.

Práce byla podpořena MZ ČR projektem koncepčního rozvoje výzkumné organizace IČ 023736 ÚHK.

2559.

Význam polymorfismu IL-6 v závislosti na gastrointestinální toxicitě přípravného režimu u nemocných podstupujících alogenní transplantaci krvetvorných buněk

Kuba A., Ráida L., Mrázek F., Ambrůzová Z., Furstová J., Furst T., Langová K., Faber E., Petřek M., Indrák K. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Laboratoř imunogenomiky, Ústav Imunologie, LF UP, Olomouc; Katedra matematické analýzy, PŘF UP, Olomouc; Ústav lékařské biofyziky, LF UP, Olomouc)

Vliv jednonukleotidového polymorfismu (SNP) IL-6-174 na intenzitu systémové zánětlivé odpovědi a následný rozvoj závažných imunologických komplikací u nemocných podstupujících alogenní transplantaci krvetvorných buněk (SCT) byl předmětem několika studií, avšak s kontroverzními závěry. Prezentovaná analýza se tedy kromě významu SNP IL-6-174 na potransplantační prognózu pacientů zaměřila i na asociaci s intenzitou slizniční gastrointestinální toxicity způsobené přípravným režimem (GIT-RRT). Retrospektivně bylo hodnoceno 87 nemocných, kteří v letech 2000–2007 podstoupili alogenní SCT od HLA-identického dárce pro nádorová (93 %) i nenádorová (7 %) hematologická onemocnění. U všech příjemců a jejich dárců byl stanoven SNP IL-6-174 s následným rozdělením do skupin s alelickými kombinacemi IL-6-174 GG, IL-6-174 GC a IL-6-174 CC, přičemž zastoupení G-alely je spojeno s potenciálem vyšší produkce cytokinu. Rozvoj akutní nebo chronické nemoci štěpu proti hostiteli (GVHD), úmrtnost na potransplantační komplikace (TRM), výskyt relapsu základního onemocnění a pravděpodobnost přežívání bez relapsu (RFS) a celkového přežívání (OS) byly hodnoceny v závislosti jak na charakteristikách, jež mohou tyto sledované parametry ovlivnit, tak SNP IL-6-174 příjemců i dárců. Analýza se zaměřila i na vliv intenzity GIT-RRT. SNP IL-6-174 příjemců i dárců neovlivnil riziko akutní ani chronické GVHD, i když SNP IL-6-174 GG a CC příjemců byly na hranici statistické významnosti ve vztahu k vyššímu (p = 0.052), resp. nižšímu (p = 0.066) výskytu akutní formy. Rovněž nebyla potvrzena závislost TRM, relapsů základního onemocnění, RFS a OS na SNP IL-6-174. Významně vyšší výskyt akutní GVHD (49 % vs. 27 %; p = 0,048) a TRM (51 % vs. 27 %; p = 0.029) však byl pozorován u nemocných s GIT-RRT III. a IV. stupně. Riziko relapsu, pravděpodobnost RFS a OS intenzitou GIT-RRT ovlivněny nebyly. V rámci první analýzy souboru byl na

hranici statistické významnosti vztah mezi SNP IL-6-174 příjemců a rozvojem akutní GVHD. Významně však ovlivnila rozvoj této imunologické potransplantační komplikace a riziko TRM intenzita slizniční GIT-RRT. Polymorfismus a rozdílná schopnost produkce IL-6 pak může hrát významnější roli právě u nemocných s rozvojem těžké mukositivity.

Podpořeno projekty IGA UP LF-001-2014 a IGA MZd ČR NT12454

CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE A MYELOPROLIFERATIVNÍ NEMOC

Standardisation of molecular monitoring in CML - progress and problems

Cross N.C.P. (Southampton, UK)

2586.

Charakterizace genomické fúze BCR-ABL1 a detekce SNPs upstream a downstream od zlomů v genech BCR a ABL1 u pacientů s CML s použitím sekvenování nové generace

Linhartová J., Hovorková L., Soverini S., Benešová A., Jarušková M., Klamová H., Zuna J., Machová Poláková K. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha – CZE; CLIP, Oddělení dětské hematologie a onkologie., 2. LF UK a FN Motol, Praha – CZE; Department of Experimental, Diagnostic and Specialty Medicine, Institute of Hematology “L. e A. Seràgnoli”, University of Bologna, Bologna - ITA)

Identifikace fúze genu BCR-ABL1, jedinečné pro každého pacienta s CML, je nutná k citlivému monitorování minimální reziduální nemoci na úrovni DNA. Cílem práce byla charakterizace zlomů v genech BCR a ABL1 u pacientů s CML v hluboké molekulární odpovědi a detekce SNP upstream a downstream od zlomů pomocí sekvenování nové generace (NGS). Pro studii byly použity 2 BCR-ABL1 pozitivní buněčné linie (K562; JURL-MK1) a vzorky od 48 pacientů s CML. Z leukocytů periferní krve z doby diagnózy byla izolována DNA. Následovala multiplex long-range PCR (mLR-PCR) se dvěma sadami primerů: 1) 1 forward primer v BCR a 10 reverse primerů v ABL1 (Lange et al 1999), s nimiž byly získány produkty ve 28/50 případech; 2) 1 BCR a 20 ABL1 primerů (Krumholz et al 2012) byly použity pro zbylé vzorky. Produkty LR-PCR byly fragmentovány a sekvenovány technologií NGS-454 (Roche Applied Science). Sekvence byly analyzovány softwarem NextGENe (Softgenetics). K lokalizaci zlomů a identifikaci SNP byla použita databáze NCBI a referenční sekvence genů. NGS analýza byla provedena u 41 vzorků s mediánem délky LR-PCR produktů 6 kb (1,5–10 kb). U 32 pacientů a v buněčných liniích s e14a2 mRNA byly zlomy v BCR nalezeny v intronu 14, u 7 pacientů s e13a2 mRNA v intronu 13. V ABL1 se zlomy nacházely vždy v intronu 1. U pacientů s e14a2 bylo upstream od zlomů v BCR detekováno 17 anotovaných SNP (1 v exonu 13, 4 v intronu 13 a 12 v intronu 14; medián 3 SNP/pacient (1–12)). V 1000Genome phase 1 population (NCBI SNP databáze) se frekvence minoritních alel těchto SNP pohybuje od 0,5 % do 30,7 %. U 3 pacientů byly identifikovány nové SNP v exonu 13, intronu 13 a exonu 14. Mezi pacienty s e13a2 byly upstream od zlomu v BCR nalezeny SNP pouze u jednoho pacienta. Hierarchické klastrování na základě SNP profilů upstream od BCR zlomů rozdělilo pacienty do 3 hlavních skupin, přičemž skupina s e13a2 byla vzdálená od 2 skupin pacientů s e14a2. Downstream od zlomů v intronu 1 ABL1 bylo identifikováno 51 SNP u 12/39 pacientů a v JURL-MK1. Technologie NGS ve spojení s mLR-PCR umožňuje efektivně charakterizovat fúzi v genu BCR-ABL1 a také sekvenční polymorfismy v blízkosti zlomů. Naše dosavadní výsledky ukazují vyšší výskyt SNP upstream od zlomů v BCR u pacientů s e14a2 v porovnání s pacienty s e13a2. K nalezení asociace mezi charakteristikou pacienta, SNP profilem a jeho významem v prognóze či predikci průběhu CML jsou nutné další analýzy.

Podporováno IGANT11555 a projektem MZČR koncepčního rozvoje výz.org. 00023736.

2526.

High resolution mass spectrometry of imatinib biotransformation products

Mičová K., Friedecký D., Faber E., Hrdá M., Adam T. (Institute of Molecular and Translational Medicine, Olomouc; Department of Hemato-Oncology, Faculty Hospital Olomouc, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc; Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Chemistry, Olomouc)

Background: Therapeutic drug monitoring is widely applied useful tool for treatment individualization in order to achieve optimal clinical response and avoid toxicity. Due to drug metabolizing enzymes several bioactive or toxic metabolites may be produced. Therefore determination of not only parent drug but also of metabolites may have clinical relevance and could be helpful for treatment adjustment. Aims: to assess a detailed profile of imatinib (IMA) metabolites in plasma of patients with chronic myeloid leukemia (CML). Methods: Before analysis plasma proteins were precipitated by methanol and supernatant was injected. Separation was performed on Phenomenex Kinetex C18 column (100 x 2.1 mm; 1.7 µm) using UltiMate 3000 RS (Thermo Scientific) liquid chromatography. For detection Orbitrap Elite mass spectrometer (Thermo Scientific) based on exact mass measurement was used. Scan range of m/z 350 – 1200 was chosen and the resolution was set at 60,000 FWHM. MS/MS data were acquired in data-dependent strategy based on fragmentation of 25 selected exact m/z values of potential metabolites. Collision energy for CID was set at 35 eV. Dynamic exclusion duration of 3 s was enabled; mass accuracy was 5 ppm. Data were evaluated using Excalibur 2.2 SP1, MetWorks 1.3 SP3 and Mass Frontier 7.0 software. Eight samples of 7 CML patients with optimal or suboptimal response to treatment were analyzed (age 41–77 years, 400 mg IMA/day; sampling time 20–27 h after IMA ingestion).

Results/Conclusions: Contrary to previously described 14 IMA metabolites in plasma (Rochat B. et al. Mass Spectrom. 2008;43:736) we have found 100 potential metabolites in concentration range of 4 orders of magnitude (0.001 – 6.630 %) related to IMA plasma levels (635 – 1360 ng/mL). All metabolites found in plasma were identified on the base of exact m/z values and confirmed by MS2 and MS3 fragmentation experiments. Importantly, differences in the profiles of oxidized and dioxidized metabolites in optimally and sub-optimally responding patients were observed. Further studies should be focused on elucidation of clinical significance of newly discovered metabolites.

Acknowledgements: Supported by grant LF UP 2014-001 and 2013-010, grant of IGA Ministry of Health, Czech Republic NT12218-4/2011. Infrastructural part of the project (Institute of Molecular and Translational Medicine) was supported from the Operational Program Research and Development for Innovations; Project CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

2650.

Mezinárodní prognostický systému pro esenciální trombocytemii: jeho význam pro hodnocení celkového přežití a riziko vzniku posttrombocytemické myelofibrozy

Šišková M., Cmunt E., Karban J., Pytlík R., Jonášová A., Velenská Z., Trněný M. (1.interní klinika – hematologie, VFN a 1.LF UK, Praha; Ústav patologie VFN a 1.LFUK, Praha)

Úvod: Esenciální trombocytemie (ET) je myeloproliferativní onemocnění s relativně dobrou prognózou. Je charakterizována zvýšeným počtem trombocytů, cévními komplikacemi a možností vzniku posttrombocytemické myelofibrozy (post-ET) a akutní leukemie (AL). Cíl: Validace mezinárodního prognostického systému pro esenciální trombocytemii (IPSET) na souboru 171 pacientů s diagnózou ET.

Soubor pacientů a metody: Retrospektivní analýza dat nemocných, u kterých byla na našem pracovišti stanovena dg ET v letech 2000–2012, podle WHO klasifikace u 100 nemocných, u ostatních podle PVSG kritérií. Počet trombocytů 420-2798x10⁹/l (medián 758), počet leukocytů 4,1-18,1x10⁹/l (medián 10,1) JAK2 mutace byla přítomna u 66 % ze 110 provedených vyšetření. Cévní komplikace mělo 14 % nemocných. Zemřelo 33 pac. Při aplikaci IPSET (věk 60 let a více, leukocyty 11x10⁹/l a více, trombocytosa v anamnéze) byla nejpočetnější skupina se středním rizikem (92 pacientů) s nízkým rizikem 58 pac., vysoké riziko mělo 21 pac. Z celkového počtu pacientů podstoupilo cytoreduktivní léčbu 73 % pacientů (41 pac hydroxyureou, 28 pac anagrelidem, 6 pacientů INF alfa, ostatní byli léčeni kombinací těchto léčiv). U 19 (11 %) pacientů došlo k vývoji posttrombocytemické myelofibrozy, u 5 jsme pozorovali přechod do polycytemia vera a u 2 pacientů došlo ke vzniku sekundárního MDS.

Závěr: Mezinárodní prognostický systém pro esenciální trombocytemii lze uplatnit pro předpověď celkového přežití a výskytu trombotických komplikací, nepostihuje však riziko pro vznik myelofibrozy.

2619.

Léčba primární myelofibrózy nízkými dávkami thalidomidu a prednisonu

Bělohávková P., Voglová J., Maisnar V., Zavřelová A., Žák P. (IV.interní hematologická klinika, Hradec Králové)

Pro primární myelofibrózu je typická cytopenie, fibróza kostní dřevě, hepatosplenomegalie a extra-medulární hematopoéza s velmi různorodým klinickým obrazem u pacientů. Jedinou kurativní léčbu představuje u PMF vyššího rizika alogenní transplantace krvetvorným buňkami (ASCT), avšak její provedení je často limitováno věkem pacientů. Další léčebné možnosti zahrnují ovlivnění anémie, splenomegalie či celkových projevů a jejich hlavním cílem je zlepšení kvality života nemocných. Z novějších léčebných postupů bylo publikováno, že u anemických pacientů je často úspěšná léčba nízkými dávkami thalidomidu s kortikoidy. V naší práci prezentujeme zkušenosti s jedenácti pacienty s PMF, kteří byli léčeni na našem centru nízkými dávkami thalidomidu (50 mg denně) s prednisonem (0,5 mg/kg/den). Léčebného efektu se vzestupem hemoglobinu jsme dosáhli u 8/11 (73 %) nemocných s mediánem nástupu léčebného efektu 4 týdny (rozpětí 3–6 týdnů) a ve 4 případech se stali nemocní transfúzně nezávislími. Léčebný efekt se projevil i na hodnotu trombocytů, ale nezaznamenalí jsme výraznější efekt na velikost sleziny. Medián celkové délky léčby nízkými dávkami thalidomidu s prednisonem byl 13 měsíců (rozpětí 3–35 měsíců). Důvody ukončení byly následující: u 3 nemocných nebyl žádný léčebný efekt, 2 nemocní indikováni k provedení ASCT, ve 2 případech došlo k rozvoji nežádoucích účinků. Ve 3 případech došlo po delší době léčby (medián 14 měsíců s rozpětím 12–25) k vymizení léčebného efektu a léčba byla ukončena. Naše první zkušenosti potvrdily, že léčba nízkými dávkami thalidomidu s prednisonem u pacientů s PMF přináší dobré léčebné výsledky s tolerovatelnou toxicitou, ale problémem je u části pacientů po delší době ztráta léčebné odpovědi.

KONFERENCE ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ 1

2516.

Stanovení krvetvorných kmenových buněk pomocí průtokové cytometrie

Hončíková M., Salačová P. (FNKV, ÚLD HL, Praha)

V laboratoři provádíme stanovení cirkulujících CD34+ buněk ve stimulované periferní krvi pacienta před aferézou, po aferéze měříme obsah CD34+ buněk v produktu sběru za použití protokolu ISHAGE. Měření zahajujeme při počtu leukocytů nad $1 \times 10^9/l$, současně s provedením mikroskopické analýzy krevního obrazu. Při vysokých hodnotách WBC ve vzorku je nutné vzorek naředit. K vzorku přidáme kombinaci monoklonálních protilátek CD45 FITC, CD34 PE. Separace se zahajuje při počtu CD34+ buněk nad $20 \times 10^6/l$. Sběr je považován za úspěšný, je-li hodnota CD34+ buněk v produktu alespoň $2 \times 10^6/kg$ váhy pacienta (záleží na dg.nemocného).

Závěr: stanovení CD 34+ buněk je jediným ukazatelem výtěžnosti sběru pro transplantace a je nedílnou součástí transplantačního procesu.

2657.

Morfologie akutních myeloidní leukemií a vybrané kazuistiky

Šimečková R., Mikulenková D. (UHKT, Praha)

Přestože nová WHO klasifikace hematopoetických a lymfoidních tkání z r. 2008 posunula diagnostiku akutních leukemií více na molekulární úroveň, morfologické vyšetření nátěru periferní krve a aspirátu kostní při podezření na akutní leukemii stále patří k základním diagnostickým vyšetřením. U některých podskupin akutních myeloidních leukemií diagnóza vychází z morfologického hodnocení nátěru periferní krve a kostní dřevě, které je doplněno cytochemickým vyšetřením myeloperoxidázy a železa. Na našem pracovišti je cytologická diagnostika kromě hodnocení nátěrů v panoptickém barvení rozšířena o 13 cytochemických metod.

2590.

Akutní myeloidní leukémie (AML) s minimální diferenciací: zajímavý cytogenetický a morfologický nálezy a klinický průběh. Kazuistika.

Prekopová I., Kropáčková J., Hanzlíková J., Rohoň P., Nedomová R., Hubáček J., Pikalová Z., Holzerová M., Flodr P., Indrák K., Jarošová M. (Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc; Ústav klinické a molekulární patologie, FN a LF UP, Olomouc)

Diagnostika akutních myeloidních leukemií (AML) je se opírá o nálezy $\geq 20\%$ blastů v kostní dřevě nebo periferní krvi nebo nálezy specifických cytogenetických změn bez dosažení hranice blastů. Blastické buňky AML exprimují povrchové myeloidní markery CD13, CD33 a vykazují myeloperoxidázovou pozitivitu. AML s neobvyklým imunofenotypem se vyskytují zřídka a řadí se k nim i AML s minimální diferenciací, označená podle WHO klasifikace 2008 jako AML-NOS. Blastické buňky obvykle nevykazují morfologickou diferenciaci a cytochemické barvení je negativní. Určení diagnózy AML-NOS je značně problematické a onemocnění je spojeno s velmi špatnou prognózou. AML-NOS jsme na HOK FN Olomouc diagnostikovali u 60ti-letého pacienta. Pacient byl přijat s bronchopneumonií a v periferní krvi měl pancytopenii: hemoglobin 118 g/l, Tr 109x109/l, WBC 1.2x109/l. Vyšetření aspirátu kostní dřevě ukázalo masivní infiltraci blastickou populací, která morfologicky připomínala lymfoblasty. Byla stanovena pracovní diagnóza akutní lymfoblastické leukemie (ALL). Imunofenotypické vyšetření kostní dřevě odhalilo populaci velkých buněk s expresí znaků CD45+, CD34+, CD117+, HLA-DR+ a TdT+ (20% všech jaderných buněk). Tyto znaky charakterizují myelomonocytární progenitory. Cytogenetické vyšetření buněk kostní dřevě odhalilo celkem 3 klony: 75-88,XXYY,-3,der(6),der(6),add(7p),add(9p),hsr(11q),hsr(11q),-18,[cp5]/45,XY,-3,der(6), add(7p),add(9p),hsr(11q)[3]/46,XY[1]. Pro přesné určení změn byla použita metoda mnohobarevné FISH (mFISH) a genově specifické a celochromosomové sondy pomocí nichž bylo zjištěno, že komplexní karyotyp má tzv. homologicky se barvící oblasti (HSR) a „segmental jumping translocation“ (SJT). Hyperdiploidní klon vznikl tetraploidizací původního klonu s počtem 45 chromosomů. Doplnění těchto nálezů zpřesnilo vyšetření metodou arrayCGH. Trepanobiopsie kostní dřevě ukázala, že nádorové buňky jsou pozitivní pro CD45+ , CD117+ a CD34+ (více než 90%). Marker proliferativní aktivity Ki67 vykazoval jadernou pozitivitu v 90% buněk. Na základě těchto analýz byla stanovena diagnóza AML s minimální diferenciací (AML-NOS). Po zahájení indukční chemoterapie se stav nemocného rychle zkomplikoval a pacient zemřel druhý den po jejím zahájení. Presentujeme zde zajímavé morfologické, imunofenotypické a cytogenetické nálezy pacienta s diagnózou akutní myeloidní leukemie AML-NOS.

Práce je podporována grantem IGA-LF-2014-001.

2583.

Typická a variantní vlasatobuněčná leukémie - prezentace dvou kazuistik

Dynterová A., Fátorová I., Řezáčová V., Žák P., Smolej L. (IV. interní hematologická klinika - laboratoř, FN, Hradec Králové; Ústav klinické imunologie a alergologie, FN, Hradec Králové)

Vlasatobuněčná leukémie (hairy cell leukemia, HCL) je pomalu progredující lymfoproliferativní onemocnění, pro které je typická pancytopenie, splenomegalie a přítomnost „vlasatých buněk“ v kostní dřevě i periferní krvi. V 75–80 % případů postihuje muže. Medián věku nemocných se pohybuje mezi 50–55 roky. Podobně jako jiná lymfoproliferativní onemocnění začíná HCL únavou, malátností a hubnutím. Při fyzikálním vyšetření najdeme v 90 % splenomegalii, cca v 20 % hepatomegalii a zhruba 10 % nemocných má zvětšené uzliny. V periferní krvi je nápadná pancytopenie. Leukopenie je daná především monocytopenií a neutropenií. Charakteristický je nálezy vlasatých buněk v periferní krvi a kostní dřevě. Jsou to menší či středně velké lymfoidní buňky s lehce eccentricky uloženým jádrem. Tvar jádra je většinou kulatý, oválný či ledvinovitý, chromatin je bez patrných nukleolů nebo jen s malým nenápadným jádérkem. Cytoplazma je lehce bazofilní, na periferii neohraničená, „potrhaná“ nebo tvoří drobné výběžky po celém obvodu buňky. Aspirát kostní dřevě je vzhledem k časté fibróze dřevě obtížně získatelný. Punkce je buď úplně „suchá“ nebo s příměsí periferní krve. Je-li reprezentativní, nacházíme většinou redukovanou normální hematopoézu a neoplastické vlasaté buňky, někdy mohou být přítomny i mastocyty. Ke stanovení správné diagnózy je zapotřebí provést vyšetření krevního obrazu s diferenciálním rozpočtem leukocytů, aspirát a biopsii kostní dřevě s cytologickým a imunofenotypizačním vyšetřením a dále cytochemické barvení nátěru kostní dřevě popř. periferní krve na přítomnost tartarát rezistentní kyselý fosfatázy (TRAP) v patologick-

kých buňkách. Vlasaté buňky na svém povrchu exprimují kromě pan-B-lymfocytárních znaků: CD19, CD20, CD22, FMC7, také znaky typické pro HCL: CD25, CD11c, CD123 a znak CD103, který je pro toto onemocnění specifický. WHO klasifikace popisuje vzácnou variantní formu leukémie s vlasatými buňkami (HCL-V), která tvoří asi 10 % všech případů HCL. Na rozdíl od typické vlasatobuněčné leukémie bývá v periferní krvi leukocytóza, lymfocytóza a normální počet monocytů. Nádorové buňky mají na rozdíl od klasické varianty více kondenzovaný jaderný chromatin a nápadné jádro. Cytoplazmatické projekce jsou kratší a méně časté, širší a dál od sebe. Většinou jsou tyto buňky TRAP negativní. Definitivní rozlišení obou forem přináší zpravidla vyšetření průtokovou cytometrií. Obě formy vlasatobuněčné leukémie budeme prezentovat ve dvou kazuistikách.

2543.

Mnohočetný myelom z pohledu laboranta

Vrbová O., Minařík J., Lapčíková A., Juráňová J., Kadlecová J., Indrák K. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; III. Interní klinika, FN, Olomouc)

Náplní sdělení jsou základní informace o mnohočetném myelomu a zejména jeho posouzení z pohledu laboranta. Mnohočetný myelom (MM) - zhoubná proliferace elementů B-buněčné linie - plazmocytů v kostní dřeni spojená s produkcí monoklonálního imunoglobulinu (MIG) převážně IgG typu, méně IgA či IgM, nebo jeho strukturálních komponent → lehkých řetězců κ(kappa) nebo λ(lambda) prokazatelných v séru a/nebo moči. Klinické projevy tohoto onemocnění můžeme shrnout do akronymu CRAB, jež vyjadřuje: C = hyperkalcémie, R = renální insuficience, A = anémie, B = myelomová kostní nemoc. Průkaz MM závisí na několika vyšetřeních: průkazu kostních ložisek, biochemickém vyšetření moči a séra na přítomnost MIG či jeho komponent a na průkazu plazmocytů v kostní dřeni. Průkaz kostních ložisek: RTG snímky skeletu, MR, CT, případně PET/CT. Průkaz M-proteinu: elektroforéza, případně imunoelektroforéza séra a moči. Kvantitativní stanovení volných lehkých řetězců v séru. Postižení kostní dřene je typické, jde o zmnožení monoklonálních plazmocytů, jejich hladina v KD je obvykle >10 %. Jsou to buňky s nízkým poměrem N/C, excentricky uloženým jádrem, silně bazofilní cytoplazmou, s projasněním v Golgiho zóně (těsně perinukleárně). Jádro má loukořovitě uspořádaný chromatin. Plazmocyty ale mohou být i různě atypické, mladší, dvoj i vícejaderné, cytoplazma červeno-růžová (tzv. plaménkové plazmocyty). Mohou se zde vyskytovat i cytoplazmatické inkluze: Russelova tělíska, Mottovy buňky, v jádře Ducherova tělíska. Dále u MM nacházíme zvýšenou hladinu celkové bílkoviny, zvýšenou ureu, kreatinin. K dokreslení diagnózy MM nám napomáhá i histologické vyšetření přítomnosti plazmocytů, imunohistochemické vyšetření, vyšetření pomocí průtokové cytometrie i cytogenetické vyšetření metodou FISH.

2508.

Myelodysplastický syndrom pod mikroskopem

Plicka L. (odd.Klinické hematologie, FN Motol, Praha)

Myelodysplastický syndrom je závažné hematoonkologické onemocnění krve. Proto je velice důležité včasné a přesné určení diagnózy a zahájení terapie. Onemocnění je charakterizováno dysplastickými změnami postihující erytropoézu, myelopoézu a megakaryopoézu. Správná znalost dysplastické změn vyskytujících se v periferní krvi a kostní dřeni u tohoto onemocnění, je důležitá součást znalostí zdravotního laboranta. Zdravotní laborant se často nachází v první linii záchytu onemocnění. Následné vyšetření kostní dřene nám pomůže stanovit subtyp MDS. Diagnostika MDS je velice složitý proces zasahující do více medicínských oborů, jakožto do genetiky, imunologie a histologie.

HODGKINŮV LYMFOM IV

2523.

Léčba relabujícího Hodgkinova lymfomu včetně indikace vysoko dávkované terapie s autologní transplantací kmenových buněk

Kořen J., Pohlreich D., Vacková B., Trněný M. (1.interní klinika-klinika hematologie, VFN, Praha)

2520.

Alogenní transplantace krvinečných buněk v léčbě Hodgkinova lymfomu

Raida L. (HOK, FN a LF UP, Olomouc)

Postgraduální přednáška

2653.

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

Štěpánková P., Belada D., Sýkorová A., Žák P. (IV. int. hematologická klinika, FN a LF UK, Hradec Králové)

Úvod: Ve studii HD-12 srovnávala 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 v letech 2001–2010.

Pacienti a metody: V letech 2001–2010 byl deeskalovaný léčebný postup zvolen u 103 pacientů (p.) s nově diagnostikovaným HL v pokročilém stádiu. Do hodnocení jsme zařadili 78 z nich s dobou sledování alespoň 1 rok od ukončení léčby. Stádium II/III/IV bylo zastoupeno u 15/41/22 pacientů, věkový medián byl 31 let (18–61). IPS 0–2 bylo častější než IPS 3–7 (60 vs. 40 %). Sledovali jsme léčebný efekt, dobu trvání remise a časnou toxicitu léčby. Léčebná odpověď byla hodnocena dle revidovaných Chesonových kritérií.

Výsledky: Plánovaných 8 cyklů léčby dokončilo 70 p. (89.7 %). Celkem 75 (96.2 %) p. dosáhlo kompletní remise. Jeden p. zemřel v průběhu léčby, u jednoho jsme zaznamenali progresi při léčbě, u jednoho stabilní onemocnění. Radioterapií bylo léčeno 11 (14.1%) p. s úvodním bulky postižením (v éře před PET) či reziduální PET pozitivitou. U dvou p. došlo k relapsu onemocnění 6 a 22 měsíců od ukončení terapie. Relaps či progresse se tedy objevily celkem u 4 (5.1 %) pacientů. Při mediánu sledování 55 měsíců od zahájení léčby je FFTF 92 %, celkové přežití 93 %. Dominujícím nežádoucím účinkem léčby byla hematotoxicita. Anemii st. 3–4 jsme zaznamenali u 32 p. (41%), neutropenii st. 3–4 u 70 p. (89.7 %), trombocytopenii st. 3–4 u 28 p. (35.9 %). Podpurná léčba G-CSF i při režimu bBEACOPP byla nutná u 55 p. (70.5 %). I přes vysoké procento neutropenie bylo pro závažnou infekci hospitalizováno pouze 10 pacientů, jedenáct pro febrilní neutropenii. Nejčastější nehematologické nežádoucí účinky tvořily: periferní neuropatie, herpes zoster, hluboká žilní trombóza, pneumonitida, pneumonie infekční etiologie, osteoporóza s patologickou frakturou. Po skončení léčby byla u dvou p. diagnostikována sekundární malignita, u jednoho myelodysplastický syndrom. Akutní leukémie se ve sledovaném souboru nemocných dosud 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, dlouhodobého efektu a srovnání se stávajícím standardním přístupem, tedy 6 cykly eskalovaný BEACOPP, bude nutné delší sledování.

2640.

Padesát procent vyléčených s prognosticky nepříznivým relabovaným/refrakterním hodgkinovým lymfomem po tandemové autologní transplantaci krvinečných buněk

Pohlreich D., Vacková B., Trnková M., Pytlík R., Kořen J., Cieslar P., Válová V., Gašová Z., Kobylyka P., Trněný M. (Transplantační jednotka, I. interní klinika, VFN, Praha; ÚHKT, Praha)

Úvod: Tandemová autologní transplantace krvinečných buněk je léčebnou modalitou s popsanou efektivitou u prognosticky nepříznivého, relabovaceho či refrakterního hodgkinova lymfomu (Morschhauser F, 2008; Deviller R, 2012). V naší studii prezentujeme výsledky jednoho centra u pacientů léčených tandemovou vysokodávkovanou chemoterapií s autologní transplantací krvinečných buněk (ASCT).

Metody: Indikace k tandemové ASCT byly: hodgkinův lymfom primárně refraktérní, časný relaps/progrese do 12 měsíců po ukončení předchozí linie léčby, rozsáhlý relaps s extranodálním postižením s/nebo v dříve ozařované lokalizaci, nedostačná odpověď na salvage chemoterapii. Jako přípravný režim u 1. ASCT byl použit melifalan +/- mitoxantron, u 2. ASCT byl použit BEAM.

Výsledky: V letech 1996–2004 podstoupilo tandemovou ASCT 22 pacientů, 13 mužů a 9 žen s průměrným věkem 29 let (19–48). Interval mezi diagnózou a ASCT byl 1,7 roku (0,4–12,9). Sedm (32%) pacientů bylo v době zahájení salvage chemoterapie primárně refrakterních. Platinový salvage režim (DHAP, ESHAP, ICE) byl použit ve 14 případech, IVE v 6, dexaBEAM v jednom případě a jeden pacient nedostal salvage žádnou. Do první ASCT vstupovalo 7 pacientů chemorefrakterních, 14 chemosenzitivních a jeden nemocný nebyl hodnocen. Přípravným režimem 1. ASCT byl melfalan 200mg/m² u 9 pacientů a melfalan 140mg/m² s mitoxantronem 40 mg/m² u 11 případů. Tři pacienti nepodstoupili druhou ASCT (1x progresse po 1. ASCT, 1x rozvoj kardiomyopatie, 1x použit celý štěp z důvodu pozdního engraftmentu). Výsledky tandemové transplantace byly hodnoceny den +100 po 2. ASCT. Celková odpověď na terapii byla u 18 (81%) nemocných: 5x CR, 13x PR, 4 pacienti byli refrakterní. Nebyla zaznamenána žádná peritransplantační mortalita. Medián sledování od první ASCT byl 14,1 roku. Konstatováno bylo 12 relapsů/pogresí. Celkové přežití a přežití bez progresse v 10 letech je 54,5% a 50,0%.

Závěr: Tandemová ASCT poskytuje 50% přežití nemocným s rizikovým, relabováním/refrakterním Hodgkinovým lymfomem.

2555.

Alogenní transplantace u Hodgkinova lymfomu – zkušenosti jednoho centra

Mohammadová L. (HOO, Plzeň)

Hodgkinův lymfom a patří k nádorovým onemocněním s vysokou kurabilitou. Relapsy se vyskytují u 10–20% pacientů. Alogenní SCT bývá indikována u nemocných s opakovaně relabujícími a většími refrakterními onemocněními jako jedna z posledních terapeutických možností. Na našem oddělení podstoupilo alogenní SCT s redukovanou intenzitou (Flu/Mel) pro Hodgkinův lymfom od roku 2000 celkem 13 pacientů s medianem věku 37 let (23–56) a 10 (77 %) z nich bylo transplantováno s nepříbuzným dárce. Pravděpodobnost přežití a přežití bez nemoci byla v 1 roce 51 % a 26%, přičemž transplantační mortalita byla 15% v den 100 a 32% v 1. roce. I přes svůj kurativní potenciál je postavení a indikace alogenních transplantací krvetvorných buněk (SCT) u pacientů s Hodgkinovým lymfomem diskutabilním tématem. S ohledem na vysoké riziko mortality, morbiditu a relapsu nemoci není alogenní SCT považována za standardní léčebný postup.

MYELODYSPLASTICKÝ SYNDROM

2612.

Zkušenosti české MDS skupiny s terapií 5-azacitidinem u nemocných s myelodysplastickým syndromem, analýza prognostických faktorů, data nejdéle léčených nemocných a korelace přežívání s historickými daty nemocných léčených standardní terapií

Jonášová A., Čermák J., Mužík J. (I. interní klinika VFN, Praha; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Institut biostatistiky a analýz, MU, Brno; Česká MDS skupina)

Úvod: Naše práce je věnována souhrnu posledních zkušeností České MDS skupiny s 5-azacitidinem (AZA) v terapii nemocných s vyšším rizikem MDS, CMML II a AM a analýze prognostických faktorů celkového přežívání. Přinášíme též naše historická komparativní data výsledků konvenční terapie u MDS s vyšším rizikem.

Pacienti a výsledky: Od října 2008 do září 2013 bylo léčeno 183 nemocných (109 M, 74 F). Medián věku byl 68 let (48–88 let). Dle WHO klasifikace bylo 29 RAEB I, 84 RAEB II, 34 AML/MDS <30% MB, 16 MDS/MPS (CMML II), 7 RCMD, 9 AML a 4 neklasifikované MDS. Medián délky sledování byl 10,4 měsíců (rozsah 1–52), medián podaných cyklů 6 (rozsah 1–32). Cytogenetika byla k dispozici u 139 nemocných. Podle IPSS mělo prognosticky 34,9% dobrý, 19,6% střední a 21% špatný karyotyp. 55% nemocných bylo před zahájením terapie závislých na transfuzích. AZA byla podána jako primoterapie u 80% nemocných. Medián doby od diagnózy do zahájení terapie byl 9 měsíců (0–76). Co se týče odpovědi CR (včetně pouze dřeňové kompletní remise) bylo dosaženo u 24,1 %, PR u 15,3%, SD 15,3%. Celková odpověď OR (CR+PR) byla tedy 39,4 %. Hematologického zlepšení bylo u 41,8%. V roce přežívá 60,6% a medián OS je 16,9 měsíců. 25 nemocných bylo léčeno více než 14 cykly, 17 mužů a 8 žen s medianem věku 70 (61–82) let. 20% z těchto déle žijících nemoc-

ných mělo sekundární MDS. Stran WHO 76 % bylo RAEB II či AML/MDS do 30% blastů a pouze 8% mělo nepříznivou cytogenetiku. Medián OS nebyl dosažen. Stran analýzy prognostických faktorů OS celého souboru jsme hodnotili vliv věku, pohlaví, WHO podskupiny, typu MDS (primární, sekundární), procenta blastů ve dřeni a v periferní krvi, absolutní hodnoty neutrofilů, počtu trombocytů, transfuzní dependence, cytogenetiky a fibrózy dřene. Statisticky významný vliv na OS mají: blasty v periférii, hodnota trombocytů, ECOG PS (performance status) a cytogenetika. Stran přežívání jsme porovnali naši skupinu s historickými daty nemocných léčených na UHKT. Data jsou k dispozici u 67 nemocných, 37 mužů, 30 žen ve věku 19–82 (medián 60). Z toho bylo 42 % léčeno standardní chemoterapií, 19,7 % malými dávkami Ara-C, 8,9 % jinou nízkou dávkovanou terapií a 10,4 % podpůrnou léčbou. Medián přežívání byl 7,5 měsíců s v roce přežívalo pouze 29,9 % nemocných.

Závěr: Naše výsledky dosažení odpovědi a přežívání dobře korelují s daty zahraničních publikovaných klinických souborů. Na základě analýzy predikce odpovědi na terapii můžeme identifikovat nejvhodnější respondenty.

2654.

Imunohistochemický průkaz transkripčních faktorů Fli1 a p53 v kostní dřeni a jejich možná úloha v patogenezi trombocytémie u 5q-syndromu

Neuwirtová R., Střítecký J., Campr V., Fuchs O., Jonášová A. (I. interní klinika VFN, Praha; Ústav patologie, 1. LF UK, Praha; Ústav patologie, 2.LF UK, Praha; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Úvod: V buňkách kostní dřene u 5q-syndromu dochází k haploinsuficienci genu pro ribosomální protein RPS14 a v důsledku toho k tzv.ribosomálnímu stresu, který vede v erytroidních buňkách k potlačení aktivity E3 ubiquitinligázy HDM2. Za normálních okolností HDM2 odbourává transkripční faktor p53. U 5q-syndromu p53 není odbouráván, jeho hladina stoupá a vyvolává předčasnou apoptosu buněk červené řady a inefektivní erythropoezu (Ebert a pol. 2010). Na rozdíl od erythropoezy je u 5q-syndromu megakaryopoeza efektivní. Pokud bychom se najít vysvětlení. Řada experimentálních prací ukazuje na význam transkripčního faktoru Fli1 pro megakaryopoezu. V předchozí práci jsme u pacientů s 5q-syndromem prokázali zvýšenou hladinu Fli1 mRNA. Podle Truonga (2006) se Fli1 u myši váže na promotor genu pro MDM2 a zvyšuje jeho transkripci (Truong 2006). Domníváme se, že by u 5q-syndromu za předpokládané přítomnosti Fli1v megakaryocytech mohl být p53 degradován i při ribosomálním stresu, což by mělo umožnit efektivní megakaryopoezu. Metoda Průkaz naší pracovní hypotézy vyžaduje 1. vyšetřit Fli1 na úrovni proteinu a 2. zjistit, v kterých buňkách kostní dřene se vyskytuje Fli1 a p53. Oba faktory jsme vyšetřili imunohistochemicky pomocí monoklonálních protilátek. Kombinací těchto protilátek a protilátky proti E cadherinu jsme se snažili identifikovat buňky červené řady mezi mononukleáry. Vyšetřeny byly vzorky dřene 10 normálů, 21 nemocných s 5q-syndromem a u 10 MDS nemocných o nízkém riziku s normálním chromosomem 5.

Výsledky: V imunohistochemických preparátech byla prokázána silná pozitivita Fli1 ve většině megakaryocytů a to nejsilněji u 5q-syndromu. U těchto nemocných byla naopak slabá nebo chybějící pozitivita p53 v megakaryocytech. Podle dvojího značení byly erytroidní buňky na p53 pozitivní. Naopak erytroidní buňky značené protilátkou proti E cadherinu se jevíly na Fli1 negativní. Přesnou identifikaci mononukleárů bude nutno dokázat dvojím barvením jak imunohistochemicky, tak pomocí průtokové cytometrie.

Závěr: Imunohistochemické vyšetření kostní dřene potvrzuje přítomnost faktoru Fli1v megakaryocytech a nepřímě tak svědčí pro jeho význam pro megakaryopoezu obecně a u 5q-syndromu zvláště. Současná nízká pozitivita p53 v megakaryocytech je v souladu s inefektivní megakaryopoezou u 5q-syndromu. Objasnění předpokládaného vlivu Fli1 na p53 vyžaduje další vyšetření.

Práce vzniká za podpory grantu IGA MZČR NT/13836 a PRVOUK 27/LF1/1, RVO-VFN646165.

2575.

Kvantifikácia zmien v trepanobiopických vzorkách kostnej drene pri myelodysplastických syndrónoch a akútnych myeloblastových leukémiách

Balhárek T., Marcinek J., Szépe P., Plank L. (Ústav patologickej anatómie, JLF UK a UNM, Martin – SVK)

Štandardnou súčasťou analýzy trepanobiopických vzoriek kostnej drene (KD) pri myelodysplastických syndrónoch (MDS) a akútnych myeloblastových leukémiách (AML) je kvantifikácia prítomných

zmien. Určenie stupňa, podielu alebo rozsahu niektorých fenoménov je častokrát kľúčovým pre typizáciu, klasifikáciu, liečbu alebo prognózu ochorenia. Pri MDS a AML je miera určitých zmien stanovená veľmi striktno, čo však kontrastuje s možnosťami rutinných diagnostických metód. Parametre nadobúdajúce pozitívne alebo negatívne odchýlky od normy (napr. celularita) sa zvyčajne skórujú ako ľahko, stredne a ťažko zvýšené (1+, 2+, 3+) alebo znížené (1-, 2-, 3-). Proporcionalita prekursorov hemopoézy sa vyjadruje podielom myelopoézy a erytropoézy. Zastúpenie megakaryocytov sa môže vyjadriť ich počtom na tzv. veľké zorné pole (HPF), zodpovedajúce 400násobnému zväčšeniu a ploche cca 0,13 – 0,16 mm². Myelofibróza (MF) sa hodnotí konsenzuálnym 4-stupňovým gradingom (MF0 – MF3). Na vyjadrenie stavu zásob Fe pigmentu slúžia 5 až 7-stupňové škály. K najproblematickejšim, ale súčasne najdôležitejším patrí kvantifikácia podielu patologických blastov, ktoré treba v biopsii KD najskôr imunohistochemicky (IHC) vizualizovať a odlíšiť od fyziologických nezrelých prekursorov, čo je nezávadka limitované panelom použiteľných IHC markerov alebo absenciou patologického fenotypu. Podiel blastov sa zvyčajne odhaduje semikvantitatívne ako relatívny percentuálny podiel z celkového počtu jadrovaných elementov KD pri zohľadnení celularity drene, korelovanej s vekom pacienta, fibrózou, prímiesou reaktívnych elementov i aplikovanou liečbou. Objektívnejším je vyjadrenie podielu blastov na určitý počet buniek alebo v presne stanovenej plošnej jednotke. Ďalším postupom je kvantitatívna počítačová (digitálna) 2D obrazová analýza s použitím špeciálnych programov a štatistických výpočtov. Kvantifikácia je vykonávaná rôznymi postupmi s rozdielnou mierou spoľahlivosti, subjektívnej chybovosti a variability medzi hodnotiteľmi. Presnejšie a objektívnejšie matematické a počítačové metódy sú zvyčajne metodologicky i časovo náročnejšie, čo ich zvyčajne znevýhodňuje pre použitie v rutinnej diagnostike. Navyše mnohé zmeny nie sú v KD distribuované rovnomerne. Bioptické nálezy musia byť patológom aj klinikom interpretované kriticky a mali by byť konfrontované s nálezmi ostatných metód (najmä cytomorfológiou a prietokovou cytometriou) a integrované s celkovým klinickým obrazom ochorenia. Podporené Grantom VEGA 1/0209/13.

2567.

Zárodečná mutace GATA2 způsobuje krevní onemocnění a poruchu obranyschopnosti

Starý J., Mejstříková E., Kubričanová-Žaliová M., Janda A., Keslová P., Suková M., Smišek P., Černá Z., Blažek B., Timr P., Blatný J., Lejhancová K., Zemanová Z., Svobodová T., Pohunek P., Čermák J., Sedláček P., Wlodarski M. (*Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2.LF a FN Motol, Praha – CZE ; Centre of Chronic Immunodeficiency, University Medical Centre and University of Freiburg, Freiburg – DEU; Dětská klinika, FN, Píseň – CZE; Dětská klinika, FN, Ostrava – CZE; Dětské oddělení nemocnice, a.s., České Budějovice – CZE; Oddělení dětské hematologie, FN, Brno – CZE; Dětská klinika, FN, Hradec Králové – CZE; Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, UK 1.LF a VFN, Praha – CZE; Pediatrická klinika, UK 2.LF a FN Motol, Praha – CZE; ÚHK, Praha – CZE; Pediatric Hematology and Oncology, Centre for Pediatrics and Adolescent Medicine, University of Freiburg, Freiburg – DEU*)

Transkripční faktor GATA2 reguluje homeostázu krvetvorných kmenových buněk, exprimován je v endotelu, varlotech, buňkách vnitřního ucha, některých typech neuronů. Zárodečné mutace GATA2 mohou způsobit MDS/AML, mírnou nebo těžkou imunodeficienci (monocytopenie, B lymfopenie, mykobakteriální a invazivní plísňové infekce), bradavice, hluchotu, lymfedémy, problémy chování, urogenitální onemocnění. U většiny pacientů se vyvine abnormální karyotyp, monosomie 7 nebo trisomie 8. Projevy imunodeficiency se obvykle manifestují v první dekádě života, zatímco krevní onemocnění ve druhé dekádě a později. Nejčastější hematologickou manifestací je selhání kostní dřeně, buď v podobě hypocelulární refrakterní cytopenie nebo rovnou pokročilého MDS/AML. V České republice jsme dosud diagnostikovali 11 pacientů s deficitem GATA2 ve věku 4–23 let (10 bylo starších deseti let při diagnóze). Devět z nich vyvinulo MDS (refrakterní cytopenie: 6, pokročilý MDS: 3). Monosomie 7 mělo šest pacientů, dva trisomie 8. Z dalších projevů GATA2 deficitu se vyskytly Embergerův syndrom (lymfedémy, porucha sluchu), chronický, léčbu vyžadující, intersticiální plicní proces u dvou pacientů, poruchy chování, recidivující respirační infekce, bradavice, anomálie močových cest. Ve třech rodinách bylo GATA2 mutací postiženo více osob. Monocytopenii a B lymfopenii s typickým nálezem při vyšetření průtokovou cytometrií měla většina nemocných. Sedm pacientů podstoupilo alogenní transplantaci kostní dřeně (3 z nich od GATA2 negativních sourozenců) a všichni žijí. 21letá žena s intersticiálním plicním procesem a léčbu nevyžadující refrakterní

cytopenii zemřela na pneumonii. Sedmnáctiletý chlapec neúspěšně léčený pro MDR-AML s monosomií 7 zemřel v transformaci nemoci do akutní lymfoblastické leukémie. Incidence GATA2 mutace u pacientů s MDS/AML zatím známa není. U dětí se jedná nepochybně o významný predisponující faktor onemocnění. Wlodarski prokázal GATA2 mutaci u 28% ze 156 vyšetřených pacientů s primárním MDS a monosomií 7 nebo trisomií 8 z databáze evropské skupiny pro MDS u dětí EWOG-MDS. Prvním projevem nemoci může být mírná chronická kolísající neutropenie. Detekce typického fenotypu průtokovou cytometrií je vodítkem k molekulárnímu vyšetření. Podpořeno MZ ČR – RVO, FN v Motole 00064203 a granty IGA NT/14534 a IGA NT/11059.

2554.

Chromothripsis v buňkách kostní dřeně nemocných s nově diagnostikovanými myelodysplastickými syndromy (MDS) a komplexními karyotypy

Zemanová Z., Lhotská H., Březinová J., Svobodová K., Lizcova L., Šárová I., Izáková S., Ransdorfová Š., Krejčík Z., Dostálová Merkerová M., Šišková M., Jonášová A., Neuwirtová R., Čermák J., Michalová K. (*Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, VFN a 1. LF UK, Praha; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; 1. Interní klinika, VFN a 1. LF UK, Praha*)

Komplexní karyotypy jsou nalézány u přibližně 20% nemocných s nově diagnostikovaným MDS. Podle mezinárodního skórovacího systému (IPSS-R) jsou považovány za ukazatel špatné prognózy a jejich nálezy jsou spojeny s vysokým rizikem transformace do AML. Zatím však není jasné, jakým mechanismem komplexní aberace vznikají. Jednou z možností je postupná akumulace genetických změn během klonálního vývoje. Podle jiné teorie může dojít k fragmentaci a následně reorganizaci chromosomů nebo jejich částí v jediném okamžiku v důsledku buněčné krize (tzv. chromothripsis). Cílem práce bylo zjistit frekvenci a klinický význam chromothripsis u nemocných s nově diagnostikovaným MDS a komplexními karyotypy. Provedli jsme detailní analýzu buněk kostní dřeně u 170 nemocných s komplexními karyotypy detekovanými při konvenčním cytogenetickém vyšetření v době stanovení diagnózy MDS (85 mužů, 85 žen; medián věku 67 let). Komplexní karyotypy a zlomová místa na přestavěných chromosomech jsme studovali metodou FISH (Abbott Molecular) a mFISH/mBAND (MetaSystems). Nebalancované genomové změny jsme detekovali pomocí čipů CytoChip Cancer SNP 180K (BlueGnome) a/nebo Human CytoSNP-12 arrays (Illumina). Molekulární cytogenetické nálezy u 83 pacientů z této skupiny odpovídaly postupné akumulaci náhodných genetických změn během klonální evoluce. U ostatní 87 nemocných jsme kombinací metod mFISH/mBAND a mikročipových technik identifikovali velké množství zlomů, ztrát nebo naopak zisku genetického materiálu, které pravděpodobně vznikly v důsledku chromothripsis. Často jsme rovněž pozorovali rozpad chromosomů na mnoho malých fragmentů. Tyto fragmenty byly často translokovány nebo insertovány na jiná místa v genomu, čímž vznikly chaoticky přestavěné chromosomy. Fragmentace nejčastěji postihovala chromosomy 5, 7, 17 a 12. Celkové přežití (OS) nemocných s rozpadlými chromosomy a bez známek fragmentace se statisticky významně nelišilo ($p=0.224$; medián OS v obou skupinách 4 měsíce). Znaky chromothripsis jsme pozorovali celkem u 51% pacientů s MDS a komplexními karyotypy. Přestože první publikované práce ukazovaly, že pacienti s chromothripsis mají agresivnější formu onemocnění, v této studii jsme rozdíl v OS obou skupin nepozorovali. Předpokládáme, že u MDS mohou komplexní karyotypy vznikat oběma mechanismy, tj. jak v důsledku chromothripsis, tak i klonálním vývojem. Prognóza nemocných je v obou případech velmi špatná. Podpořeno RVO-VFN64165, GAČR P302/12/G157/1, PRVOUK-P27/LF1/1 a MZČR00023736.

2546.

Diagnostika a léčba chronické myelomonocytové leukémie v letech 2000–2013 – zkušenosti 2 center

Rohoň P., Bělohávková P., Rusiňáková Z., Voglová J., Zavrželová A., Vondráková J., Raida L., Faber E., Jarošová M., Žák P., Indrák K. (*Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc; IV. Interní hematologická, FN, Hradec Králové; Klinická hematologie, Nemocnice, České Budějovice*)

Úvod: CMML je klonové ochorenie hemopoetickej kmeňovej bunky, ktoré vykazuje rysy myelodysplázie i myeloproliferácie a vyskytuje sa prevažne u starších osôb. Cieľ práce: Popísať súbor pacientov s CMML diagnostikovaných a liečených v centrách Olomouc a Hradec Králové v rokoch 2000–2013.

Súbor pacientov, metódy: Do hodnotenia bolo zahrnutá skupina 35 osôb (21 mužov, 14 žien) s vekovým mediánom 67,5 roka (47–85). Rozdelenie podľa WHO 2008 ukazovalo pomer CMML-1/CMML2 (22/13), podľa FAB pomer MD/MP variantu 19/16. Pomocou cytogenetického vyšetrenia mala väčšina pacientov v čase diagnózy normálny karyotyp (27), komplexné zmeny (2) a iné prestavby vrátane monozómie 7 (4), v 2 prípadoch nebolo vyšetrenie úspešné. Pre účely prognostickej klasifikácie bolo použité CPSS skóre (WHO a FAB klasifikácia, cytogenetika, transfúzna závislosť). Podľa tohto systému boli 5 pacienti zo skupiny nízkeho, 13 zo skupiny intermediárneho-1 a 14 zo skupiny intermediárneho-2 rizika. Iba 6 osôb z celého súboru podstúpilo ASCT, 3 pacienti žijú s prejavmi limitovanej chronickej formy GvHD, najdlhšie v intervale 20 mesiacov. 5-AZA bol podaný 8 pacientom (2x vo forme premostujúcej liečby pred ASCT), maximálny počet cyklov bol 12, v súčasnosti žijú 3 pacienti. Analýza prežitia bola realizovaná pomocou Kaplanovej-Meierovej metódy. Krivky prežitia boli porovnávané pomocou log-rank testu.

Výsledky: S mediánom sledovania 19,5 mesiaca (5–126) žije 14 osôb. Pravdepodobnosť 5-ročného celkového prežitia (OS) v našom súbore je 22,7%. CPSS je dobrý prognostický ukazovateľ (LR vs. INT-1 vs. INT-2; $p=0,004$). Medzi poskupinami podľa WHO 2008 a FAB klasifikácie neboli štatisticky významné rozdiely v OS. Taktiež jednoduchý ukazovateľ, hladina LDH, nepotvrdila v našom súbore vplyv na OS. Komplexné cytogenetické zmeny a monozómia 7, transfúzna závislosť boli negatívnymi prognostickými ukazovateľmi, čo však komplexne zhodnocuje CPSS.

Záver: Všetky hodnotenia sú limitované obmedzeným počtom pacientov v súbore. Nový, jednoduchý skórovací systém CPSS sa zdá byť dobrým prognostickým ukazovateľom. V poslednom období dochádza k spresneniu diagnostiky CMML (väčšina pacientov v súbore je z obdobia posledných 5 rokov) a liečby pacientov novými molekulami (5-AZA). Hoci existuje snaha o implementáciu poznatkov z molekulevej biológie CMML (napr. mutácie TET2 génu) do stratégie liečby, jej výsledky sú stále neuspokojivé. Práca bola podporená grantom LF-2014-001.

MNOHOČETNÝ MYELOM

2631.

Vyhodnocení projektu časné diagnostiky mnohočetného myelomu-projekt CRAB

Straub J., Adam Z., Gregora E., Hájek R., Maisnar V., Ščudla V., Schützová M., Špička I.

(I. interní klinika-klinika hematologie, 1. LF-UK a VFN, Praha; Interní hematologická klinika, MU a FN, Brno; Interní hematologická klinika, FNKV, Praha; Klinika hematologie, LF OU a FN, Ostrava; II. interní klinika, OKH, LF a FN, Hradec Králové; III. interní klinika, UP a FN, Olomouc; Hematologicko-onkologické oddělení, UK a FN, Plzeň)

Mnohočetný myelom (MM) se svojí incidencí 4/100 000 obyvatel patří do skupiny vzácně se vyskytujících nemocí. Nejen malý počet nemocných, ale i rozmanitost vstupních příznaků velmi často vede k pozdní diagnostice tohoto onemocnění. V roce 2007 bylo v České republice včas (tj. do 3 měsíců od prvních projevů myelomu) diagnostikováno pouze 53 % nemocných. 37 % pacientů mělo vstupně patologickou frakturu, 21 % neurologický deficit a 9 % pacientů bylo zachyceno ve stadiu renálního selhání s nutností hemodialýzy. Včasné zachycení nemoci přitom významně zvyšuje úspěšnost léčby, zabraňuje nezvratným poškozením organismu pacienta a tím přispívá k prodloužení a zlepšení kvality jeho života. Z těchto důvodů Česká myelomová skupina 1.4.2007 zahájila celorepublikový edukační program časného zachytu MM – „Projekt CRAB“. Po 3 letech komplexní edukace lékařů prvního kontaktu došlo ke zlepšení včasného zachytu o 10 %. V roce 2013 probíhalo další vyhodnocení, jehož výsledky budou zpracovány a prezentovány.

2634.

Dlouhodobá udržovací léčba lenalidomidem: pro a proti-výsledky analýzy dat z registru monoklonálních gamapatií České myelomové skupiny

Maisnar V., Špička I., Ščudla V., Gregora E., Adam Z., Jarkovský J., Hájek R. (IV. interní hematologická klinika, FN a LF UK, Hradec Králové; VFN a 1. LF UK, Praha; FN a LF UP, Olomouc; FNKV a 3. LF UK, Praha; FN a LF MU, Brno; IBA MU, Brno; FN a LF, Ostrava)

Lenalidomid je vysoce účinný lék ze skupiny imunomodulačních léčiv. V současné době je v České republice indikován k léčbě rezistentního/relabujícího mnohočetného myelomu (MM); očekává se

jeho registrace také v primoterapii a v udržovací léčbě. V souvislosti s terapií MM lenalidomidem již bylo prokázáno, že kontinuální léčbou je možné zlepšit jak léčebnou odpověď, tak i prodloužit přežití bez progresu onemocnění (PFS). V poslední době se však objevily názory, že zlepšení krátkodobých výsledků nemusí být provázeno pozitivním efektem na celkové přežití nemocných. **Cíl:** V naší analýze dat z registru monoklonálních gamapatií jsme se proto zaměřili na porovnání léčebného efektu lenalidomidu s ohledem na celkové přežití. Porovnávali jsme navzájem výsledky dlouhodobého podávání lenalidomidu s dexamethasonem v rámci klinických studií, kdy byl podáván kontinuálně až do relapsu onemocnění, a pacientů léčených na základě limitované úhrady ze zdravotního pojištění (4 200 mg).

Pacienti a metody: Celkově jsme analyzovali data získaná od 291 MM pacientů s alespoň jednou předchozí terapií. Z toho 48 pacientů bylo léčeno kombinací lenalidomidu s dexamethasonem dlouhodobě v rámci standardního ramene klinického hodnocení a 204 pacientů pak stejnou terapií, ale maximálně v počtu 8–10 podaných cyklů na základě stanovených limitů zdravotních pojišťoven.

Výsledky: Při srovnatelných základních charakteristikách byla celková léčebná odpověď statisticky významně lepší ve skupině pacientů s kontinuální terapií lenalidomidem (58,3 oproti 40,2%; $p = 0,005$). Při statisticky významně delším trvání léčby v rámci studií (medián 9,2 resp. 5,8 měsíce; $p < 0,001$) bylo dosaženo v rámci skupiny pacientů s kontinuální léčbou statisticky významně lepších i u všech charakteristik trvání léčebného efektu (u PFS, TTP, DOR i OS bylo $p < 0,001$). Obdobná jako v registračních studiích MM-009 a MM-010 byla i frekvence pozorovaných nežádoucích účinků léčby. **Shrnutí:** Výsledky naší analýzy dat z Registru monoklonálních gamapatií tak potvrdily výhody dlouhodobé léčby pomocí lenalidomidu s dexamethasonem. Takové je i současné doporučení uváděné v rámci SPC přípravku, který by měl být podáván do progresu onemocnění. V rámci sdělení budou diskutovány současné názory pro a proti tomuto doporučení. Kromě lepší celkové léčebné odpovědi jsme na našem souboru potvrdili význam dlouhodobé léčby i pro trvání léčebné odpovědi a to včetně celkového přežití.

2556.

Účinnost režimů s lenalidomidem a režimů s bortezomibem u 144 pacientů s prvním relapsem mnohočetného myelomu

Krejčí M., Adam Z., Pour L., Křivanová A., Ševčíková E., Pelcová J., Mayer J. (Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno)

Úvod: Inhibitory proteasomu a imunomodulační látky tvoří v současné době důležitou součást terapie mnohočetného myelomu (MM). Není jasné, zda některý z těchto nových léků dosahuje signifikantně vyšší účinnosti oproti jiným v léčbě prvního relapsu MM. Cílem této retrospektivní analýzy bylo zhodnocení účinnosti terapie režimy na bázi lenalidomidu (72 případů) a režimy na bázi bortezomibu (72 případů) u celkem 144 pacientů s prvním relapsem MM.

Metody: Obě léčebné skupiny byly srovnatelné v základních klinických parametrech (věk, klinická stádia dle ISS a DS, typ M-proteinu, výskyt renální insuficience a léčba první linie). Klinická stádia dle ISS byla následující: stádium 1 u 32% pac. (46/144), stádium 2 u 43% pac. (62/144) a stádium 3 u 25% pac. (36/144). Renální insuficience byla přítomna u 19% nemocných (27/144). Medián věku byl 69 let (rozpětí: 49–83). Medián sledování od zahájení terapie byl 32 měsíců. Režim na bázi lenalidomidu (L-režim) byl použit u 72 pac.; L+alkylační látka+ dexamethason: 54 pac. (75%), L+dexamethason: 15 pac. (21%), samotný L: 3 pac. (4%). Pacienti byli léčeni lenalidomidem v dávce 25 mg denně (den 1–21, opakování cyklu den +28), u případů s renální insuficiencí byla dávka L redukována na 10 mg. Režim na bázi bortezomibu (B-režim) byl použit u 72 pac.; B+alkylační látka+dexamethason: 58 pac. (81%), B+dexamethason: 11 pac. (15%), samotný B: 3 pac. (4%). Pacienti byli léčeni bortezomibem ve standardní dávce 1,3 mg/m² subkutánně v dny 1, 4, 8, 15. Léčebný cyklus se opakovával den 21–28, léčba byla ukončena v případě progresu MM nebo po podání 9 cyklů. Medián počtu podaných L- a B-cyklů byl 5, rozpětí 1–9.

Výsledky: V L-skupině byla celková léčebná odpověď (ORR) 56%, 10% pac. dosáhlo CR, 21% VGPR, 25% PR, 8% MR nebo SD a 35% pacientů mělo progresi MM. Medián doby do progresu (TTP) byl 18,4 měsíce, medián celkového přežití (OS) byl 38,3 měsíce. V B-skupině byla celková léčebná odpověď (ORR) 51%, 13% pac. dosáhlo CR, 16% VGPR, 22% PR, 16% MR nebo SD a 33% pacientů mělo progresi MM. Mediány TTP a OS od zahájení terapie byly 18,2 měsíce a 40,8 měsíce. Toxicita terapie dle CTC kritérií byla v obou léčebných skupinách srovnatelná.

Závěr: Režimy na bázi lenalidomidu a na bázi bortezomibu jsou efektivní v léčbě prvního relapsu MM, celková léčebná odpověď je 51–56%. Mediány TTP a OS jsou obdobné v obou skupinách. Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly mezi L-režimem a B-režimem u prvního relapsu MM, pokud jde o léčebné odpovědi, TTP a OS.

2529.

Pilotní hodnocení nízkodávkové výpočetní tomografie (LD-CT) u nemocných s mnohočetným myelomem – srovnání s konvenční radiografií (RTG) a celotělovou magnetickou rezonancí (WB-MR)

Minařík J., Hrbek J., Pika T., Bačovský J., Heřman M., Ščudla V. (III. interní klinika – NRE, FN a LF UP, Olomouc; Radiologická klinika, FN a LF UP, Olomouc)

Úvod a cíle: Hodnocení myelomové kostní nemoci (MKN) v současnosti závisí na vyšetření RTG, nebo na citlivější metodice celotělové magnetické rezonance (WB-MR). Jako alternativa se jeví nízkodávková výpočetní tomografie (LD-CT), která je ekonomicky nenáročná a časově méně zatěžující než RTG i WB-MR. Cílem předloženého hodnocení je posouzení metodiky LD-CT u mnohočetného myelomu (MM) ve vztahu k RTG i WB-MR.

Pacienti a metody: Zhodnoceno bylo 27 nemocných s MM vyšetřených na našem pracovišti v průběhu roku 2013. V rámci vstupní diagnózy bylo provedeno posouzení MKN pomocí RTG, WB-MR a LD-CT, nejpозději do 1 měsíce od zahájení chemoterapie. Stav postižení skeletu byl hodnocen jako přítomnost 0, 1, 2, 3 a 3 a více lézí skeletu v zobrazeném rozsahu, případně přítomnost patologické zlomeniny a extramedulárního postižení.

Výsledky: Při hodnocení MKN na lebce souhlasil nále z RTG a LD-CT v 18 z 25 případů. U 6 jedinců zachytilo LD-CT více ložisek, ve 4 případech (16%) byl nále z pozitivní s negativitou RTG. LD-CT souhlasilo s WB-MR v 5 z 11 případů. V jednom případě WB-MR zobrazilo více ložisek, v 5 případech bylo výtěžnější LD-CT. Při hodnocení páteře korelovalo LD-CT s RTG v 6 z 26 případů, v 15 případech zachytilo výraznější postižení než RTG, v 7 případech (27%) při negativitě RTG vyšetření. Vyšetření LD-CT korelovalo s WB-MR v 10 ze 17 případů, větší rozsah zachytilo v 1 případě, v 6 případech byla citlivější WB-MR. Negativita RTG s pozitivitou WB-MR byla zjištěna v 10 případech (59%). Při hodnocení pánve souhlasilo vyšetření LD-CT s RTG v 13 z 24 případů. V 6 případech zachytilo vyšší počet lézí, LD-CT pozitivita s RTG negativitou byla přítomna ve 4 případech (17%). LD-CT korelovalo s WB-MR v 9 ze 14 případů, WB-MR zachytilo výraznější nále z v 3 případech, LD-CT bylo senzitivnější ve 2 případech. Extramedulární propagace byla zachycena v 7 případech, pouze v jednom případě na RTG, nále z na WB-MR a LD-CT byl obdobný.

Závěr: LD-CT prokázalo vyšší citlivost v detekci MKN než RTG. V porovnání s WB-MR byl dle LD-CT nále z méně výrazný na páteři, naopak lebka byla zobrazena s vyšší citlivostí. Detekce extramedulárních mas byla u WB-MR i LD-CT obdobná. Zásadní byl záchyt osteolytického a extramedulárního postižení u RTG negativních nále zů. Vyšetření LD-CT je rychlou a ekonomicky nenáročnou alternativou k WB-MR a může být využito u jedinců s nově diagnostikovaným MM, u nichž není možné v krátkém horizontu doplnit WB-MR.

Za podpory grantu IGA MZ CR NT 14393.

2513.

Analysis of thymidine kinase serum levels by novel method DiviTum™ in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance – comparison with imaging methods 99mTc-MIBI scintigraphy

Bačovský J., Mysliveček M., Minařík J., Ščudla V., Pika T., Zapletalova J., Adam T., Gronowitz Simon J., Petrova P., Bartkova M. (Department of Internal Medicine III – Nephrology, Rheumatology and Endocrinology, University Hospital, Olomouc – CZE; Department of Nuclear Medicine, University Hospital, Olomouc – CZE; 3Department of Medical Biophysics and Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc – CZE; Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc – CZE; Biovica AB, Uppsala Science Park, Uppsala – SWE)

Background: Increased activity of thymidine kinase (TK) in serum is associated with higher proliferation rates in hematological malignancies. Imaging methods such as 99mTc-MIBI scintigraphy or 18F-FDG PET/CT can visualize active myeloma lesions and their positivity is a negative prognostic factor. Aims: The study aimed at comparing two methods for evaluating thymidinekinase TK in serum – an older RIA method and novel DiviTum™ – in patients with MM and MGUS, and also comparing them with biochemical markers and degree of activity evaluated by imaging methods 99mTc-MIBI scintigraphy and 18F-FDG PET/CT. Methods: Serum thymidinekinase TK levels were evaluated by DiviTum™ and an RIA method (TK REA kit by Immunotech); The study analyzed correlation of TK activity in serum with biochemical markers reflecting activity of MM: β 2-m, LDH, the ratio of kappa to lambda (κ/λ) free light chains and percentage of bone marrow plasma cells (BMPC). 99mTc-MIBI scintigraphy and 18F-FDG PET/CT were performed at the time of diagnosis. The degree of activity was expressed semiquantitatively. Scans were classified as 0 (normal activity), 1 (diffuse positivity) or 2 (focal positivity).

Results: We found a strong positive correlation between TK in serum evaluated by DiviTum™ and by TK REA. The DiviTum™ analytic method extended the detection range and was able to detect higher levels of TK than the RIA method. DiviTum™ technique found positive correlation with β 2-m ($r = 0.497$) and LDH ($r = 0.502$) and moderate positive correlation with BMPC ($r = 0.368$). Significantly higher TK values measured by TK REA and DiviTum™ in the group of patients with MM (stages I, II or III) than in those with MGUS. Increased TK levels were observed in MIBI- or PET/CT-positive patients. Analysis of repeated measurements of TK in serum during treatment of MM patients found a correlation between change in TK measured by DiviTum™ and LDH during treatment.

Summary/Conclusion: Analysis revealed a significant correlation between TK in serum and LDH, β 2-m and BMPC. Increased levels of TK in serum were observed in MIBI- or PET/CT-positive patients. Combination of positivity of imaging methods which can localize active tumor lesions and increased levels of TK in serum can have an impact on decision-making and optimization of the therapeutic approach. This work was supported by grant IGA MZ ČR NT 12215-4/2011, IGA MZ ČR NT 14393 and by the research project Biomedreg CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

2587.

Detekce monoklonální B-lymfocytární populace u systémové a ložiskové AL amyloidózy

Pika T., Novák M., Látalová P., Flodr P., Minařík J., Bačovský J., Ščudla V. (III. interní klinika-NRE, LF UP a FN, Olomouc; Hematoonkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc; Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP a FN, Olomouc)

Úvod: AL amyloidóza je systémové nebo orgánově limitované hematologické onemocnění patřící do skupiny monoklonálních gamapatií. Průkaz monoklonální buněčné populace patří mezi stěžejní aspekty v diagnostice nemocných s tímto onemocněním. Cíl: Cílem studie bylo zhodnocení průkazu plazmocytární populace u nemocných se systémovou a ložiskovou AL amyloidózou s využitím cytologických, imunohistochemických metod a techniky průtokové cytometrie. Soubor: Sledovaný soubor tvořilo 13 nemocných se systémovou AL amyloidózou a 5 nemocných s formou ložiskovou (orbita, jazyk, trachea, stehno, plíce). U všech nemocných byla provedena trepanobiopsie s cytologických, imunohistochemickým vyšetřením (CD138, klonalita), barvením na přítomnost amyloidu a vyšetřením multiparametrickou průtokovou cytometrií (M-FC).

Výsledky: V případě systémové AL amyloidózy medián infiltrace plazmocyty představoval 4,6 % (1,2–10,4 %), v případě imunohistochemie pak 7 % (3–20 %), průkaz monoklonálních populace byl u 11/13 nemocných v případě imunohistochemie, při užití M-FC pak u 13/13 nemocných. Medián počtu aberantních plazmocytů činil 88,7 % (12–93,1%). Depozita amyloidu ve dřeni či ve stěně cév dřeně byla zjištěna u 4 nemocných. V případě ložiskové AL amyloidózy pak medián infiltrace kostní dřeně plazmocyty činil 0,3% (0,1–0,6 %), v případě imunohistochemie pak 5% (3–9%), u všech nemocných nebyla prokázána v kostní dřeni monoklonální populace, ani v případě užití M-FC. Medián aberantních plazmocytů činil 4 % (1–7 %). Jako příčina ložiskové amyloidózy byl v 1 případě zjištěn extranodální lymfom z marginální zóny MALT-typu (stehno), ve 2 případech fokálně přítomná monoklonální plazmocytární populace (orbita, trachea), v 1 případě se jednalo o pacienta s vysoce aktivní formou Sjögrenova syndromu (jazyk).

Závěr: Průkaz klonu B-lymfocytů je jedním z důležitých aspektů diagnostického algoritmu AL amyloidózy, přičemž v případě systémové AL amyloidózy představuje M-FC citlivější metodu nežli imu-

nohistochemické vyšetření, vzhledem k nízkému procentu dřevňové infiltrace patologickou populací. U ložiskové AL amyloidózy často nelze klon v místě postižení prokázat, příčinou produkce může být i jiný typ B-lymfocytární neoplázie.

S podporou grantu NT 12451/5, NT 14400 a IGA-LF-2014-001.

KONFERENCE ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ 2

2643.

Proveditelnost výběru nepřibuzných dárců genetickou typizací KIR

Fryčová M., Jindra P., Venigová P., Blažek J., Kúsová J. (HLA laboratoř, ČNRDD, Plzeň)

Cíl: Několik nedávno publikovaných studií ukazuje, že výsledky transplantací u pacientů postižených AML mohou být kromě HLA genů ovlivněny i dalšími geny. Obzvláště je zmiňován rostoucí počet důkazů vlivu genů KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors) na ochranu před relapsem. Protože se HLA a KIR geny izolují nezávisle na sobě, pouze menšina HLA shodných párů dárce-příjemce je také KIR shodných. Proto přítomnost genů KIR může být kritériem UD výběru v případech, kdy existuje větší množství HLA shodných dárců. Cooley et al. (2010) ukázal, že specifické složení motivů centromerních a telomerních B haplotypů přispívá k ochraně před relapsem a zvyšuje šanci na úplné vyléčení.

Metody: Na základě této studie jsme zahájili genetickou typizaci KIR u potenciálních dárců, pokud lze volit z několika 10/10 nebo 9/10 HLA shodných UD u daného pacienta. Genotypizace byla prováděna metodikami PCR-SSP či SSOP pomocí komerčně dostupných kitů. Provedli jsme genovou typizaci 103 nejlépe shodných HLA dárců pro 34 vybraných pacientů s AML. Přítomnost KIR haplotypů A a B stejně jako jejich kombinací byla určena z druhu a počtu genů KIR.. Všechny genotypy byly zadány do kalkulátoru, který umožňuje zadání až pěti potenciálních dárců a získání jejich přiřazení do jedné z 3 skupin dle obsahu KIR B. Skupiny, „neutrální“, „lepší“, „nejlepší“, odkazují na příslušnou ochranu proti relapsu.

Výsledky: Genová typizace KIR při hledání dárců odhalila 29 dárců s AA haplotypy, 58 dárců s AB haplotypy a 16 dárců s BB haplotypy. Po přiřazení stavů přítomnosti KIR B jsme objevili 71 „neutrálních“ dárců, 22 „lepších“ dárců a 10 „nejlepších“ dárců. U 21 (~62%) pacientů byli k dispozici dárci s různými stavy přítomnosti KIR B. Tito pacienti představují skupinu, kde by mohlo být použito výběrové kritérium přítomnosti KIR B genu u dárce.

Závěr: Potvrdili jsme, že dodatečný výběr HLA shodného nepřibuzného dárce na základě obsahu KIR B genů je proveditelný. Výběr takového dárce může zlepšit transplantační výsledky u pacientů s AML.

2596.

Výroba léčivého přípravku z mesenchymálních kmenových buněk pro léčbu reakce štěpu proti hostiteli

Vrbová J., Holubová M., Lysák D., Jindra P. (Hematologicko-onkologické oddělení, FN, Plzeň)

Transplantace hematopoetických buněk je jednou z léčebných strategií u hematologických malignit, která bývá u spousty pacientů jedinou šancí na překonání choroby. Mnohdy se však po úspěšné transplantaci mohou rozvinout potransplantační komplikace, mezi které patří také reakce štěpu proti hostiteli (GVHD). Standardní léčbou pro GVHD bývá imunosuprese, která však u části pacientů nefunguje. Aplikace mesenchymálních kmenových buněk (MSC), které mají schopnost potlačovat nežádoucí reakci darcovských imunokompetentních buněk, představuje slibnou metodu potransplantační imunoterapie v léčbě GVHD se suboptimální odpovědí na imunosupresivní léčbu. Výroba léčivého přípravku obsahujícího MSC je několikastupňový proces, který začíná izolací mononukleárních buněk gradientovou centrifugací z 20ml kostní dřeně zdravého dárce. Frakce mononukleárních buněk je nasazena na jednu 175cm² kultivační láhev s kompletním kultivačním médiem – CCM (alpha-MEM medium +10 % poolovaného destičkového lyzátu – pHPL, 2IU/ml heparin). Po 48 hodinách jsou neadherentní buňky (lymfocyty, monocyty) odmyty a k adherentním buňkám (MSC) se přidá čerstvé CCM, které se pak mění 2–3x týdně. Po dosažení 80–90% konfluency se buňky uvolní z povrchu a pasážují do dalších kultivačních lahví. Pasážování se provádí celkem

2x. Při třetí pasáži jsou buňky zamrzeny ve formě aliquotů (meziprodukty) v koncentraci 1x10⁶ v 1ml kryomédia (60% alpha MEM + 30% pHPL+10%DMSO). V případě potřeby výroby léčivého přípravku se rozmrazí 4–6 aliquotů (podle váhy pacienta) a buňky se re-kultivují po dobu 5–8 dní. Poté se opět uvolní z povrchu, promyjí a smícháním s 300ml fyziologického roztoku s 5% albuminem se připraví finální léčivý přípravek obsahující 1-5x10⁶ MSC na 1kg pacienta. Vzhledem k tomu, že se jedná o přípravek moderní terapie schválený SÚKL, v průběhu celé výroby probíhají rozsáhlé kontroly kvality. Při izolaci, pasážích i výrobě se monitoruje počet částic a mikrobiální kontaminace laminárního boxu. Dále se testuje sterilita vyrobených meziproduktů i samotného léčivého přípravku a je sledována kontaminace mycoplazmou. Při každé pasáži je navíc stanoven charakteristický imunofenotyp MSC, viabilita a čistota buněk. U re-kultivovaných buněk se testuje zachování jejich imunomodulačního potenciálu pomocí ko-kultivace s nespecificky aktivovanými lymfocyty a průtokové cytometrie. Zvládnutí kultivační techniky v podmínkách správné výrobní praxe je základem pro vývoj nových možností buněčné terapie.

2582.

Je každé prodloužení aPTT spojeno s rizikem krvácení?

Tučková G., Sadílek P., Dulíček P. (IV. interní hematologická klinika-laboratoř, FN, Hradec Králové)

Popisujeme případ 53-letého muže, který byl přijat k operaci krční páteře (bez poruchy mobility) na neurochirurgickou kliniku FN v Hradci Králové. Po stránce interní se s ničím neléčil. V rodinné ani osobní anamnéze nebyla zmínka o sklonu ke krvácení či trombóze. Sám podstoupil laparoskopickou cholecystektomii bez krvácivých komplikací v 50 letech věku. Úraz krční páteře utrpěl 3 měsíce před přijetím na neurochirurgii během zahraniční dovolené. Nemocný byl přijat s vizí operace následující den, ale při laboratorním vyšetření před zákrokem bylo provedeno koagulační vyšetření s následujícím výsledkem: Trombocyty 239 x 10⁹/l, protrombinový test (PT) v normě, ale aPTT prodlouženo na 68,1 s (kontrola 34,3 s), poměr: 1,99. Vyšetření bylo proto chirurgem doporučeno zopakovat. Kontrolní vyšetření však opět prokázalo prodloužené aPTT. Bylo doporučeno hematologické konzilium, které indikovalo dovyšetření prodlouženého aPTT s tím, že během 24 h bude definitivní závěr a doporučení stran operačního výkonu. Nicméně nemocný byl propuštěn a doporučeno další přijetí až za 3 týdny. Již 2. den byly provedeny následující testy viz. tabulka 1.

Závěr: prokázána protilátka typu lupus antikoagulans a k údivu operátora nedoporučena transfúze krevní plazmy, ale tromboprolaxe nízkomolekulárním heparinem (LMWH) po operaci do doby plné mobilizace. Každé prodloužení aPTT nemusí být spojeno s rizikem krvácení a automatickou přípravou plazmou k operaci, jak je bohužel často vidět v klinické praxi. Diagnózu lze stanovit velmi rychle a není nutné operaci odkládat.

2553.

Vliv stáří erytrocytárních transfuzních přípravků na frekvenci výskytu febrilní nehemolytické potransfuzní reakci (FNHTR)

Kalmanová P., Häutlerová T., Grögerová D., Holusková I., Galuszková D. (Transfuzní oddělení FN, Olomouc)

Úvod: Dle Vyhlášky MZ č.143/2008 Sb., o lidské krvi je stanovena expirace erytrocytárních transfuzních přípravků na 42 dní ode dne odběru. Snahou transfuzního oddělení FNOL je vydávat erytrocytární transfuzní přípravky (TP) do 28. dne od odběru. Cílem naší práce bylo zjistit, zda TP po 28 dní od odběru jsou zatíženy častějším výskytem potransfuzní reakce (PR) typu FNHTR. Metodika: Byla zpracována data z vyplněných formulářů „Zpráva o nežádoucím účinku transfuze“ za období 2009–2013. PR, které byly po přešetření uzavřeny jako FNHTR, byly rozděleny dle stáří vydaných erytrocytárních TP do 3 skupin podle dnů od odběru. Do první skupiny byly zařazeny erytrocytární TP vydané do 14. dne od odběru, do druhé skupiny erytrocytární TP vydané od 15. do 28. dne od odběru. Do poslední, třetí skupiny, byly zařazeny erytrocytární TP vydané po 28. dni od odběru. Potransfuzní reakce byly hlášeny z klinických oddělení FNOL i ze spadových zdravotnických zařízení. **Výsledky:** Celkem bylo v letech 2009–2013 hlášeno 221 PR, z toho bylo 168 PR na TP vyrobené TO FNOL. Ve 118 případech se jednalo o PR na erytrocytární TP a v 53 případech byla PR uzavřena jako FNHTR. Celkem bylo v letech 2009–2013 vyexpedováno z našeho Transfuzního oddělení 103 194 T.U. erytrocytárních TP. Počet erytrocytárních TP vydaných do 14. dne od odběru činil 52 177

T.U. a jako PR typu FNHTR bylo uzavřeno 21 PR (0,04%). Počet erytrocytárních TP vydaných od 15. do 28. dne od odběru činil 38 784 T.U., a jako PR typu FNHTR bylo uzavřeno 18 PR (0,04%). Počet erytrocytárních TP vydaných po 28. dni od odběru činil 12 233 T. U., a jako PR typu FNHTR bylo uzavřeno 14 PR (0,11%).

Závěr: Z uvedených údajů vyplývá, že stáří vydaných erytrocytárních TP má vliv na výskyt PR typu FNHTR. Na našem Transfuzním oddělení máme od 1. 10. 2011 plánované zvaní dárců krve na běžný odběr. V souvislosti s plánovaným dárcovstvím krve došlo na našem skladě ke snížení počtu erytrocytárních TP starších 28 dnů a tudíž i ke sníženému výdeji směrem k pacientům a ke snížení počtu FNHTR na TP starších 28. dnů.

2550. Prenatální vyšetření jako prevence vzniku Hemolytického onemocnění plodu a novorozence (HON)

Hauerová M., Stražilová L., Holusková I., Galuszková D. (Transfuzní oddělení, FN, Olomouc)

Úvod: Hemolytické onemocnění plodu a novorozence (HON) je nemoc charakterizovaná zkráceným přežíváním erytrocytů plodu a novorozence s následnou hemolýzou vlivem vazby mateřských aloprotilátek. HON můžeme podle specifity protilátek rozdělit do 3 skupin: Rh HON, AB0 HON a ostatní. Mezi klinicky významné protilátky způsobující HON patří aloprotilátky anti-D,-K, -c, -E, -C, -Ce, -cE, -Fy(a), -Jk(a), -A, -B třídy IgG. Mezi klinicky nevýznamné z hlediska HON patří aloprotilátky -P1, -Le(a), -Le(b), -H, -I, -HI, -N, -Lu, panspecifické protilátky, chladové protilátky a protilátky reagující pouze v enzymovém prostředí. Metodika: V rámci prenatálního vyšetření by každé těhotné ženě měla být v prvním trimestru těhotenství vyšetřena krevní skupina v AB0 RhD a screening nepřídatelných tepelných antierytrocytárních protilátek (SP). V případě pozitivního SP je provedena identifikace protilátky a v případě, jedná-li se o klinicky významnou aloprotilátku i její titrace. V rámci podezření na HON u novorozence vyšetřujeme KS a SP u matky, KS, SP, přímý antiglobulinový test a v případě jeho pozitivity i eluční test u novorozence. Byla zpracovávána data za období 2011–2013.

Výsledky: V letech 2011 až 2013 bylo přešetřeno 89 novorozenců s podezřením na HON a tato diagnóza byla potvrzena u 57 z nich. V 18 případech se jednalo o HON v Rh systému, ve 35 případech o HON v AB0 systému a ve 4 případech o HON v ostatních antigenních systémech. Intrauterinní transfuze byla provedena 1x a výměnná transfuze byla provedena u 9 novorozenců.

Závěr: Nejčastěji diagnostikovaným hemolytickým onemocněním plodu a novorozence bylo HON v AB0 systému, které však nepředstavuje výraznější klinický problém, neboť zřídka vede k závažnější formě HON. Kvalitní prenatální vyšetření umožní vytipovat pacientky rizikové z hlediska HON a jejich včasné předání do rizikové poradny k dalšímu sledování jinými než imunohematologickými metodami. Velmi důležitá je pak zejména spolupráce imunohematologa, gynekologa a event. i neonatologa.

2588. Hodnocení schistocytů

Juráňová J., Mikulenková D., Indrák K. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Schistocyty / schizocyty (z řeckého slova schisto, tzn. rozdrčený, rozštěpený) jsou cirkulující fragmenty červených krvinek, které vznikají mechanickým poškozením v krevním oběhu (např. fibrinovými vlákny na endotelálním povrchu). Hematologické laboratoře v České republice dosud nemají stanovená jednotná hodnotící kritéria. Kromě nesouladu v terminologii (fragmentocyty), v morfologickém popisu schistocytů, ve výběru posuzované oblasti (optimální místo v krevním nátěru), existuje i rozdíl v metodě jak vyjádřit jejich zastoupení – kvalitativní (celkový přehled se slovním hodnocením schistocytů přítomny/nepřítomny) nebo kvantitativní hodnocení (stanovení počtu schistocytů). V neposlední řadě existuje i rozdílnost ve sdělení informace o přítomnosti schistocytů v nátěru periferní krve lékařům. Nedostatek standardizace může vést k nedůslednosti nebo k nesprávné diagnostice, která pak ovlivňuje léčbu a klinický výsledek. Naše sdělení vychází z mezinárodního ICSH doporučení a zaměřuje se na postupy mikroskopické identifikace schistocytů, jejich diagnostické hodnocení a kvantifikaci. Tyto poznatky mohou být využity v další laboratorní praxi.

NHL

2564.

K problémem diferenciální bioptické diagnostiky malobunkových B-NHL: CLL versus MCL
Fridrichová H., Plank L., Szépe P., Balhárek T., Marcinek J., Farkašová A., Kviatkovská Z. (Martinské bioptické centrum, s.r.o., Martin – SVK; Ústav patologické anatomie JLF UK a UN v Martine a Martinské bioptické centrum, s.r.o., Martin – SVK)

Úvod: Diferenciální diagnostika (dále DD) B-NHL je založená na kombinácii parametrov identifikovaných histologickou a imunohistochemickou (IHC) analýzou, dostupných na väčšine pracovísk, prípadne aj genetickou analýzou, dostupnou v centrách. Pre CLL/SLL je podľa týchto princípov typický fenotyp CD5+/CD23+/cyklín D1- a pre MCL CD5+/CD23-/cyklín D1+. Uplatnenie týchto princípov v praxi neraz vyžaduje doplniť vyšetrenia problémových prípadov o genetickú analýzu. Materiál a metodika: Z registra sme vybrali prípady biopsií lymfatických uzlín (LU) pacientov s CD20+ malobunkovým B-NHL, ktoré si vyžadovali uvedenú DD. Všetky boli vyšetrené panelom histologických (na zhodnotenie spôsobu rastu a histocytologie infiltrátov) a IHC metód (CD20, CD3, CD5, CD23, ľahké reťazce c-Ig, Zap70, cyklín D1, príp. i.) a v prípade potreby aj FISH analýzou na dôkaz prestavby CCND1 génu.

Výsledky: Hodnotenie expresie cyklínu D1 v lymfoidných bunkách oboch nádorov umožnilo rozdeliť prípady do skupín s pozitivitou 0–5 % buniek a viac ako 50% buniek. V analyzovanom súbore je 22 biopsií LU pacientov s diagnózou CLL/SLL a 17 biopsií LU pacientov s diagnózou MCL. Všetky prípady MCL mali fenotyp CD5+ (okrem jedného) a cyklín D1+, expresia cyklínu D1 bola prítomná vždy vo viac ako 50% lymfoidných buniek. Vo všetkých prípadoch CLL bola zistená pozitívna expresia cyklínu D1, podiel pozitívnych buniek bol vždy najvyšší v rastových centrách a koreloval s morfológicko identifikovateľným podielom proliferujúcich buniek. V žiadnom z nich podiel cyklín D1+ buniek nepresiahol hodnotu 5% všetkých lymfoidných buniek, aj keď v prípadoch rastovo aktívnej CLL bol podiel pozitívnych buniek vnútri pseudofolikulu vyšší.

Diskusia a závery: Je zrejme, že diagnostika malobunkových B-NHL je multiparametrická a nespočívá v hodnotení jedného nálezu. Napriek tomu je zrejme, že expresia cyklínu D1 v časti buniek rastovo aktívnej CLL existuje a nemala by viesť k mylnej diagnóze MCL, a to ani v prípadoch s nedokonale zachovanou morfológiou, prípadne absenciou typických IHC znakov CLL, vrátane CD23 negatívnej CLL. Pri absencii dôkazu prestavby CCND1 génu FISH analýzou možno túto expresiu cyklínu D1 považovať za prejav pozitívity proteínu regulujúceho rast a proliferáciu buniek, najskôr posttranskripčného typu. Podakovanie: Práca bola podporená grantom VEGA SR, č.1/0378/12 a projektami MBRKM a Bio-Med Martin (ITMS kód 26220220113, resp. 26220220187) – sú riešené na JLF UK a spolufinancované z prostriedkov EÚ.

2636.

Mplus-Bezpečnosť a účinnosť udržiavacích liečby u pacientů s lymfomem z plášťové zóny léčených rituximabem (MabThera®) v podmínkách běžné praxe na základě dat získaných z databáze KLS – průběžná zpráva

Belada D., Schutzová M., Vokurka S., Pytlík R., Šimkovič M., Papajík T., Šálková J., Trněný M. (IV.interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové; FN, Plzeň; I.interní klinika, VFN, Praha; Hematoonkologická klinika, FN, Olomouc)

Charakteristika souboru: Od roku 2007 do konce roku 2012 bylo do programu Mplus nahlášeno 85 pacientů s lymfomem z plášťové zóny (MCL) léčených udržiavacím léčbou rituximabem (RM). Z těchto 85 pacientů bylo 69 (81%) léčeno pro MCL jako konsolidační léčba 1. linie, 16 (19%) léčeno RM v relapsu. Celkem 43 (51%) pacientů bylo léčeno v režimu s 3měsíčním intervalem infuzí, 38 (48%) s 2měsíčním a pouze u 4 pacientů byl zvolen jiný režim. Nejčastějším indukčním režimem před RM byl režim R-CHOP, a to u 35 pacientů (41%). Medián počtu podaných dávek rituximabu byl 8 (4–8). Před zahájením léčby bylo 52 pacientů v kompletní remisi (61%), ostatní v parciální remisi. Bezpečnost: Léčba byla dle dosud dostupných informací předčasně ukončena u 11 pacientů (13%), zejména z důvodu progresu (n=4), úmrtí (n=1), dále pak z důvodu odmítnutí nemocným (n=2), jiné příčiny (n=4). U 2 pacientů došlo k odložení infuze z důvodů nežádoucích účinků (NÚ) léčby (opakované infekce, protrahovaná leukopenie) a u žádného z pacientů ale nebyla léčba kvůli NÚ ukončena předčasně. Hematologická ani infekční

toxicita RM, ktorá neovlivnila průběh léčby (odklad infúze či předčasné ukončení léčby) nebyla sledována. Účinnost: Z 50 pacientů, u kterých jsou aktuálně známy údaje o dokončení léčby po 2 letech, jich je v současné době 32 (64%) bez známek dalšího progresu. Aktualizované výsledky celého souboru, včetně údajů o době do progresu a celkového přežití, budou prezentovány v rámci konference.

Závěr: Studie Mplus potvrzuje, že RM je i v podmínkách běžné praxe dobře snášena a prováděna minimem klinicky relevantních komplikací. Dosavadní výsledky léčby potvrzují přínos RM v běžné klinické praxi, který byl prokázán v randomizovaných studiích (např. MCL elderly).

Tato práce byla podpořena výzkumným záměrem MZ – RVO 00179906, programem PRVOUK P37/08, P27/LF1/1 a granty IGA NT12193/5/2011 a IGA NT13072/4/2012.

2620.

Significant survival improvement of the elderly patients and women with low/intermediate risk MIPI Mantle Cell lymphoma over the period of 14 years

Vočková P., Klener P., Pytlík R., Benešová K., Stříteský J., Velenská Z., Jakša R., Capmr V., Petrová M., Trněný M. (1. interní klinika-klinika hematologie, 1. LF UK a VFN, Praha; Ústav patologie, 1. LF UK a VFN, Praha; Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha)

Mantle cell lymphoma (MCL) is an aggressive type of B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL) with poor prognosis. In recent years the outcome of patients with MCL improved thanks to implementation of rituximab (R) and high-dose araC (HDAC) into induction regimen, consolidation with autologous stem cell transplant (ASCT), and R maintenance. We retrospectively analyzed 183 consecutive patients with MCL treated at the Charles University General Hospital since 1999 to 2012 (median follow-up 4.4 years). The whole cohort comprised 71% men and 29% women with median age of 66 years. Most patients had advanced-stage disease (stage IV= 80% patients) and adverse prognosis according to the mantle-cell lymphoma prognostic index (MIPI). Three most common types of induction therapy included R-CHOP (n=52), Nordic protocol (R-Maxi-CHOP and R-HDAC, 3+3 cycles, n=45) and R-COP (n=26). Overall response rate for all patients was 81.9% (CR= 57.9%). Median progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) was 2.84 and 6.27 years. Patients (pts) diagnosed in 2006–2012 (2006+) vs 1999–2005 (1999+) had significantly better PFS (median 2.04 vs 3.38 years, p= 0.0222) and trend toward better OS (median 7.2 vs. 4.3 years, p= 0.11). Curiously, age-stratified analysis revealed that only elderly patients (≥ 60 years) in 2006+ cohort had improved outcome compared to those in 1999+ cohort (median PFS 2.74 vs. 1.63 years, p= 0.0086, median OS 4.2 vs 2.3 years, p=0.0625). Younger patients in 2006+ compared to 1999+ cohort had similar PFS (median 5.52 vs. 5.51 years, p= 0.884) and OS (median undefined in both cohorts, p= 0.784). MIPI discriminated well into 3 subgroups of patients only in the whole cohort, while in the age-stratified analysis there remained only two relevant MIPI subgroups. In younger pts MIPI Intermediate (MIPI-I) merged with MIPI High (MIPI-H), while in the elderly pts MIPI-I merged with MIPI Low (MIPI-L). We observed trend toward better OS in the subcohorts of women with MIPI-L and MIPI-I compared to men (MIPI-L median undefined vs 8.48 years, p= 0.0692; MIPI-I median 10.51 vs 4.56 years, p= 0.0657). On the large single center cohort of unselected MCL patients we demonstrated significant outcome improvement of elderly patients during the last 7 years. We found that MIPI discriminated only two prognostic subgroups when used in age-defined cohorts of patients. Women with MIPI-I or MIPI-L appeared to have better outcome compared to men.

2531.

Autologní transplantace periferních kmenových buněk v 1. linii léčby zlepšuje dlouhodobé přežití u nemocných s MCL

Obr A., Procházka V., Papajik T., Faber E., Indrák K., Raida L. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Background: Intensive frontline therapy with autologous stem cell transplant (ASCT) in high risk patients with mantle cell lymphoma (MCL) is recommended approach in pts <65 years. Optimal induction therapy is still matter of a debate and data about long-term survival after ASCT are limited. Aim: A retrospective single-center analysis of intensive induction therapy consolidated by ASCT in MCL. Methods: We evaluated 33 patients (20 males, 13 females), median age at transplant 56 years (38–64) Ann Arbor stage IV in 30 and III in 3 pts. Nine pts (27%) were treated with ProMACE/CytaBOM

protocol (between 1997–1999), twenty-four (73%) with novel Sequential chemotherapy. All patients underwent ASCT after BEAM (median time from dg to ASCT was 8.1 months). Rituximab was added to frontline therapy in 22 pts (67%) and 7 (21%) pts received 2-year rituximab maintenance (MR).

Results: Complete response (CR) was achieved in 36% and 73% and partial response (PR) in 55% and 15% when analyzed after induction and on day +100 after ASCT, respectively. Only 3 patients (9%) failed to induction (2 achieved stable disease; one patient progressed), all of them achieved response after BEAM—those in SD shifted to CR, the patient with PD to PR. Four patients progressed (12%) on day +100 after ASCT, 2 of them from pretransplant CR and 2 from PR. After a median follow-up of 81.3 months (6.8 years), 20 pts (60.6%) are still alive and 18 (54.5%) are alive and progression-free. Five-year PFS achieved 53.3% (95% CI 0.35–0.71) and 5-year OS was 70.7% (95% CI 0.54–0.87). Five-year PFS in patients who achieved CR after ASCT was 65.6% compared to 22.2% in those in nonCR status (P=0.002). This was translated to superior 5-year OS in CR versus nonCR (86% and 33%, respectively, P=0.0001). When analyzing addition of rituximab(R) to induction therapy, lower proportion of deaths (32%) in R-group was observed compared to 54.5% in the non-R-group (P=NS). MR application was associated with trend to superior survival: only 1 patient died in the MR group (14.3%) compared to 12 deaths in the MR-free group (46.2%, P=0.08).

Conclusion: Intensive chemoimmunotherapy followed by ASCT improves therapeutic response and leads to long term disease control in MCL. CR on day +100 after ASCT along with MR therapy lead to better survival.

Acknowledgement: IGA-LF-2014-001 and IGA MZ ČR NT13072.

2568.

Difúzny veľkobunkový lymfóm B-pôvodu: imunohistochemická expresia bcl2 a bcl6 proteínov versus prestavba génov BCL2 a BCL6

Farkašová A., Plank L., Balhárek T., Barthová M., Janáková L., Szépe P., Kviatková Z., Mičák J. (Ústav patologickej anatómie, JLF UK a UN, Martin – SVK; Martinské bioptické centrum, s.r.o., Martin – SVK)

Úvod: Difúzny veľkobunkový B-lymfóm, bližšie neurčený (ďalej len DLBCL, NOS) predstavuje „množinu“ morfológicky a biologicky rozdielnych nádorov. Analýza profilu jeho génovej expresie umožnila identifikovať tzv. GCB verus prognosticky agresívnejší ABC typ. Analogicky možno imunohistochemickým (IHC) algoritmom stratifikovať DLBCL na GCB verus non-GCB typ. Materiál a metodika: Analýza biopsií DLBCL histologickými, IHC (dôkaz CD10, bcl6, bcl2, CD138, MUM1, s použitím algoritmu podľa Hansovej) a genetickými metódami (FISH na dôkaz prestavby BCL2 a BCL6 génov) a porovnanie výsledkov expresie bcl2 a bcl6 proteínov s prestavbou BCL2 a BCL6 génov. Pre všetky hodnotenia IHC aj FISH analýz boli použité tzv. cut-off hranice pozitívnosti v súlade s medzinárodnou akceptovanými princípmi.

Výsledky: V skupine 43 prípadov GCB typu sme zistili IHC expresiu bcl2 proteínu v 24 (55,8%) a FISH analýzou dokázali prestavbu BCL2 génu v 10 (23,3%) z nich. IHC pozitívnosť bcl6 proteínu bola prítomná v 35 (78%) a prestavba BCL6 génu v 6 (13%) prípadoch. V skupine 34 biopsií non-GCB typu bola pozitívna expresia bcl2 proteínu prítomná v 22 (64,7%) prípadoch, a to vždy bez dôkazu prestavby BCL2 génu. Pozitívna IHC expresia bcl6 proteínu bola prítomná v 15 (43%) a prestavba BCL6 génu v 8 (23,5%) prípadoch. V malej časti prípadov oboch typov chýbala proteínová expresia pri dokázanej prestavbe príslušného génu. 5 z 83 prípadov súboru (6%) nebolo možné IHC analýzou zaradiť do GCB, či non-GCB typu.

Diskusia a závery: IHC stratifikácia pacientov s DLBCL v protiklade ku genetickej nie je dokonalá, napriek tomu sa v klinickej praxi používa. Výsledky poukazujú na zložitosti vzťahu až „rozpor“ medzi géno- a proteínovou expresiou, keď expresia proteínov nesúvisí vždy s prestavbou príslušných génov a je dôsledkom iných mechanizmov. Pozitívnosť bcl2 proteínu v GCB type, spájaná so „zmazaním“ rozdielov prognózy medzi GCB a non-GCB typom, je tak len v časti prípadov spôsobená prestavbou BCL2 génu. Tieto údaje môžu prispieť aj k chápaniu ďalších vysokoagresívnych lymfómov s dvojitými a trojitými genetickými zmenami (tzv. „double-“, a „triple-hit“ prípady), ku ktorým niektorí recentne priradujú aj prípady DLBCL s IHC verifikovanou kombináciou expresie proteínov, ako sú myc, bcl2 a bcl6 proteín.

Podakovanie: Práca bola podporená grantom VEGA SR, č.1/0378/12 a projektami MBRKM a Bio-Med Martin (ITMS kód 26220220113, resp. 26220220187) – sú riešené na JLF UK a spolufinancované z prostriedkov EÚ.

2606.

Léčba difuzního velkobuněčného B-lymfomu (DLBCL) chemoterapií s rituximabem nemá lepší efekt u starších žen oproti mužům

Sedlák F., Pytlík R., Benešová K., Střítešský J., Dlouhá J., Procházka B., Trněný M. (1. interní klinika, VFN, Praha; Ústav patologie, VFN, Praha; Datacentrum při 1. interní klinice, VFN, Praha; Oddělení biostatistiky, Státní zdravotní ústav, Praha)

Zavedení rituximabu do léčby DLBCL značně zlepšilo prognózu pacientů, přesto doposud nejlepším a nejvíce užívaným prognostickým systémem je tzv. IPI, objevené v období před rituximabem. Některé nedávné publikace ovšem naznačují, že je-li rituximab součástí indukční (Pfreundschuch 2013) nebo udržovací (Jaeger 2013, Gisselbrecht 2012) chemoterapie, tak by se prognóza žen a mužů mohla lišit. Jedním z vysvětlení tohoto jevu by mohlo být rozdílné vylučování rituximabu u starších žen oproti ostatním populačním skupinám (Muller 2012). Cílem této práce je zhodnotit efekt IPI, pohlaví, „bulky“ postižení a BMI na neselektované populaci pacientů léčených kombinací antracyklinové chemoterapie s rituximabem. Neselektovaná skupina 611 pacientů s DLBCL léčená terapií typu R-CHOP v období 2001–2012 ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze byla podrobena retrospektivní studii. Testovanými parametry byly: IPI (včetně složek), pohlaví, „bulky“ postižení (tj. ložisko > 7,5 cm) a BMI. Jednotlivé faktory byly analyzovány jak univariálně pomocí Kaplan-Meirovy metody, tak souhrnně pomocí Coxova regresního modelu. Charakteristika skupiny: medián věku 60 let, 51,6 % mužů 48,4 % žen, IPI podskupiny: nízké IPI (tj. skóre 0–2) 48,8 %, vysoké IPI (tj. skóre 3–5) 46,6 %, u 4,6 % IPI nebylo dohledáno. Nejčastější podanou terapií byl režim R-CHOP (77,1 % případů). Při mediánu sledování 4,5 roku nebylo dosaženo mediánu přežití bez progresu (PFS) ani mediánu celkového přežití (OS). 5ti leté PFS, OS bylo 67,0 % ± 2,1 %, 72,6 % ± 2,0 %, resp. Ze studovaných parametrů pouze IPI a „bulky“ statisticky signifikantně ovlivňovaly prognózu celého souboru, zatímco pohlaví a BMI nikoli. V případě oddělené analýzy mladších a starších pacientů (hranice 60 let), pouze u mladých zůstaly IPI a „bulky“ nezávislými parametry, kdežto u starších jím zůstalo pouze IPI. V případě vlivu pohlaví u starší populace (>60 let) v podskupinách s nízkým a vysokým IPI, bylo překvapivě zjištěno, že muži ve skupině s nízkým IPI měli medián PFS delší (nedosažen) oproti ženám (6,2 roku)- $p=0,0347$, na rozdíl od skupin s vysokým IPI. U BMI nebyl nalezen žádný monotónní vztah mezi BMI a prognózou, ale pro definitivní zhodnocení bude tento parametr dále studován. Na rozsáhlé skupině pacientů s DLBCL jsme nebyli schopni potvrdit, že starší ženy mají oproti mužům lepší prognózu. Na základě těchto dat nejsme přesvědčeni, že v klinické praxi je nutno upravovat dávkování rituximabu dle pohlaví. Tato práce byla podpořena PRVOUK 27.

AKUTNÍ LEUKÉMIE

2572.

APL – Súbore pacientov liečených na KHaT SZU, LFUK a UNB v rokoch 1992–2013

Horváthová D., Mistrik M., Sopko L., Bátorová A. (Klinika hematológie a transfúziológie, SZU, LFUK a UNB, Bratislava – SVK)

Úvod: Akútna promyelocytová leukémia (APL) je bez liečby najhrozivejšou formou AML s mediánom prežívania 1 mesiac. Súčasná liečba all trans retinovou kyselinou (ATRA) v kombinácii s CHT vedie k dosiahnutiu kompletnej remisie (CR) v 80–95% prípadov. Pri 3-stupňovom režime (indukcia, konsolidácia, udržiavacia liečba) sa celkové prežívanie po 2 a 10 rokoch odhaduje na 69–88% a 58–85%. SÚBOR: V rokoch 1992–2013 sme na KHaT liečili spolu 54 pacientov s APL s vekovým priemerom 42 rokov (21–71r.). Iniciaľne malo 86% pacientov krvácanie, a 66% pacientov DIC. Do skupiny s vysokým rizikom a hyperleukocytózou sme zaradili 23% chorých. V 90-tych rokoch bola all trans retinová kyselina ťažko dostupná a liečba bola možná iba vrámci štúdie. V našom súbore dostalo ATRU v indukcii 96% pacientov, 77% v kombinácii s antracyklínom. Väčšina pacientov (69%) bola liečená podľa protokolov španielskej skupiny PETHEMA.

Výsledky: Diferenciačný syndróm sme pozorovali v 34% prípadov. Kompletnú remisiu sme dosiahli u 96% jedincov, medián času do remisie bol 40 dní, 23% pacientov zrelabovalo do 4 rokov, medián času do relapsu bol 21 mesiacov (4–46m). Dvaja pacienti zomreli do troch dní na CNS krvácanie

(3,7%). Celkovo k dnešnému dňu prežíva 85% pacientov, zomreli siedmi (4x relaps, 2x CNS krvácanie, 1x iná malignita). Ďalej sme podľa spôsobu liečby porovnávali 17 a 37 jedincov liečených v rokoch 1992–2000 a 2000–2013. Prvá skupina dostala v indukcii ATR-u samotnú (n=10) alebo v kombinácii s CHT (n=7), v konsolidácii režim DA, HAM, POMP resp. nízke dávky mitoxatronu. Od roku 2000 sme začali s 3-stupňovou liečbou protokolom AIDA, neskôr LPA 96, 99, 2005. V obidvoch skupinách dosiahli pacienti CR vo vysokom percente (88% a 100%), liečba v prvej skupine zlyhala v 2 prípadoch pre krvácanie do CNS. Medián času sledovania v prvej a druhej skupine bol 11 a 9,6 rokov s celkovým prežívaním po 2 rokoch 80% a 100%. V prvej skupine do 2 rokov zrelabovalo 62% jedincov, druhá skupina bola bez relapsu. Po 4 rokoch od liečby dochádza k výraznému poklesu celkového prežitia v prvej skupine na 45% (5/11) a vzostupu incidencie relapsu na 82% (9/11). V druhej skupine bolo celkové prežívanie 96% (25/26) a incidencie relapsu 7,7% (2/26).

Záver a Výsledky: dosiahnuté u našich pacientov liečených ATROU v kombinácii s vysokou kumulatívnou dávkou antracyklínov a udržiavacou liečbou podľa protokolu PETHEMA sú porovnateľné s údajmi v literatúre a podporujú jeho použitie v liečbe pacientov s APL.

2571.

Akutní promyelocytární leukemie v éře cílené léčby – 20 let zkušeností Hemato-onkologické kliniky v Olomouci

Szotkowski T., Faber E., Vrbková J., Hubáček J., Raida L., Rohoň P., Kuba A., Pikalová Z., Holzerová M., Divoká M., Jarošová M., Papajík T., Indrák K. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP, Olomouc)

Akutní promyelocytární leukemie je unikátní jednotkou mezi akutními leukemiemi (AL). Zařazení all trans-retinové kyseliny (ATRA) a následně oxidu arsenitého do léčby zásadně zlepšilo dosažené výsledky u tohoto dříve často fatálně končícího onemocnění. Na našem pracovišti bylo v letech 1993–2013 diagnostikováno a léčeno celkem 60 nemocných s akutní promyelocytární leukemií, s mediánem věku 43 (19–73) let. Hlavní součástí léčby všech pacientů byla ATRA v kombinaci s chemoterapií. Padesát čtyř pacientů (90%) dosáhlo kompletní remise onemocnění, dlouhodobě přežívá 48 (80%) nemocných. Zaznamenali jsme 6 časných úmrtí (10%) – během indukční léčby, 5 relapsů onemocnění (9,3%), u všech bylo dosaženo druhé kompletní remise. Významným faktorem ovlivňujícím pravděpodobnost dosažení remise i celkové přežití byla kategorie rizika podle Sanze. Prezentovány budou podrobné výsledky analýzy neselektovaného souboru nemocných. Dlouhodobě přežívání 89% nemocných z těch, kteří dosáhli kompletní remise, dokazuje jedinečné postavení této specifické podjednotky mezi akutními leukemiemi, dané objevy na poli cílené léčby. Ostatní subtypy AL, s výjimkou ALL u dětí, na podobné objevy zatím čekají.

Podpořeno grantem LF-2014-001.

2645.

Hodnocení sérových koncentrací vybraných cytokinů pomocí biočipové technologie u pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií

Horáček J. M., Kupsa T., Křešová I., Jebavý L., Žák P. (Katedra válečného vnitřního lékařství, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové; Ústav klinické biochemie a diagnostiky, FN, Hradec Králové; 4. interní hematologická klinika, FN a LF UK, Hradec Králové)

Úvod: Cytokiny jsou studovány jako markery aktivace imunitního systému u různých chorob včetně hematologických malignit. Informace získané z těchto studií mohou zlepšit diagnostiku a léčbu hematologických malignit, protože cytokiny nebo jejich receptory mohou představovat cíle pro specifickou protinádorovou léčbu na molekulární úrovni. Cílem naší studie bylo hodnocení sérových koncentrací vybraných cytokinů u pacientů s nově dg. akutní lymfoblastickou leukemií (ALL) a u zdravých jedinců pomocí biočipové technologie. Tento přístup umožňuje simultánní měření více cytokinů z jednoho vzorku. Metodika: Do studie bylo zařazeno 21 pacientů před zahájením léčby na 4. INT FN HK pro nově dg. ALL (medián věku 46, rozptyl 24 – 75 let, 17 mužů a 4 ženy, 20 B-ALL a 1 T-ALL) a 15 zdravých dárců krve (medián věku 41, rozptyl 25 – 58 let, 11 mužů a 4 ženy). Hodnotili jsme sérové koncentrace následujících cytokinů: interleukin-5 (IL-5), interleukin-15 (IL-15), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha), soluble IL-2 receptor alpha (sIL-2R alpha), soluble IL-6 receptor (sIL-6R), soluble

tumour necrosis factor receptor I (sTNFR-I), soluble tumour necrosis factor receptor II (sTNFR-II), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). Všechny biomarkery byly měřeny biočipovou technologií na principu enzymoimunoanalýzy s chemiluminiscenční detekcí na analyzátoru Evidence Investigator (Randox). Hodnoty $p < 0,01$ byly považovány za statisticky významné.

Výsledky: U pacientů s nově dg. ALL jsme při srovnání se zdravými jedinci zjistili významné zvýšení sérové koncentrace IL-15 ($1,74 \pm 0,97$ ng/l vs. $0,81 \pm 0,16$ ng/l; $p = 0,0008$), MIP-1 alpha ($6,36 \pm 3,26$ ng/l vs. $2,68 \pm 1,47$ ng/l; $p = 0,0003$), sIL-6R ($2,29 \pm 1,80$ mcg/l vs. $0,89 \pm 0,39$ mcg/l; $p = 0,006$), sTNFR-I ($0,96 \pm 0,50$ mcg/l vs. $0,25 \pm 0,07$ mcg/l; $p = 0,000005$) a sTNFR-II ($0,73 \pm 0,51$ mcg/l vs. $0,29 \pm 0,14$ mcg/l; $p = 0,003$). Koncentrace ostatních hodnocených biomarkerů se statisticky významně nelišily.

Závěr: Naše výsledky naznačují, že sérové koncentrace některých cytokinů (IL-15, MIP-1 alpha, sIL-6R, sTNFR-I, sTNFR-II) jsou významně alterované u pacientů s nově dg. ALL a mohou mít vztah k aktivitě onemocnění. Další studie na větším počtu pacientů a srovnání se zavedenými prognostickými faktory budou nezbytné k posouzení, zda změny pozorované v koncentracích těchto molekul mohou být použity jako prognostický ukazatel u ALL.

Práce byla podpořena z projektu RO 1011 (FVZ).

2607.

Riziková stratifikace dětských akutních lymfoblastických leukémií na základě profilování přestavb imunoglobulinových genů pomocí sekvenování nové generace

Kotrová M., Mužíková K., Mejstříková E., Nováková M., Fišer K., Stuchlý J., Starý J., Trka J., Froňková E. (CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha)

Negativní minimální reziduální nemoc (MRN) ve dnech 33 a 78 je na protokolech skupiny BFM podmínkou pro zařazení do skupiny standardního rizika (SR). Detekce MRN byla standardizována s použitím kvantitativní PCR (qPCR) na přestavby genů pro imunoglobuliny (Ig) a T-buněčné receptory (TCR). Rychle se rozvíjející sekvenování nové generace (NGS) repertoáru Ig/TCR umožňuje sledování maligního klonu spolu s celým spektrem lymfocytů. Navíc nevyžaduje optimalizaci klonálně-specifického systému, což značně snižuje náklady a časovou náročnost. Cílem práce bylo zavést detekci přestavb IGH na přístrojích Ion Torrent PGM/Ion Proton a porovnat výsledky MRN s qPCR. Knihovny pro sekvenaci byly připraveny z DNA z kostní dřevě za použití primerů IGH FR3 (BIOMED-2). Pro vyhodnocení MRN jsme použili vlastní bioinformatický algoritmus. Celkem jsme vyšetřili 56 vzorků (28 x den 33, 28 x den 78) od 28 pacientů léčených dle protokolu Interim BFM 2007 s mediánem pokrytí 428,648 přečtení na vzorek. Třicet šest vzorků (64%) bylo oběma metodami shodně negativních. Pět vzorků (9%) bylo negativních dle NGS a pozitivních dle qPCR, naopak čtyři vzorky (7%) byly negativní dle qPCR a pozitivní dle NGS. Tyto rozdíly by způsobily přeřazení čtyř pacientů ze skupiny středního rizika (IR) do SR, 2 pacientů ze SR do IR a jednoho pacienta ze skupiny s pomalou odpovědí na léčbu (SER) do IR. U 11 vzorků pozitivních oběma metodami spolu hodnoty MRD korelovaly, ale hladiny MRN byly vyšší u NGS než u qPCR ve všech vzorcích kromě jednoho (medián 7x, rozptyl 1–124x). To je zřejmě způsobeno skutečností, že NGS kvantifikuje leukemické IGH přestavby pouze mezi B lymfocyty, zatímco qPCR pracuje se všemi mononukleárními buňkami. Důležité je, že kvantitativní rozdíly neměly vliv na zařazení do rizikových skupin. Po korekci na procento CD19pos buněk získané průtokovou cytometrií se korelace zlepšila ($R^2=0,77$). Senzitivita NGS byla srovnatelná s qPCR, s většinou rozdíly v "šedé zóně" slabě pozitivních vzorků. U 7/28 pacientů (25%) tak došlo k přesunu mezi rizikovými skupinami, ve většině případů z IR do SR. NGS má velký potenciál nahradit v klinickém rozhodování qPCR. Hlavním problémem NGS zůstává nedostatečná standardizace experimentálních podmínek a analýzy dat. Na ní pracuje nově založená skupina EuroClonality NGS, která má za cíl standardizovat celý proces nejen pro kvantifikaci MRN, ale také pro stanovení klonality u lymfoidních neoplázií a analýzy repertoáru.

Podpořeno grantem IGA NT14343.

2626.

Stanovení minimální reziduální nemoci s využitím mutací v genu CEBPA u pacientů s AML pomocí DNA sekvenování nové generace

Žejšková L., Plachý R., Sedláčková L., Mazal O., Zavřelová A., Žák P., Petečuková V., Novák J., Kozák T., Peková S. (Synlab Genetics s.r.o., Laboratoř molekulární diagnostiky, Praha; IV. interní hematologická klinika, FN a LF UK, Hradec Králové; Interní hematologická klinika, FNKV, Praha)

Úvod: Gen CEBPA kóduje transkripční faktor (CCAAT/enhancer binding protein, alpha), který hraje důležitou roli v granulopoéze. Mutace v tomto genu lze detekovat přibližně u 5 – 10 % pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) a lze je využít jako molekulární marker pro sledování minimální reziduální nemoci (MRN). CEBPA je gen s oblastmi s velmi vysokým zastoupením GC bází a příprava pacient-specifické esej s využitím real-time PCR nedosahuje v řadě případů dostatečné senzitivity detekce MRN při specifitě reakce. V této práci bychom chtěli ukázat naše zkušenosti s kvantifikací mutací v genu CEBPA pomocí DNA sekvenování nové generace.

Metody: Od roku 2010 jsme vyšetřili celkem 344 pacientů s AML na přítomnost mutací v genu CEBPA. Primární vyšetření bylo provedeno v záchytu onemocnění pomocí Sangerova sekvenování. V případě nálezu mutace v genu CEBPA byla připravena pacient-specifická esej s využitím real-time PCR. U tří pacientů, u kterých MRN esej pomocí real-time PCR nedosahovala dostatečné senzitivity při specifitě reakce, jsme v období od 1/2013 do 1/2014 provedli kvantitativní stanovení mutací v genu CEBPA pomocí ultrahlubokého sekvenování ampliconů s využitím přístroje GS Junior System. Jednalo se celkem o 24 náběrů z kostní dřevě a 2 vzorky periferní krve. Sledované mutace genu CEBPA byly inzerčního a delečního charakteru. Jednalo se o jediné potenciální molekulární markery po standardním vyšetření fúzních transkriptů a mutací v prognosticky významných genech. Výsledek byl vyhodnocen jako procentuální zastoupení mutace v genu CEBPA (počet čtení s mutací/celkový počet čtení). Pro validní analýzu s dostatečnou senzitivitou detekce MRN byla stanovena minimální hranice počtu čtení v množství 20 000 čtení/vzorek.

Výsledky: MRN pomocí DNA sekvenování nové generace byla sledována u 3 pacientů s mutací CEBPA, celkem jsme vyšetřili 26 náběrů. Průměrný počet čtení/vzorek byl 64 455, medián 59 209. Senzitivita analýzy dosáhla 4–5 řádů. Dynamika počtu reziduálních buněk korelovala s klinickým průběhem onemocnění. U všech pacientů došlo k relapsu onemocnění a přítomnost mutace byla potvrzena také Sangerovým sekvenováním.

Závěr: Kvantifikace mutací v genu CEBPA pomocí DNA sekvenování nové generace nám umožnila sledování MRN u pacientů, u kterých se velmi obtížně optimalizovala dostatečně senzitivní pacient-specifická esej pomocí real-time PCR. Mutace v genu CEBPA jsou tedy již dostupným senzitivním molekulárním markerem u pacientů s AML.

2624.

Mapování chromozomového zlomu zahrnutého do unikátní translokace t(3;10)(q26;q21) u pacienta s akutní myeloidní leukémií

Jančusková T., Plachý R., Štíka J., Žejšková L., Hardekopf D., Praulich I., Kreuzer K.-A., Kosyakova N., Liehr T., Peková S. (Synlab Genetics s.r.o., Laboratoř molekulární diagnostiky, Praha – CZE; Department I of Internal Medicine, University at Cologne, Cologne – DEU; Institute of Human Genetics, Jena University Hospital, Jena – DEU)

Background: Recently, we introduced a flexible strategy for mapping cytogenetically identified unique abnormalities down to the single nucleotide level. This strategy has enabled us to design clone-specific assays for sensitive minimal residual disease (MRD) monitoring in acute leukemia patients as well as to elucidate regions/genes involved in congenital chromosomal aberrations. Here we characterize the rare chromosomal translocation t(3;10)(q26;q21), involving the MECOM gene (MDS and EVI1 complex locus located in band 3q26), identified in an acute myeloid leukemia (AML) patient. **Aims:** Our aim was to use our strategy to identify the fusion partner on chromosome 10q21 and to characterize the precise nucleotide sequence of the chromosomal breakpoint. **Methods:** The chromosomal translocation was revealed by standard cytogenetic techniques (G-banding, mFISH), and involvement of the MECOM gene was confirmed by FISH with the use of a commercially available probe set. The derivative chromosome 10 was isolated using fine-needle microdissection followed by whole genome amplification (WGA). Ten dissected fragments were sequenced on the GS-Junior or next-generation sequencing platform. The reads obtained were aligned to reference sequences of chromosomes 3 and 10 using in-house developed software. The last mapped reads from both chromosomes were used as docking sites for primers for long-range PCR to amplify the putative breakpoint. The long-range PCR products were directly sequenced using Sanger sequencing to reveal the precise nucleotide sequence of the breakpoint.

Results: Using a combination of cytogenetic and molecular approaches, we mapped the t(3;10)(q26;q21) to the single nucleotide level, revealing a fusion of the MECOM gene (3q26.2) and C10orf107 (10q21.2).

Summary/conclusions: In AML patients, the MECOM gene can be rearranged with a variety of other partner chromosomes and partner genes. According to the Mitelman database, only one case with a t(3;10)(q26;q21) translocation has been reported, but neither the fusion partner of the MECOM gene nor DNA sequence were identified. The approach described here opens up new possibilities in characterizing acquired as well as congenital chromosomal aberrations. In addition, DNA sequences of chromosomal breakpoints may be a useful tool for unique molecular MRD target identification in acute leukemia patients.

CLL

2579.

Anémie u chronické lymfocytární leukémie: diagnostická a léčebná úskalí

Smolej L. (IV. interní hematologická klinika, FN a LF UK, Hradec Králové)

Anémie je poměrně častým nálezem u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií (CLL). Nejčastější příčinou jsou masivní infiltrace kostní dřeně CLL lymfocyty a autoimunitní hemolytická anémie (AIHA). Je však třeba také pomýšlet na další, méně časté příčiny anémie, jako nedostatek železa, vitamínu B12 či kyseliny listové, anémii chronických onemocnění (např. parainfekční či při nádorové duplicitě), dysplázii po předchozí chemoterapii, čistou aplázií červené řady (PRCA) a další. U některých nemocných navíc může dojít ke kombinaci dvou i více příčin anémie. Správné rozpoznání příčiny anémie je nezbytným předpokladem k volbě optimálního léčebného postupu. V diferenciální diagnostice anémie u CLL jsou kromě základních hodnot krevního obrazu (střední objem erytrocytů, střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu, šíře distribuce erytrocytů, počet retikulocytů a schistocytů) velmi užitečné také biochemické ukazatele (sérová laktátdehydrogenáza, bilirubin, haptoglobin, renální funkce, C-reaktivní protein, ferritin, foláty, vitamin B12), přímý antiglobulinový test, sérologická vyšetření a samozřejmě aspirát ± biopsie kostní dřeně s cytologickým, imunofenotypizačním a histologickým vyšetřením. Zásadní praktický význam má odlišení anémie při progresi CLL od ostatních příčin, neboť se zásadně liší další léčebný postup: anémie při infiltraci dřeně CLL je indikací k zahájení cytoredukční léčby, kdežto AIHA bez dalších známek progresu je indikací k imunosupresivní léčbě kortikosteroidy; anémie při deficitu železa/ B12/folátů je indikována k substituci apod. V některých případech může být díky kvalitní diagnostice anémie nemocný ušetřen zbytečného podání chemo(imuno)terapie. Součástí prezentace budou příklady typických i atypických příčin anémie u nemocných s CLL z klinické praxe. Podpořeno grantem IGA MZ ČR NT/13412-4, programem PRVOUK P37/08 a RVO MZ ČR (FNHK, 00179906).

2641.

Biologické a klinické charakteristiky pacientů s přítomností subgenu IGHV3-21

Urbanová R., Papajík T., Poczatková H., Humplíková L., Holzerová M., Krůžová L., Jarošová M., Indrák K., Vrbková J. (Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc; Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP, Olomouc)

Úvod: Ve studiu chronické lymfocytární leukémie (CLL) je velká pozornost věnována stereotypním receptorům. Repertoár povrchových imunoglobulinů je u CLL je omezen, stereotypní receptory představují asi 30%, nejčastější je podmnožina, subset #2. Byla prokázána asociace mezi molekulárními změnami a stereotypními receptory se vztahem k prognóze onemocnění. Stereotypní receptory jsou spojovány s vyšším rizikem Richterovy transformace. Za prognosticky nepříznivou podskupinu se považují pacienti s IGHV3-21, kteří byt s mutovaným stavem IGHV, mají stejnou prognózu jako pacienti se stavem nemutovaným. U části pacientů se subgenem IGHV3-21 je přítomen stereotypní receptor skandinávského typu, definovaný přítomností stereotypní krátké CDR3 (tj 9 AMK), JH6 a VL3-21 (VLambda2-14).

Pacienti a metody: Analyzovali jsme soubor 29 pacientů s IGHV3-21, kteří byli diagnostikováni na HOK FN Olomouc v letech 2000–2011, tvořili 7% z celkového počtu 417 nově diagnostikovaných pacientů v tomto období. Cílem práce bylo analyzovat prognostický význam tohoto subgenu ve vztahu k celkovému přežití. Medián věku pacientů byl 62,8 let, poměr mužů a žen 16/13. Celkem

19 pacientů (73%) bylo diagnostikováno ve stádiu Binet B a C, mutační stav IGHV byl lehce ve prospěch mutovaného stavu, celkem u 55% pacientů (vs 42% v celém souboru pacientů). Delece 11q byla zjištěna u 6 pacientů a delece 17p u 3 pacientů. Léčbu vyžadovalo celkem 26 pacientů, medián sledování byl 58 měsíců, celkem 14 pacientů zemřelo.

Výsledky: Celkové přežití pacientů souboru bylo stejné bez ohledu na mutační stav ($p < 0,597$), horší bylo přežití pacientů ve věku nad 65 let ($p < 0,001$), s počtem lymfocytů $> 50 \times 10^9/l$ a delecí 17p ($p > 0,05$), delece 11q neměla prognostický význam na přežití. V multivariační analýze 205 pacientů u ve stádiu Binet A byl kromě věku ($p < 0,001$) a nemutovaného stavu IGHV ($p < 0,04$) jako významný prognostický faktor zjištěn IGHV3-21 ($p < 0,019$). Dále byli pacienti IGHV3-21 porovnáváni s ostatními prognosticky nepříznivými podskupinami pacientů celého souboru (pacienti s nemutovaným stavem IGHV, s delecí 11q, 17p a s IGHV1-69). Práce přináší podrobnou analýzu cytogenetických a FISH nálezů. Byla analyzována podskupina pacientů se stereotypním receptorem skandinávského typu, nebyl prokázán rozdíl v celkovém přežití oproti pacientům IGHV3-21 bez skandinávského receptoru ($p < 0,938$). Výskyt Richterova syndromu (histologicky verifikovaného) byl 4 z 29 pacientů, 14% celého souboru IGHV3-21, Dva z nich měli stereotypní skandinávský receptor. U dalších 2 pacientů nebylo možno Richterovu transformaci vyloučit.

2560.

Cílené arrayCGH vyšetření delece 6q u nemocných s chronickou lymfocytární leukémií

Jarošová M., Hrubá M., Oltová A., Kriegová E., Urbánková H., Krůžová L., Procházková V., Holzerová M., Urbanová R., Papajík T., Doubek M., Vozobulová V., Indrák K. (Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc; Ústav lékařské genetiky FN, Plzeň; Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; Ústav imunologie FN a LF UP Olomouc; Hemato-onkologické oddělení, FN, Plzeň)

Určení cytogenetických změn, delece chromosomů 13q, 11q, 17p, trisomií chromosomu 12, translokace 14q32, komplexní karyotyp a určení mutací genů TP53, SF3B1, NOTCH1 a BIRC3 zlepšuje prognostickou stratifikaci nemocných s chronickou lymfocytární leukémií (CLL). K často se opakující cytogenetické změně u CLL patří delece dlouhých ramen chromosomu 6 (6q-). Vyskytuje se u 3–6% nemocných a její prognostický význam je stále kontroverzní, stejně jako minimálně deletovaná oblast a kandidátní geny v ní lokalizované. Cílem práce bylo provést cílenou arrayCGH analýzu skupiny CLL nemocných s delecí 6q, určit minimálně deletovanou oblast (MDR) a kandidátní geny v ní lokalizované, pokusit se určit relativní expresi vybraných genů a vyhodnotit některé klinické charakteristiky. Cytogenetické a FISH vyšetření periferní krve nebo kostní dřeně u 1055 CLL nemocných bylo provedeno ve třech cytogenetických centrech ČR (Olomouc, Plzeň a Brno). Delece 6q byla nalezena u 70(6.6%) nemocných. Metoda arrayCGH s chromosomově specifickými nebo oligonukleotidovými čipy byla provedena u 52 nemocných (36 M/16 Ž; medián věku 61 let, stádium Binet: A (n=19), B (n=18), (n=15); 25 nemocných v době diagnózy, 27 v průběhu onemocnění; 29 neléčených a 23 léčených; nemutovaný stav IGHV 41 nemocných). FOXO3, NF-kB, TBX21, IL-2 a BCL10 geny byly analyzovány metodou kvantitativní RT-PCR (delece 6q=17 nemocných, bez delece=30 a 19 zdravých kontrol). Delece 6q jako sólo aberace byla pozorována u 9(17%) nemocných, u 20(38.4%) byla součástí komplexního karyotypu. Metoda arrayCGH určila vysokou heterogenitu rozsahu delece, MDR o velikosti 1.4 Mb v pruhu 6q21. Metodou qRT-PCR byl určen nízký počet FOXO3 transkriptů nemocných s delecí 6q ve srovnání s nemocnými bez delece ($p = 0,03$) i ve srovnání se zdravými kontrolami ($p < 0,0001$). Vyšetření mRNA exprese genů NF-kB, TBX21, IL-2 a BCL10 ukázalo zvýšenou expresi NF-kB u nemocných s 6q- ve srovnání s nemocnými bez delece a zdravými kontrolami ($p = 0,03/p < 0,0001$). Delece 6q se častěji vyskytovala u mužů, nemocných s nemutovaným IGHV a pokročilejším stádiem onemocnění. Metodou arrayCGH jsme potvrdili heterogenitu rozsahu delece 6q, určili MDR o velikosti 1.4Mb zahrnující gen FOXO3. Určili jsme jeho sníženou mRNA expresi a zvýšenou expresi genu NF-kB. Delece byla častější u nemocných s nemutovaným IGHV a pokročilejším stádiem onemocnění.

Práce je podporována granty: IGA MZ ČR NT 13576 a IGA-LF-2014-001.

Molekulární prognostické markery chronické lymfocytární leukemie a význam sekvenování nové generace při studiu patogeneze onemocnění

Kantorová B., Navrkalová V., Tichý B., Malčíková J., Tom N., Pál K., Staňo-Kozubík K., Takáčová S., Plevová K., Trbušek M., Brychtová Y., Doubek M., Mayer J., Pospíšilová Š. (Středoevropský technologický institut (CEITEC), program Molekulární medicína, MU, Brno; Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno)

Stanovení prognózy chronické lymfocytární leukemie (CLL) a následné cílené léčby pacientů je značně komplikováno nejasnou etiopatogenezi a také variabilním klinickým průběhem onemocnění. Současné práce zabývající se studiem biologické podstaty CLL pomocí přístupů sekvenování nové generace (tzv. next generation sequencing; NGS) navíc poukázaly na značnou heterogenitu nádorové buněčné populace. Mezi obzvláště nepříznivé prognostické a prediktivní markery vyšetřované u CLL patří poškození ATM/p53 signální dráhy vedoucí k deregulaci kontroly buněčného cyklu a narušení stability genomu ovlivněných buněk. Inaktivace genů kódujících nádorové supresory p53 a/ nebo ATM (nejčastěji delece jedné a mutace druhé genové alely) je asociována zejména s krátkým celkovým přežíváním a rezistencí pacientů na standardně podávanou chemoinoterapii. Kromě poškození genů TP53 a ATM byly recentně u pacientů s CLL pomocí exomového sekvenování určeny další klinicky relevantní změny; mezi nejvýznamnější patří mutace genů NOTCH1, SF3B1 a BIRC3. Analýza uvedených aberací prokázala také jejich úlohu při klonálním vývoji CLL, kdy v důsledku snížené léčebné odpovědi dochází často u leukemických buněk nesoucích tyto změny k preferenční selekci. Časný záchyt genových mutací u dosud neléčených pacientů tak může významným způsobem napomoci k odlišení rizikových skupin nemocných vhodných pro zařazení do studií testujících nové terapeutické přístupy popřípadě profitujících z alogenní transplantace kmenových krevetvorných buněk. Na základě těchto poznatků byl recentně u CLL navržen klinicky potencionálně využitelný model zohledňující výsledky nejen cytogenetické, ale také mutační analýzy. Studie byla podpořena granty IGA-MZ-CR NT13519-4/2012, MUNI/A/0830/2013, projektem OP VK SuPReMME CZ.1.07/2.3.00/20.0045.

2609.

Rozdíly v sérových cytokinových profilech u indolentní a aktivní, relabující formy chronické lymfocytární leukemie

Schneiderová P., Procházka V., Tománková T., Papajík T., Jarošová M., Kriegová E. (Ústav imunologie, LF UP a FN, Olomouc; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) má velmi variabilní klinický průběh. U některých pacientů onemocnění rychle progreduje, zatímco u jiných se setkáváme s indolentní formou nevyžadující léčbu. Současné práce podporují teorii klíčové role mikroprostředí na progresi onemocnění. Studovali jsme proto proteinové profily v séru u skupin pacientů s indolentní, neléčenou a aktivní, relabovanou formou CLL. K vyšetření sérových hladin 92 proteinů jsme použili inovativní, vysoce citlivou metodu Proseek Multiplex (Olink) založenou na principu PEA (Proximity Extension Assay). Soubor tvořilo 24 pacientů (17 mužů/7 žen), z toho 12 pacientů s indolentní, neléčenou CLL a 12 pacientů s aktivní, relabující chorobou. Ke statistickému vyhodnocení dat jsme použili software GenEx (MultiD). V séru pacientů s aktivní, relabovanou formou CLL byly prokázány vyšší hladiny CXCL10 (C-X-C motif chemokine 10; fold change 2,46/p=0,004), TNF-R2 (Tumor necrosis factor receptor 2; 1,77/p=0,009), ADM (Adrenomedullin; 1,41/p=0,024), EPO (Erythropoietin; 2,35/p=0,034), Ep-CAM (Epithelial cell adhesion molecule; 1,42/p=0,039) a nižší hladiny EGF (Epidermal growth factor; -2,33/p=0,006), MIA (Melanoma-derived growth regulatory protein; -1,30/p=0,014), hK11 (Kallikrein-11; -1,31/p=0,014), HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor; -1,78/p=0,017), PDGF subunit B (Platelet-derived growth factor subunit B; -2,54/p=0,019), LAP TGF-beta-1 (Latency-associated peptide transforming growth factor beta 1; -1,32/p=0,020), CCL24 (C-C motif chemokine 24; -1,83/p=0,023), ErbB2/Her2 (Receptor tyrosine-protein kinase ErbB-2; -1,23/p=0,044), SCF (Stem cell factor; -1,33/p=0,047) ve srovnání s indolentní formou nevyžadující léčbu. Mnohorozměrná analýza (Principal Component Analysis) prokázala, že současná analýza 14-ti proteinů umožní rozdělit pacienty do skupin dle závažnosti onemocnění. Potenciální role jednotlivých deregulovaných proteinů bude diskutována. Sérové proteinové profily získané u pacientů s aktivní formou CLL se významně liší od sérových profilů u pacientů

s indolentní chorobou. Znalost mikroprostředí nejen významně přispěje k pochopení patogeneze CLL a mechanismů progresu onemocnění, ale umožní také identifikovat nové terapeutické cíle. Grantová podpora: IGA MZ ČR NT13576, IGA LF_2014_001, IGA LF_2014_020

VARIA

2551.

Klinik a laboratorna diagnostika

Lipšic T. (Hematologické a transfuziologické oddelenie ÚLM, Onkologický ústav sv. Alžbety, SZU, VŠZaSP, Bratislava – SVK)

V rámci na dôkazoch založenej medicíny (EBM) každý medicínsky odbor principiálne potrebuje laboratornú diagnostiku (LM). Jej základnou úlohou je presná, správna a včasná detekcia stavu orgánov, tkanív a buniek. Laboratorna diagnostika pozostáva z troch fáz – pre-analytickej, analytickej a post-analytickej. Celkový proces testovania (TTP) je vlastne “brain-to brain“ cyklus začínajúci otázkou klinika a indikáciou vyšetrenia až po konečnú interpretáciu výsledkov a rozhodnutie klinika. Pre-analytická fáza pozostáva z časti: extralaboratornej – indikácie vyšetrenia, jeho požadovania a prenosu požiadavky, prípravy pacienta, odberu a transportu vzorky, intralaboratornej – príjmu, kontroly žiadanky/vzorky, spracovania/skladovania pred analýzou Analytická fáza je výlučne intra-laboratorna: vlastná analýza vzorky, vrátane aplikácie systémov kontroly/zabezpečenia kvality Post-analytická fáza pozostáva z časti: intralaboratornej – systémovej kontroly, validácie a formátovania výsledkov, interpretácie alebo komentovania, reflexného testovania, uvoľnenia a prenosu výsledkov a skladovania testovanej vzorky, kontroly celkového času na vyšetrenie (TAT), extralaboratornej – interpretácie výsledkov klinikom, rozhodnutia na základe obdržaných výsledkov a dokumentácia výsledkov a rozhodnutí. Analýzy chybovosti v laboratornej diagnostike vykazujú následujúci podiel v jej jednotlivých fázach: Pre-analytická fáza – 75%, Analytická fáza – < 5%, Post-analytická fáza – 20%. Závažnosť pre- a post-analytickej fázy bola dlho známa, ale tieto fázy často neboli zahrnuté v Programoch riadenia kvality LM, ktoré boli zamerané skôr na analytickú kvalitu a príslušné aktivity, ktoré boli v ich priamej kontrole. Prevalencia chýb v pre- a post-analytickej fáze vedie k požiadavke prevzatia väčšej zodpovednosti za aktivity ktoré boli mimo bezprostrednej kontroly LM. Prvými úlohami sú dôsledná edukácia personálu o laboratornej diagnostike – menovite extra-laboratorneho, zlepšenie koordinácie zameranej na posilnenie úlohy laboratória v starostlivosti o pacienta v rámci zdravotníckeho zariadenia, výrazné zlepšenie všetkých častí pre- a post-analytickej fázy. Pokroky v technológii LM zabezpečujú len presnosť a špecifickosť, nie správnosť a efektivitu výsledkov vyšetrení. Chyby v pre- a post-analytickej fáze môžu viesť k nesprávnej/neskorej diagnóze a liečbe a vážne ohroziť zdravotnú starostlivosť o pacienta.

2509.

Morfometrické poznámky k jadérkum lymfocytů u nemocných s B CLL

Smetana K., Karban J., Klamová H., Mikulenková D., Jirásková I., Trněný M. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; I. int. klinika, VFN, Praha)

Spojení morfometrie a cytochemie vedlo v minulosti k získání komplementárních poznatků pro diagnostiku a pochopení různých klinických stavů, jakož i biologie a patologie krevních buněk. Lymfocyty neléčených i léčených nemocných s B CLL byly vizualizovány cytochemickými metodami pro průkaz DNA a RNA s následnou obrazovou digitalizací pro počítačové měření jaderek (průměru a denzity RNA). Pokles velikosti nukleolárních těl zralých lymfocytů byl nápadný bez ohledu na podávaná cytostatika (Leukeran, Fludara, Mabthera, Cyclophosphamide, Prednizon) v době odebrání vzorků. U neléčených byl průměr těla jaderek 1.40(0.10) a u léčených 0.90(0.04)um. Z toho „relativně vyšší průměr“ byl při léčení Leukeraniem -1.01(0.02) a nižší po léčení Fludarou -0.87(0.01um). U nezralých lymfocytů u léčených byl pokles průměru těla nukleolů jen malý, tj. u neléčených 2.57(0.33) a léčených 2.31(0.42)um. Morfometrie tedy ukázala, že ve zralých lymfocytech i „spící“ nukleoly reagují na podaná cytostatika bez ohledu na jejich působení. Redukovaná velikost nukleolů a snížená koncentrace RNA v cytoplasmě by odpovídala přechodu jednotlivých buněk z terminální

diferenciace do pre-apoptózy. Nedávné studie ukázaly spoluúčast jádérka na apoptóze. V nezralých lymfocytech, včetně lymfoblastů s malým poklesem velikosti jadérek docházelo po účinku cytostatik i ke změnám jejich struktury, které rovněž svědčily pro snížení nukleolární biosyntetické aktivity. Některé z těchto změn jsou však reverzibilní, jak ukázaly pokusy na jiných buňkách, včetně T lymfocytů. Studie byla částečně podporována Min.Zdrav.ČR.

2659.

Úloha parenterálních přípravků železa v léčbě anémie

Čermák J. (ÚHKT, Praha)

Převážná většina mikrocytárních hypochromiích anemií vzniká jako důsledek absolutního nedostatku železa či jeho relativního deficitu pro krvetvorbu při distribučních poruchách tak, jak je tomu u anémie při chronickém onemocnění (ACD). Základem léčby sideropenie je podávání perorálních přípravků Fe, nicméně především za situace, kdy je významně sníženo vstřebávání Fe z trávicího traktu, je plně indikováno parenterální podávání Fe. V diagnostice sideropenie se uplatňuje především vyšetření hladiny feritinu v séru, saturace transferinu (satTRF) jako poměru hladiny Fe v séru a celkové vazebné kapacity transferinu pro Fe a vyšetření hladiny cirkulujících transferinových receptorů (cTfR). Vyšetření kombinace těchto parametrů je důležité zejména u anémie, kde jsou příčinou současně krevní ztráty a distribuční porucha při chronickém onemocnění /chronické nefritidy, ulcerosní kolitis/. Vzhledem k tomu, že při chronickém onemocnění je porucha distribuce železa určitým obranným mechanismem, je třeba vždy přesně určit skutečný stav zásob Fe a správně indikovat nasazení substituce železem. Za známky přítomnosti skutečného deficitu Fe se u anémie při chronického onemocnění pokládají hladina feritinu v séru < 30–50 µg/l, satTRF < 16%, hladina cTfR > 5 mg/l. Podávání parenterálních přípravků Fe mělo prokazatelně lepší efekt na reparaci krevního obrazu než podávání perorálních přípravků Fe u nemocných s nádorových chorobami léčených chemoterapií a u těchto nemocných měla efekt na kvalitu života i kombinace erythropoetinu (EPO) s parenterálním Fe, nebyl pozorován efekt podávání Fe či kombinace Fe+EPO na základní chorobu. Na kombinaci podávání EPO a parenterálního Fe u nemocných s chronickou renální insuficiencí není jednotný názor, a to zejména na paušální podávání této kombinace. Pro zhodnocení efektu i.v. aplikace Fe u nemocných s jinými chronickými chorobami chybí dostatek dat a randomizované studie. V současné době se zejména u těžších deficitů železa s výhodou uplatňuje podávání přípravku s vysokým obsahem Fe v ampulí (Ferinject-500 mg Fe/amp.) ve velmi pomalé i.v. infuzi, jež účinně odstraňuje nutnost opakovaného podávání přípravků s nižším obsahem Fe a tím pravděpodobnost vzniku nežádoucích reakcí spojených s parenterální aplikací Fe.

2538.

Cyklosporin A v léčbě imunitní trombocytopenie – vlastní zkušenosti

Hluší A., Szołkowski T., Procházková J., Papajík T. (Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc)

Úvod: Terapie pacientů s imunitní trombocytopenií, kde selhala standardní imunosupresivní terapie kortikosteroidy, představuje často závažný problém. Vedle splenektomie či imunoterapie Rituximabem lze využít i další látky ze skupiny imunosupresiv. V práci hodnotíme vlastní zkušenosti s použitím cyklosporinu A v souboru 34 pacientů s primární ITP, léčených na našem pracovišti v letech 1996–2013. Charakteristika souboru: Terapie cyklosporinem byla indikována u 34 pacientů (17 mužů, 17 žen), z toho ve 4 případech opakovaně. Věkový medián při zahájení terapie byl 49,5 roku (19–73). Před indikací terapie CyA byly prům. podány 2,3 jiné léčebné modalit. V 18 případech proběhla léčba v chronickém, v 7 případech perzistentním a ve 13 akutním stadiu ITP. U 3 pacientů šlo o těžkou rezistentní formu ITP po SE. V úvodu terapie CyA byly u většiny pacientů konkomitantně podávány kortikosteroidy, které samostatně k dosažení odpovědi nevedly.

Výsledky: Z 38 léčených případů 24 (63%) dosáhlo CR, 4 PR, minimální odpovědi (2x zvýšení inic. počtu Tr do bezpečného pásma) bylo dosaženo ve 2 případech. V 8 případech (21%) efekt pozorován nebyl. Pacienti léčení v akutním stadiu ITP dosahovali lepší odpovědi než ve stadiu chronickém (CR 11/13 vs 10/18). Pacienti s nižším počtem předchozích léčebných modalit dosahovali odpovědi častěji než více předléčení. Nástup efektu léčby jsme pozorovali za 1–15 týdnů (med. 4) při průměrné denní dávce CyA 3,6 mg/kg. Hladina CyA byla pravidelně monitorována s cílem udržení

hladiny mezi 150–250 µg/l. Terapie CyA byla u 18 pacientů z 28 postupně vysazena, z nich 4 (22%) zrelabovali. U ostatních dosažená odpověď po vysazení setrvává 9–143 měsíců (med. 27 m). Stran tolerance léčby byl CyA většinou dobře snášen, z nežádoucích účinků jsme pozorovali mírnou renální insuficienci, dekompenzaci hypertenze a častější infekční komplikace.

Závěr: Naše zkušenosti s použitím CyA v terapii ITP potvrzují jeho potenciálně kurativní efekt. Ten byl v našem souboru pozorován u významného počtu pacientů. Terapie CyA umožnila částečně vyhnout se splenektomii a byla efektivní i u některých velmi rezistentních případů. Podobně jako u jiných léčebných modalit je terapie efektivnější u méně předléčených pacientů.

2639.

Skladování a přeprava krve a transfuzních přípravků

Masopust J., Bohoněk M. (Transfuzní odd., KZ, a.s.-Masarykova nemocnice, o.z., Ústí nad Labem, Odd. hematologie a krevní transfuze, ÚVN, Praha)

Skladování a přeprava krve jsou důležitými kroky v procesu výroby transfuzních přípravků a surovin pro další výrobu (dále jen TP), které mají zásadní vliv na jejich jakost. Závazné podmínky stanovuje Vyhláška 143/2008 Sb. o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidské krve a jejích složek a doporučení Rady Evropy Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. V těchto dokumentech lze však nalézt pouze základní limity a požadavky na skladování a přepravu TP. Společnost pro transfuzní lékařství vypracovala návrh doporučení, upřesňující obecné požadavky výše uvedených dokumentů především v oblasti mimolimitních hodnot a validací skladování a přepravy TP.

POSTEROVÁ ČÁST

OŠETŘOVATELSTVÍ

P1/2648.

Ošetrovateľské skúsenosti odberu autologných doštičiek a plazmy kombinovanou aferézou od matiek po odtoku plodovej vody pre gynekologický výkon Amniopatch

Lovaščíková J., Skypalová L., Choudhury S., Svíteková K. (Národná transfúzna služba, Bratislava – SVK)

Amniopatch je výkon u tehotných žien po spontánnom alebo iatrogénnom previablem odtoku plodovej vody od 17–25 týž. gravidity. Na požiadanie gynekológov na našom aferetickom pracovisku odoberáme autológne trombocyty a plazmy od matky kombinovanou trombocytaferézou s plazmaferézou. Potom sú trombocyty a kryoprecipitát vyrobený z plazmy aplikované intraamniálne, transabdominálnou cestou. Pri úspešnom zákroku dochádza k lepeniu alebo aspoň významnému zúženiu defektu na amniálnych obaloch. To predlžuje gravidity a umožní donosiť a cisárskym rezom porodiť dieťa v 29.–30. týž. tehotenstva. Na našom pracovisku pre tento účel používame separátor Haemonetics MCS+ s protokolovou kartou LDP, set 994 CF/E. S dvoma cyklami odobrané cca 210 ml trombocytov s výťažnosťou okolo 1,4–2,0 x 10 na 11/l a cca 250 ml plazmy, ktorá sa zamrazí, následne rozmrazí a centrifuguje pri 3000 ot. a vyrobí kryoprecipitát. Späťne sme sledovali 3 podobné kombinované aferetické odbery v roku 2013. V jednom prípade po 3 cykloch a v dvoch prípadoch po 2 cykloch separovali požadované množstvo autológnych produktov Tr a plazmy pre amniopatch. Všetky 3 procedúry prebiehali u tehotných matiek po odtoku plodovej vody bez problémov. Ošetrovateľská starostlivosť aferetických sestier u týchto pacientiek vyžaduje mimoriadnu pozornosť pre úspešnú aferézu Tr a plazmy.

P2/2637.

Vřed předloktí – kumarinová nekróza ano či ne?

Urbanová J., Čáková L., Vaicová M. (Klinika nemocí kožních a pohlavních, FN, Hradec Králové)

Kumarinová nekróza je vzácnou, ale veľmi závažnou komplikáciou liečby Warfarinom. Zpočiatku sa objavuje veľmi bolestivé zarudnutie kůže s petechiami, v ďalšom prúběhu kůže zčerná, vzniká nekróza pokryta krustou. Ve své kazuistice prezentují případ 34-letého polymorbidního muže, u něhož při léčbě Warfarinem vznikl vřed na předloktí horní končetiny. V diferenciální dg. bylo mimo jiné pomýšleno i na tuto diagnózu.

P3/2530.

Imunoadsorpce – 9 let zkušeností na Aferetickém oddělení ÚHKT Praha

Kynclová E., Muzikantová L., Boušková S., Kouklíková E. (Aferetické oddělení, ÚHKT, Praha)

Imunoadsorpce je léčebný výkon, při kterém se pomocí imunoadsorpčních kolon a v nich obsažených účinných látek odstraňují z plazmy pacienta patologické látky a imunoglobuliny. Těto technice se na našem oddělení věnujeme od roku 2004. První výkony jsme začaly provádět na přístrojích Cobe Spektra, na kterých se separovala plazma, a na připojeném přístroji Citem probíhala samotná adsorpce imunoglobulinů. V roce 2010 jsme začaly používat kombinaci přístrojů Com. Tec a Adasorb a v letošním roce máme nově k oddělení plazmy filtrační přístroj Art od firmy Fresenius. Od června 2010 do února 2012 jsme prováděly imunoadsorpce u jednoho pacienta na přístroji Life 18, celkem u něj proběhlo 19 terapií. Léčíme pacienty s diagnózou MYASTENIA GRAVIS, v současné době 5 klientů, u jedné klientky byly výkony ukončeny po 11 terapiích. V minulosti jsme prováděly imunoadsorpce u pacientů s dilatační kardiomyopatií a pacientů před a po transplantaci kmenových buněk. V krvi léčených klientů dochází po IA k výraznému snížení hodnot imunoglobulinů a autoprotilátek proti acetylcholinovému receptoru. Léčba pacientům s dg. MG přináší zlepšení zdravotního stavu, ale musí docházet k výkonům opakovaně a pravidelně. Z našeho pohledu je imunoadsorpce náročnější výkon z hlediska přípravy a klade větší nároky na trpělivost pacienta pro delší dobu trvání.

P4/2573.

Morbus HAILEY-HAILEY (Benigní familiární PEMFIGUS) – komplikace (Morbus HAILEY-HAILEY*Vodičková M. (HOK, FN, Olomouc)*

Chronické, závažné onemocnění kůže velmi ovlivňuje kvalitu života pacienta při hemato-onkologické léčbě cytostatiky a při radioterapii. Morbus Hailey-Hailey, jeden z druhů Pemfingu je autoimunitní puchýřnaté onemocnění postihující kůži po celém těle. Objevují se puchýře až buly. Jejich okolí je postiženo zánětem a po protržení nebo stržení puchýřů zůstanou eroze s vlhkými mazlavými šedými strupy, které silně zapáchají, bolí a často se infikují. U pacientů se sníženou obranyschopností se postižení rychle šíří a dochází k rozvoji sepse. Urgentním řešením je jak léčba celková – antibiotiky tak i léčba lokální pomocí moderních materiálů a postupů hojení ran. V kazuistice je ukázán průběh hojení infikované eroze za pomoci metod vlhkého hojení v době chemoterapie a radioterapie pacientky s folikulárním lymfomem.

P6/2594.

Adcetris v léčbě relabujícího nebo refrakterního Hodgkinova lymfomu*Starostová L., Zbořilová R., Uvázlová E., Papajík T., Labudíková M. (HOK, FN, Olomouc)*

Hodgkinův lymfom je nádorové onemocnění vycházející z CD30+ B-buněk lymfatické tkáně. Incidence této choroby je 2 – 3/100 000 obyvatel /rok. Onemocnění nejčastěji postihuje mladé lidi ve třetí a čtvrté dekádě života. Moderní kombinovaná chemoterapie a radioterapie významně změnila úspěšnost léčby tohoto onemocnění. Léčbou první linie dosahujeme u 85–90 % pacientů dlouhodobé remise a v případě relapsu je až 50 % pacientů vyléčeno podáním záchranné terapie a vysokodávkované chemoterapie s následnou autologní transplantací kmenových buněk. Stále ale zůstává skupina pacientů, u nichž léčba selhává a jejichž prognóza je nepříznivá. Právě pro tuto skupinu nemocných představuje naději nové léčivo – konjugát protilátky a léku -brentuximab vedotin (Adcetris®). Brentuximab vedotin se skládá ze tří částí – monoklonální chimerické protilátky anti- CD30, cytostatika monomethylauristatinu E a spojovací části. Účinek léku začíná vazbou konjugátu na antigen CD30 a proniknutím cytostatika přes stěnu buňky, kde v lysozomu dochází k odštěpení monomethylauristatinu E. Ten se pak naváže na tubulin, naruší síť mikrotubulů v buňce, iniciuje zástavu buněčného cyklu a vede ke smrti nádorové buňky. Dle výsledků studií fáze I/II je brentuximab vedotin podáván v dávce 1,8 mg/kg co 3 týdny, v sérii 8 až maximálně 16 cyklů, v závislosti na účinnosti léčby nebo projevech nežádoucích účinků. V případě projevů toxicity se doporučuje snížení dávky nebo prodloužení intervalu mezi jednotlivými cykly. Lék je aplikován ambulantně formou 30 minutové intravenózní infuze, kdy je substance rekonstituována v 250 ml FR. Podaná premedikace je stejná jako u jiných monoklonálních protilátek. Bezprostřední nežádoucí reakce na infuzi byly pozorovány asi jen u 11 % pacientů (zimnice, třesavka, vyrážka či dýchací obtíže). Mezi nejčastější vedlejší nežádoucí účinky léčby patří neutropenie a senzorická periferní neuropatie, ojediněle jsou pak popisovány známky syndromu nádorového rozpadu. Dle dlouhodobých výsledků provedených studií se jeví terapie brentuximab vedotinem jako bezpečná a pacienty dobře tolerovaná. V našem centru byl brentuximab vedotin podán 5 pacientům v relapsu po autologní transplantaci kmenových buněk (2 muži a 3 ženy) s mediánem věku 37 let (22–43). Podrobné zkušenosti s podáním, nežádoucími účinky a efektem léčby brentuximab vedotinem budou obsahem prezentovaného sdělení.

P7/2615.

Sledování komplikací po běžném a aferetickém odběru za období 2008–2013*Němčanská I., Gronych A., Hlávková E., Koukalová A., Galuszková D. (TO, FN, Olomouc)*

Úvod: Transfuzní oddělení (TO) FN Olomouc (FNOL) zavedlo od roku 2008 systém sledování a vyhodnocování komplikací při běžných i aferetických odběrech u dárců krve. Sledování probíhá od začátku odběru až do jeho ukončení. Důvodem zavedení systému sledování bylo získání přehledu o všech komplikacích u našich dárců, identifikovat příčiny, postupně snižovat výskyt a stanovit jednotný postup při jejich řešení. Metodika: Vstupně byly definovány jednotlivé druhy komplikací, ty jsou po odběru zaznamenány všeobecnou sestrou v programu ISTO 3300. Zároveň jsou zapsány do evidenční karty dárce a u aferetických odběrů do pracovního sešitu k danému přístroji. Soubor kom-

plikací je vyhodnocován statisticky a v trendech na konci každého měsíce. Na odbor kvality FNOL je posílán 1x ročně jako indikátor kvality TO. Za sledované období došlo u běžných odběrů k poklesu všech sledovaných komplikací vyjma výskytu nevolností u dárců. Vyšší výskyt nevolností souvisí se zvyšujícím se počtem prvodárců zejména z mladších věkových kategorií. U aferetických odběrů bylo naopak zaznamenáno snížení výskytu nevolností a problémů se žilním systémem dárců, snížil se také výskyt technických komplikací.

Závěr: Dosažené výsledky jsou základem pro edukaci dárce, zvyšování proškolení zdravotnického personálu a zlepšování managementu i.v. vstupů. Naším cílem je i nadále snižovat, respektive předcházet komplikacím v průběhu všech odběrů u dárců.

P8/2614.**High-dose cytarabine and mitoxantrone ±rituximab for collection of peripheral blood stem cells in high-grade non-Hodgkins' lymphoma. Single center experience with filgrastim biosimilars**

Skoumalová I., Kapitáňová Z., Urbanová R., Faber E., Píkalová Z., Papajík T., Indrák K. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

For the patients with aggressive non-Hodgkins' lymphomas chemotherapy – high-dose of cytarabine with mitoxantrone ±rituximab (R±HAM) is used for the standard collection of peripheral blood stem cells as a part of Sequential Protocol chemotherapy (2xPACEBO, IVAM, PACEBO, HAM ±rituximab). We describe here the experience with the efficacy and safety together with the comparison of two filgrastim (G-CSF) biosimilars. R±HAM was given as follows: rituximab 375 mg/m² — day 1; cytarabine 2g/m² in 4 doses — day 1 and 2; mitoxantrone 10 mg/m² in 2 doses — day 2 and 3. In older patients the dose of cytarabine and mitoxantrone was reduced to 0.5 g/m² and 7 mg/m², respectively. Three different types of G-CSF at the same dosage (10µg/kg) were used to stimulate peripheral blood stem cells: Neupogen (39 pt.), Zarzio (28 pt.) and Tevagrastim (11 pt.). Retrospective analysis was performed in cohort of 78 patients with NHL in the period 1/2009 – 9/2013. Median of age was 53 (22–64) years. Efficacy of the type of G-CSF in terms of the collection days and number of CD34+ cells per kg collected was the first goal of our study. The incidence of infections and other side-effects were recorded in addition. Kruskal-Wallis and Fisher exact tests were used for comparison. There were no differences among the groups of patients with respect to the gender, age, marrow involvement and previous treatment. There were no statistically significant differences in number of collection procedures among the groups (p=0.084); on average 1.69 procedures for Neupogen, 1.53 procedures for Zarzio and 1.81 procedures for Tevagrastim. Also there were no statistically significant differences in number of CD34+ cells per kg collected (p=0.497); on average 8.29x10⁶ CD34+ cells per kg for Neupogen 8.51x10⁶ CD34+ cells per kg for Zarzio and 6.66x10⁶ CD34+ cells per kg for Tevagrastim. Patients hospitalized and central venous line inserted for the whole period of the priming (42 pt.) have a significant higher risk of septicaemia (p=0.002). All patients who proceed to the transplantation engrafted. R±HAM is well tolerated and highly efficient priming chemotherapy (average number of CD34+ cells collected was 7,82x10⁶ per kg). Different types of G-CSF show no statistically significant differences in the stimulation efficacy. Prolonged hospitalization and central venous catheterization is associated with higher risk of septic complications. Supported by the grants MSM-6198959205 and IGA UP LF-2013-004.

P9/2610.**Tyreoidálna dysfunkcia po alogénnej transplantácii kmeňových buniek**

Roziaková L., Mistrík M., Bojtárová E., Bátorová A., Mladosičová B. (Klinika hematológie a transfuziológie, Bratislava – SVK; Oddelenie klinickej patofyziológie, Bratislava – SVK)

Úvod: Tyreoidálna dysfunkcia patrí medzi najčastejšie endokrinné komplikácie po transplantácii kmeňových krvotvorných buniek (TKB). Hypotyroidizmus je najviac sa vyskytujúcou tyreopatiou po TKB, z ďalších abnormalít štítnej žľazy sa môže objaviť aj hypertyroidizmus a malignity štítnej žľazy. **Pacienti a metódy:** Súbor tvorilo 74 pacientov (41 mužov a 33 žien), ktorí boli aspoň 2 roky od alogénnej TKB. Medián veku v čase transplantácie bol 35 rokov (rozsah 12–63 rokov) a medián sledovania od TKB bol 5 rokov (rozsah 2–23 rokov). Indikáciu na TKB boli malígne, ako aj nemalígne ochorenia. Myeloablatívny prípravový režim s cyklofosfamidom v kombinácii s celotelovým ožiarením (TBI) malo 27% pacientov a v kombinácii s busulfanom 56,7% pacientov, zvyšných 16,3% malo nemyeloablatívny režim. Chronickú reakciu štepu proti hostiteľovi (GvHD) malo 19 (25,6%) pacientov. Primárny (periférny) hypotyroidizmus bol definovaný ako zvýšená hodnota TSH s normálnou hodnotou fT₄ (subklinický hypotyroidizmus) alebo so zníženou hodnotou fT₄ (manifestný hypotyroidizmus). Sekundárny (centrálny) hypotyroidizmus bol definovaný ako znížená hodnota fT₄ s normálnou alebo zníženou hodnotou TSH.

Výsledky: Abnormality štítnej žľazy sme zaznamenali u 22 (29,7%) pacientov. Hypotyroidizmus bol zistený u 21 (95,4%) pacientov, z toho 11 pacientov malo centrálny, 4 pacienti primárny manifestný

a 6 pacientov primárny subklinický hypotyroidizmus. U 1 pacienta bol novozistený periférny hypertyroidizmus. Štyria pacienti boli liečení substitučnou liečbou. Desiatročná kumulatívna incidencia tyreopatií v našom súbore bola 32,5%. Chronická GvHD bola významným rizikovým faktorom v rozvoji dysfunkcie štítnej žľazy (P = 0,01). Úloha TBI, veku, pohlavia, kortikoterapie alebo použitého prípravového režimu nebola štatisticky významná.

Záver: V našom súbore pacientov po alogénnej TKB sme zaznamenali takmer u jednej tretiny pacientov výskyt tyreopatie, čo predstavuje 2–3 násobne vyšší výskyt tyreopatií v porovnaní s bežnou dospelou populáciou na Slovensku. Preto je úlohou hematológov nielen vyliečenie pacienta zo základného onkologického ochorenia, ale aj doživotné sledovanie kvality života po jeho vyliečení a v prípade zistených abnormalít odoslanie pacienta k príslušnému špecialistovi. Pracovné skupiny odborníkov pre TKB odporúčajú sledovanie hormónov štítnej žľazy v ročných intervaloch alebo v prípade vzniku klinickej symptomatológie.

P10/2591.**Infekce HHV6 a Parvovirus B19 jako příčina cytopenie po autologní transplantaci krvetvorných buněk. Popis případu.**

Szotkowská R., Ráida L., Faber E., Rusiňáková Z., Procházková V., Indrák K. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Infekce herpetickými viry mohou významně ovlivnit morbiditu a mortalitu nemocných s hematologickými malignitami. Osm z nich je specifických pro člověka (HHV 1–8). Tyto viry jsou charakteristické trvalou perzistencí v organismu po primární infekci se schopností následné reaktivace při imunitním oslabení. V naší kazuistice popisujeme případ pacientky, u které došlo k reaktivaci infekce virem HHV6 spolu s Parvovirem B19 (PB19) po autologní transplantaci krvetvorných buněk. Reaktivace HHV6 infekce se může projevovat horečkou, kožním exanthémem, opožděným přijímením v monocytární a destičkové řadě, selháním štepu, intersticiální pneumonií, encefalitidou – tyto komplikace jsou popisovány dominantně po alogenních transplantacích krvetvorných buněk. K léčbě je doporučován foscarnet nebo ganciclovir. Infekce PB19, která je popisována jako vzácnější komplikace, se projevuje dominantně anémií, ale i leukopenií a trombocytopenií, taktéž až s možným selháním štepu. Léčba spočívá v aplikaci i.v. imunoglobulinů (IVIG). U naší pacientky s dg. B-difúzního velkobuněčného lymfomu došlo den +59 po autologní transplantaci krvetvorných buněk k rozvoji cytopenie s atakou febrilní neutropenie. V kostní dřeni byla metodou PCR detekována PB19-DNA. Byla zahájena léčba IVIG 30g/d 6 dní, poté 3x týdně. Po přechodné úpravě krevního obrazu došlo ke 2. atace febrilní neutropenie. Bylo pokračováno v aplikaci IVIG a nově i foscarnetu pro záchyt HHV6-DNA spolu s PB19-DNA v kontrolní kostní dřeni. Na uvedené léčbě došlo opět k regeneraci krevního obrazu, dosud trávající. Prezentovaný případ dokumentuje možný vliv virových infekcí na krvetvorbu hematologických nemocných, a to nejen po alogenní, ale i po autologní transplantaci krvetvorných buněk. Podpořeno grantem LF-2014-001.

P11/2542.**Somatické mutace v HLA genech u pacientů s akutní myeloidní leukémií identifikované při vyšetření pro účely transplantace krvetvorných kmenových buněk**

Mrázek F., Onderková J., Szotkowski T., Rohoň P., Königová N., Ambrůzová Z., Faber E., Petřek M., Ráida L. (Ústav imunologie, FN a LF UP, Olomouc; Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc)

Somatické mutace v HLA genech mohou napomáhat úniku maligních buněk z imunitního dohledu. I když jsou identifikovány vzácně, mohou tyto mutace u pacientů s hematologickými malignitami komplikovat HLA typizaci pro výběr dárce k transplantaci krvetvorných kmenových buněk (TKKB). Zde popisujeme dva případy somatických mutací HLA u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) indikovaných k alogenní TKKB. Případ 1: Při typizaci HLA-A genu pacientky s AML pomocí sekvenování jsme zjistili dosud nepopsanou mutaci (G/A) v pozici 781 exonu 4 HLA-A genu. Na základě rodinné studie byla přítomnost nové alely nepravděpodobná. Abychom zjistili, zda tato mutace není omezena jen na cirkulující maligní buňky, provedli jsme nově vyšetření ze vzorku získaného po vymizení blastů v periferní krvi. Ve vzorku „v remisi“ mutace G781A zcela chyběla. Finální „zárodečný“ HLA typ pacientky a jednoho z jejích sourozenců byl proto totožný. Případ 2: Pacient s AML ery-

troidního typu byl při úvodním vyšetření shodný se svou sestrou v HLA znacích na úrovni nízkého rozlišení. Při potvrzování HLA identity mezi sourozenci na úrovni vysokého rozlišení byla u pacienta zjištěna anomální sekvence třetího exonu HLA-B genu, která se nevyskytovala u jeho zdravé sestry. Detailní analýza ukázala, že heterozygotní posun sekvence odpovídá unikátní deleci dvou bází v závěrečné části exonu 3 HLA-B genu. Podobně jako v prvním případě jsme však nepozorovali žádné známky uvedené delece v novém vzorku pacienta, který již neobsahoval blasty. V souladu s tím byly HLA typy pacienta a jeho sestry uzavřeny jako vzájemně identické.

Závěr: Jak neznámá záměna G781A v HLA-A genu, tak i unikátní delece v exonu 3 HLA-B genu byly u pacientů s AML pozorovány pouze ve vzorcích s výraznou příměsí blastů a mohou být proto vysvětleny jako somatické mutace v maligních buňkách. V obou případech umožnilo dodatečné vyšetření vzorků „v remisi“ potvrdit HLA identitu pacientů s jejich sourozenci, kteří tak pro ně mohli být doporučení jako vhodní dárci.

Grantová podpora: IGA MZCR NT12454 a IGA UP_LF_2014_012.

MDS

P12/2563.

Heterogenita alfa-talasemických delecí v české populaci: potvrzení úlohy oblasti HS-40 v regulaci exprese alfa-globinových genů

Divoká M., Pospíšilová D., Lapčíková A., Koláčková M., Orviská M., Lipert J., Novosadová A., Divoký V., Indrák K. (Hemato-onkologická klinika, FN a LF, Olomouc; Dětská klinika, FN a LF, Olomouc; Ústav biologie, LF, Olomouc)

Alfa-talasemie (alfa-tal) jsou vrozené anémie s recesivní dědičností charakterizované kvantitativní redukcí syntézy alfa-globinových (gb) řetězců. Onemocnění je nejčastěji způsobeno delecemi úseků DNA v alfa-gb lokusu (HBA) na 16. chromozomu a vyznačuje se mikrocytární hypochromní anémií s různými fenotypovými stupni závažnosti. U alfa+ tal je jeden ze dvou genů na chromozomu deletován (–alfa/alfa;alfa) nebo inaktivován bodovou mutací. U alfa0 tal jsou inaktivovány oba alfa-gb geny na chromozomu, nejčastěji delecí, která postihuje část lokusu (–/alfa;alfa); stejný efekt, tj. úplnou ztrátu exprese genů příslušného lokusu, má delece regulační oblasti (human alpha globin upstream regulatory element, HS-40) v poloze cis. HS-40 se nachází více než 40 kb 5' od alfa-gb genů, působí jako zesilovač genové exprese, nezbytný pro erytroidně-specifickou transkripci genů HBA lokusu. Byly publikovány různé typy delecí postihující oblast HS-40, vedoucí k alfa0-tal; některé delece zahrnují jen různé velké úseky regulační oblasti HS-40, jiné delece jsou rozsáhlé, postihující kromě HS-40 i alfa-gb geny příslušného lokusu. Podobné typy delecí jsou vzácně detekovány v různých populacích. Naše studie provedená alelově-specifickou PCR (ASO-PCR) a MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) na souboru 116 rodin (137 členů) s podezřením na alfa-tal odhalila u 50 rodin (55 nemocných) různé delece v rámci HBA lokusu. Ve většině případů se jednalo o běžné typy delecí jednoho nebo dvou alfa-gb genů, známé ze Středozeří nebo z jihovýchodní Asie. Delece oblasti HS-40 byla detekována u 7 rodin (11 členů) s klinickými projevy odpovídajícími ztrátě dvou alfa-gb genů (nosičství alfa-tal), a u 1 rodiny s klinickými projevy odpovídajícími ztrátě tří alfa-gb genů (choroba HbH). Molekulární analýzou nemocných jsme zjistili, že u 3 rodin (6 členů) se jednalo o rozsáhlé delece celého HBA lokusu, včetně HS-40. U 4 rodin (5 členů) jsme detekovali různě dlouhé delece regulační oblasti HS-40, ale s intaktními alfa-gb geny. Fenotyp odpovídající nosičství pro alfa0 tal delecí byl u všech 11 nemocných stejný, nezávisle na tom, byly-li součástí delece i oba alfa-gb geny; jde tedy o potvrzení klíčové úlohy HS-40 v regulaci exprese alfa-gb genů. Mimořádný je případ dětské pacientky s HbH onemocněním způsobeným inaktivací dvou alfa-gb genů delecí HS-40 na jednom chromozomu v kombinaci s delecí jednoho alfa-gb genu na druhém chromozomu.

Podporováno granty: IGA_LF_2014_001; IGA MZ ČR NT13587-4.

P13/2602.

Projekt MDS na severní a střední Moravě

Starostka D., Rohoň P., Adamová D., Kadlčková E., Břejcha M., Janek D., Rytíková N., Jochymek R., Švarná M., Laská J., Vinklárková K. (Oddělení klinické hematologie, NsP, p.o., Havířov; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Hematologicko-transfuzní oddělení, Slezská nemocnice, p.o., Opava; Hematologicko-transfuzní oddělení, Krajská nemocnice T. Bati, a.s., Zlín; Hematologické oddělení, Nemocnice, a.s., Nový Jičín; Hematologicko-transfuzní oddělení, Nemocnice s poliklinikou, p.o., Karviná-Ráj; Hematologická ambulance, Sdružené zdravotnické zařízení, p.o., Krnov; Hematologicko-transfuzní oddělení, Nemocnice, p.o., Třinec; Hematologicko-transfuzní oddělení, Nemocnice, p.o., Frýdek-Místek; Oddělení klinické hematologie, Městská nemocnice, p.o., Ostrava; Hematologicko-transfuzní oddělení, Nemocnice, a.s., Hranice)

Úvod: Primárním cílem projektu byl sběr údajů o výskytu MDS a jeho léčbě na severní a střední Moravě. Sekundárním cílem projektu bylo zpřesnění diagnostiky a prognostické stratifikace MDS v uvedeném regionu (druhé čtení cytologie, centralizace cytogenetické analýzy).

Metody: Údaje o nově diagnostikovaných případech MDS a MDS/MPs byly evidovány po dobu 1 roku v regionu s populací 2,2 mil. obyvatel. Sledované údaje zahrnovaly: pohlaví, věk v době diagnózy, kategorie MDS dle WHO klasifikace, rozlišení na primární a sekundární MDS, IPSS, PS dle WHO, komorbidity a způsob léčby.

Výsledky: Celkem bylo diagnostikováno 107 nových případů MDS a MDS/MPS. Incidence MDS a MDS/MPS byla 4,9 případů na 100 tis. obyvatel (47,7 % mužů, 52,3% žen). Věkový medián v době diagnózy byl 70 let (minimum 43 let, maximum 84 let). Výskyt jednotlivých diagnostických kategorií: RCUD 15%, RARS 9,3%, RCMD 37,4%, RAEB-1 15%, RAEB-2 10,3%, 5q- syndrom 0,09%, MDS-U 0,09%, CMML-1 4,7%, CMML-2 4,7%, neklasifikovatelný MDS/MPS 1,9%. Diagnostická shoda 1. a 2. čtení cytologie byla 92%. Diagnostická shoda cytologie a histologického vyšetření byla 74%. Rozdělení podle IPSS: riziko nízké 32,9%, intermediární-1 44,7%, intermediární-2 16,4%, vysoké 6,0%. Rozdělení podle PS (WHO): skóre 0–24%, skóre 1–50%, skóre 2–11%, skóre 3–15%. Primární MDS v 84,1%, sekundární MDS v 15,9% (antineoplastická léčba pro kolorektální karcinom, karcinom prsu, děložního čípku, seminom, sarkom, folikulární lymfom a DLBCL, cytostatická léčba revmatoidní artritidy, psoriatické artritidy a ulcerózní kolitidy). Signifikantní komorbidity se vyskytla u 72% nemocných: kardiovaskulární (ICHS, hypertenze, CHSS, chlopní vady, TEN, ICHDKK, CMP) 52,3%, endokrinologická (DM a hypothyreóza) 27%, gastrointestinální (ulcerózní kolitida, vředová choroba, chronická pankreatitida, cirhóza jater) 12,1%, významná CHRI 5,6%, revmatologická onemocnění 5,6%, plicní komorbidity (CHOPN, pneumokonióza) 4,7%, neurologická a psychiatrická onemocnění (RSM, epilepsie, schizoafektivní a depresivní porucha) 7,5%. Nádorová duplicita se vyskytla v 16,8%, byl evidován 1 případ nádorové triplicity. Léčba zahrnovala: přístup watch and wait 42%, transfúze erytrocytů 50,5%, erytropoetin event. s G-CSF 17,8%, chemoterapie 12,1% (režim 7+3, hydroxyurea, etoposid, cytarabin), epigenetická léčba (5-azacytidin) 7,4 %, chelatace 4,7%, kortikoterapie 3,7%, allo-BMT 1,9% (aktuální kandidáti allo-BMT 3,7%).

P14/2599.

Hodnotenie terapeutického efektu hypometylačnej liečby na základe zmien morfológického obrazu vysokorizikových

Vašková P., Plank L., Szépe P., Marcinek J., Balhárek T. (Ústav patologickej anatómie, JLF UK a UN, Martin – SVK; Martinské bioptické centrum, s.r.o., Martin – SVK)

Úvod: Blastické MDS (RAEB 1,2 a RAEB s fibrózou) a najnovšie aj MDS typu RCMD, ktoré podľa rôznych údajov tvoria pribl. 25% a viac všetkých MDS, patria k vysokorizikovým („high risk“) MDS. Obyčajne vedú k progresívnemu zlyhávaniu kostnej drene (KD), s prehlbovaním cytopénii a rizikom blastickej transformácie do sekundárnej akútnej myeloidnej leukémie (AML). Ich liečba je problematická a ochorenie môže progredovať aj napriek liečbe. Jedinou potenciálne kuratívnu terapiou je transplantácia hemopoetických kmeňových buniek (HSCT) a dnes sa popri chemoterapii (CHT) štandardom liečby stávajú aj hypometylačné látky, najmä azacitidín (AZA). Materiál a metodika: V našom registri sme identifikovali 65 pacientov s vysokorizikovým MDS s opakovanými vyšetrenými biopsiami, ktoré boli farbené panelom histologických a imunohistochemických metód. V nich sme hodnotili terapeutický efekt na základe zmien morfológie – najmä podielu blastov v KD, resp. progresie do AML a progresie fibrózy.

Výsledky: Súbor tvorilo 65 pacientov (40 mužov a 25 žien), s priemerným vekom 63 rokov. Najčastejší typ MDS bol RAEB 2 (20 pacientov), resp. RAEB so známami transformácie do AML (15 pacientov). 35/65 pacientov bolo liečených AZA. Terapeutický účinok – stabilizácia ochorenia v zmysle neprogresie podielu blastov a/alebo fibrózy alebo redukcia blastov – bol zrejmy v 24/35 a progresia ochorenia napriek liečbe v 7/35 prípadoch, v ďalších 4/35 bola postterapeutická biopsia nereprezentatívna. Len CHT bola podaná celkovo v 19/65 prípadoch, s morfológicky zjavným účinkom u 12, s progresiou u 6 z nich a jedna biopsia bola nereprezentatívna. U 11/65 pacientov bola aplikovaná liečba AZA aj CHT. HSCT bola zrealizovaná iba u dvoch pacientov, avšak u oboch došlo krátko po liečbe k relapsu základného ochorenia.

Záver a diskusia: Aj keď okrem HSCT stále nepoznáme kuratívnu liečbu vysokorizikových MDS, tak zistené výsledky podporujú klinicky overovaný benefit hypometylačnej liečby vysokorizikových MDS v zmysle morfológicky verifikovateľnej stabilizácie, resp. neprogresie ochorenia.

Podakovanie: Práca bola podporená grantom UK č. 447/2013 a projektami MBRKM a BioMed Martin (ITMS kód 26220220113, resp. 26220220187) – sú riešené na JLF UK a spolufinancované z prostriedkov EÚ.

P15/2597.

Mutace v transkripčním faktoru GATA-2 vede k unikátnímu imunofenotypovému profilu v kostní dřeni a periferní krvi

Nováková M., Janda A., Włodarski M. W., Kubříčanová-Žaliová M., Froňková E., Kalina T., Suková M., Campr V., Vodičková E., Zapletal O., Blatný J., Lejhancová K., Pospíšilová D., Černá Z., Kuhn T., Zemanová Z., Trka J., Starý J., Hrušák O., Mejstříková E. (CLIP-Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2.LF a FN Motol, Praha – CZE; Centre of Chronic Immunodeficiency (CCI), University Medical Centre and University of Freiburg, Freiburg im Breisgau – DEU; Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, University of Freiburg, Freiburg – DEU; Klinika dětské hematologie a onkologie, UK 2.LF a FN Motol, Praha; Ústav patologie a molekulární medicíny, UK 2.LF a FN Motol, Praha; Oddělení klinické hematologie, FN Motol, Praha; Oddělení dětské hematologie, Dětská nemocnice, FN, Brno – CZE; Dětská klinika, FN, Hradec Králové – CZE; Dětská klinika, LF UP a FN, Olomouc – CZE; Oddělení dětské hematologie, Dětská klinika, FN a LF UK, Plzeň – CZE; Oddělení dětské hematologie a hematonekologie, FN, Ostrava – CZE; Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, VFN a 1.LF UK, Praha – CZE)

Úvod: Pomocí sekvenování nové generace byla identifikována mutace v transkripčním faktoru GATA-2 jako kauzální příčina spojující několik syndromů: familiární MDS/AML, DCML (deficit dendritických buněk, monocytů, B a NK lymfocytů), MonoMAC (monocytopenie, mykobakteriální infekce) a Embergerův syndrom (lymfedém, sensorineurální hluchota). Syndrom provází řada imunofenotypových abnormit. Polychromatickou průtokovou cytometrií jsme srovnávali nálezy a jejich stabilitu v čase v periferní krvi (PK) a kostní dřeni (KD) u dětských pacientů s mutací GATA-2, aplastickou anémií (AA), MDS a vybranými definovanými primárními imunodeficity.

Pacienti a metody: Pomocí cytometrie jsme vyšetřili buněčné populace v PK a KD (granulocyty, lymfocyty, progenitory krvetvorby, B, T a NK lymfocyty). U části vzorků změřených 12 parametryvým panelem jsme použili tzv. analýzu probability binning a hierarchické shlukování pro definování diagnosticky podobných kategorií. Pomocí PCR jsme vyšetřili hladinu excizních kroužků B a T buněčného receptoru umožňující hodnocení proliferační historie B a T lymfocytů. Mutace v genu GATA-2 byla nalezena u 11 dětí. U 7 pacientů byl primární manifestací GATA-2 deficitu MDS (4 RCC, 3 RAEB), u 2 pacientek byl primárním projevem imunodeficit, v dospělosti obě dospěly do MDS. Jeden pacient je sledován pro intersticiální plicní postižení s vaskulitidou a chronickou EBV infekcí, jeho bratr se stejnou mutací má progresivní změny v krevním obraze. Do kontrolní kohorty jsme zahrnuli 41 pacientů s MDS, 36 s AA, 25 s CVID, 3 s SCID, 17 s DiGeorgovým syndromem. Výsledky. Nejčastějším nálezem u pacientů s GATA-2 mutací byl nález snížení B lymfocytů v KD a PK. Typické bylo chybění B lymfoidních prekurzorů a naopak vyšší zastoupení plazmatických buněk v KD a paměťových forem v PK. Stablní relativní monocytopenie byla nalezena u 4 pacientů. Suprese B lymfocytů je přítomná i u ostatních pacientů s MDS, u pacientů s GATA-2 mutací nacházíme signifikantně nižší hodnotu i ve srovnání s MDS. Pilotní data ukazují na nízké hladiny KREC u pacientů s GATA-2 a u některých pacientů s MDS.

Závěr: Změny v B lymfocytárním kompartmentu jsou nejčastějším nálezem u pacientů s GATA-2 mutací. Snížení progenitorů a imunofenotypové aberace jsou patrné ještě před plným rozvojem MDS. Nízká hladina excizních kroužků B buněčného receptoru naznačuje bohatou proliferační historii v důsledku expanze B lymfocytů při nízké produkci.

Podpořeno IGA NT14534-3, GAČR P301/10/1877, UNCE 204012

P16/2592.

Prognostický význam cytogenetických a molekulárně-genetických změn u pacientů s MDS

Strnková A., Dřevojánková B., Stoklasová M., Šablaturová T., Dostálová L., Burdová A., Skalíková R., Marková D., Wróbel M., Klodová D., Gumulec J., Adamová D., Brejcha M. (Laboratoře AGEL a.s., Nový Jičín; CGB laboratoře Ltd., Ostrava; Nemocnice, a.s., Nový Jičín; Fakultní nemocnice, Ostrava; Slezská nemocnice, Opava)

Introduction: The myelodysplastic syndromes (MDS) are a group of hematopoietic disorders characterized by clonal hematopoiesis, impaired differentiation, peripheral-blood cytopenias, and a risk of progression to acute myeloid leukemia. Conventional cytogenetic analysis (CCA) is one of many prognostic factors included in International Prognostic Scoring System (IPSS). Patients and Me-

thods: We investigated 728 patients (346 men, 382 woman) with primary MDS in years 2003–2013. The CCA was performed on bone marrow samples using short time cultivation (24–48 hours). Interphase FISH (I-FISH) was carried out using DNA probes designed to detect 5q, 7q, 11q, 12p, 17p and 20q deletions, trisomy 8, loss Y (MetaSystems Germany, Abbott Molecular).

Results: We cultivated 94 % of samples successfully. Chromosomal aberrations were detected in 22 % of patients analyzed using CCA and I-FISH. CCA revealed chromosomal aberrations in 8 % of patients with negative I-FISH results. For statistical analysis of our data we followed The New Comprehensive Cytogenetic Scoring System of chromosomal aberrations in MDS defined by Schanz (Schanz J, et al. J Clin Oncol 2012) and we classified chromosomal abnormalities into five prognostic subgroups: very good – 20 patients (3 %), good – 556 patients (81 %), intermediate 41 patients (6 %), poor – 22 patients (3 %) and very poor – 43 patients (6 %).

Conclusion: Our comparison with New Comprehensive Cytogenetic Scoring System defined by Schanz et al. 2012 will be discussed in the poster. However we were able to classify 686 of our patients into this scoring system. According to our results it is important to combined both cytogenetic methods (CCA and I-FISH) to correct classification of patients into prognostic subgroups and suggest appropriate therapy.

P17/2545.

Úloha sestřihových variant mediátorové RNA pro cereblon a polymorfizmu A/G v poloze 29 nukleotidů před startem transkripce u genu pro cereblon v účinnosti lenalidomidu u nízkorizikových pacientů MDS s del(5q)

Bokorová R., Polák J., Vostrý M., Kostečka A., Hájková H., Jonášová A., Neuwirtová R., Šišková M., Šponerová D., Čermák J., Červínek L., Březinová D., Michalová K., Fuchs O. (Oddělení molekulární genetiky, ÚHKT, Praha; Interní klinika, VFN, Praha; Leukemická skupina, FN, Brno; Centrum onkocytogenetiky, VFN, Praha)

Vysoká exprese genu pro cereblon (CRBN) je důležitým prognostickým faktorem pro účinnost terapie imunomodulačními látkami (IMiDs: thalidomid, lenalidomid a pomalidomid) u mnohočetného myelomu. Lidský gen pro CRBN obsahuje 11 exonů kódujících 442 aminokyselin. Část exonu 10 a 11 obsahuje vazebnou oblast pro IMiDs. Prokázali jsme, že vysoké hladiny CRBN mRNA a to varianty plné délky, jsou důležitým biomarkerem pro účinnost lenalidomidu u nízkorizikových pacientů MDS s del(5q). Použili jsme tři komerční testy pro kvantitativní TaqMan PCR v reálném čase pro stanovení relativní hladiny CRBN mRNA vzhledem k hladině GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) mRNA. Testy se lišily polohou primerů a sondy. Zjistili jsme, že nejlepší výsledky poskytují test s primery v oblasti exonu 8 a 10, který nedetekuje poměrně silně zastoupenou sestřihovou variantu CRBN mRNA, kde chybí jen exon 8 nebo jen exon 10. Z výsledků je jasné, že jen sestřihová varianta CRBN pre-mRNA obsahující exony 10 a 11, tedy vazebné místo pro IMiDs, je důležitá jako prognostický faktor pro léčbu pomocí IMiDs. Prudké snížení hladiny CRBN mRNA během léčby nízkorizikových pacientů MDS s del(5q) pomocí lenalidomidu je spojeno se ztrátou odpovědi pacientů na léčbu a s progresí nemoci do stadia RAEB. Zkoumali jsme též úlohu A/G polymorfizmu v poloze 29 nukleotidů před startem transkripce genu pro CRBN u 44 nízkorizikových pacientů MDS s del(5q) a u 10 zdravých kontrol. Nepotvrdili jsme výsledky francouzské skupiny Sardnal et al. (Leukemia 27, 1610-1613, 2013), kde nízkoriziková pacientů MDS s normálním chromozomem 5 a s G v uvedené poloze – 29 lépe odpovídají na působení lenalidomidu. Nízkoriziková pacientů MDS s del(5q), kteří dle všech dosud provedených studií lépe odpovídají na terapii lenalidomidem než nízkoriziková pacientů MDS s chromozomem 5 bez delece dlouhých ramen totiž mají v námi analyzované skupině větší zastoupení A v uvedené poloze. Naopak na terapii lenalidomidem nereagoval jediný homozygot na G v uvedené poloze v naší analyzované skupině 44 nízkorizikových pacientů MDS s del(5q). Podpořeno grantem IGA MZ ČR NT/13836-4/2012 a projektem MZ ČR na koncepční rozvoj vědecké organizace (23736; ÚHKT Praha).

P18/2565.

Mutace v genu pro CALRETICULIN: nový marker esenciální trombocytémie a primární myelofibrózy
Navrátilová J., Divoká M., Palová M., Hluší A., Pospíšilová D., Kučerová J., Indrák K. (HOK, FN, Olomouc; Ústav biologie, LF UP, Olomouc; Dětská klinika, FN a LF, Olomouc)

Role mutace JAK2 V617F v etiopatogenezi myeloproliferativních neoplázií (MPN) je dobře známa. Donedávna zde však byla významná skupina JAK2-negativních (JAK2-neg.) esenciálních trombocytémii (ET) a primárních myelofibróz (PMF) s neznámou molekulární etiologií. Klampfl et al., 2013 a Nangalia et al., 2013 nedávno popsali, že většina těchto JAK2-neg. MPN nemocných je charakterizována somatickou mutací v genu CALR pro calreticulin. Calreticulin je protein endoplasmatického retikula s chaperonovou aktivitou, má Ca²⁺ vazebnou kapacitu a podílí se na regulaci signální transdukce a buněčné adheze. Přestože byla jeho role dlouho studována i u nádorů, objevení mutace CALR u MPN bylo překvapující. Bylo popsáno, že mutace charakteru krátké inserce/delece (ins/del) v exonu 9 CALR se nachází v 70 % JAK2-neg. ET a u 60–80 % nemocných s JAK2-neg. PMF. Cílem bylo zavést metodu pro stanovení mutace CALR u JAK2 neg. MPN a její zavedení do klinické praxe. Na mutaci v genu pro CALR bylo testováno 35 dospělých s diagnózou ET, PMF a nespecifikované MPN a 10 dětí s diagnózou ET. Vyšetřovaným materiálem byla leukocytární DNA. U všech pacientů byla alelově specifickou PCR (AS-PCR) potvrzena nepřítomnost mutace v genu JAK2. Pro detekci ins/del mutací v exonu 9 CALR byla zvolena jednkolová PCR s fluorescenčně značenými primery (Chi et al., 2013) s následnou fragmentační analýzou PCR produktu. Posunuté mutace byly následně potvrzeny pomocí Sangerova sekvenování (Klampfl et al., 2013). Ze 14 dospělých pacientů s ET byla nalezena ins/del mutace u 7. Tři ET pacienti nesli mutaci typu 52-bp delece a 4 měli pozitivní nález inserce. Z 11 pacientů s diagnostikovanou PMF neslo mutaci 9 , 7 deleční a 2 vykazovali mutaci inserční. U 10 pacientů s nespecifikovanou MPN byla mutace v CALR prokázána u 8. U ET v dětském věku nebyla mutace v genu CALR detekována. U dospělých pacientů MPN byl testován pouze malý soubor JAK2-neg. nemocných, nicméně první výsledky na zastoupení somatické mutace v genu CALR se shodují se studii zahraničních autorů. Molekulární analýzou individuálních progenitorů u vzácné formy dětské ET jsme dříve prokázali, že přestože jsou vesměs JAK2 V617F negativní na úrovni periferní krve, mohou mít ojediněle homozygotní nebo heterozygotní JAK2-positivní erytroidní progenitory. Mutační analýza v CALR dále naznačila, že dětská a dospělá forma ET můžou reprezentovat odlišná stádia JAK2-neg. MPN. Podporováno IGA MZČR NT13587-4, IGA_LF_2014_011 a IGA_LF_2014_001

P19/2562.

Využití metody Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) v diagnostice myelodysplastického syndrómu

Lukačková R., Hanušovská E., Tóthová K., Blahová A., Pavlíková G., Lengyelová K., Tomášová R., Chorvátová L., Hojsíková I. (Oddělení klinické genetiky, Medirex, a.s., Bratislava – SVK)

Myelodysplastický syndróm (MDS) predstavuje heterogénnu skupinu hematologických ochorení, charakterizovanú inefektívnou a dysplastickou hematopoézou. Ide najmä o mutácie génov s nasledujúcou abnormálnou expresiou onkogénov a antionkogénov, dôsledkom čoho vzniká deregulácia proliferácie a apoptózy krvných progenitorov. Diagnostika MDS je zložitá. U novo diagnostikovaných pacientov je prítomných až 30–50% klonálnych chromozómových abnormalít. Najčastejšie sú postihnuté chromozómy 5, 7, 8, 11, 20,21 a Y. Veľmi dôležitú úlohu zohráva pri potvrdení diagnózy analýza karyotypu pomocou klasickej cytogenetiky, ktorá má však mnoho technických limitácií. Obrovský prínos vo výskume leukémii priniesla fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH). V súčasnej dobe sa do rutínnej diagnostiky čoraz častejšie zavádzajú nové molekulové metódy, ktoré zachytia chromozómové abnormality s rozsahom pod detekčnou hranicou klasickej cytogenetickej analýzy. Metódou voľby na sledovanie prítomnosti strát a ziskov genetického materiálu na chromozómoch sa ukázala MLPA (Multiplex-dependent Probe Amplification). V jednej reakcii je možné analyzovať 40–50 génov. V skutočnosti MLPA nie je schopná detegovať translokácie chromozómov, je schopná odhalit chromozómové abnormality iba v prípade, že percento patologických buniek presahuje 30–35%. Na druhej strane je táto analýza vhodná pri neúspešnej cytogenetickej analýze. Výhodou tejto techniky je simultánna analýza viacerých vzoriek, rýchlosť a nízke vstupné náklady. Na sledovanie minimálnej reziduálnej choroby (MRD) u pacientov je vhodné sledovanie hladiny expície génu WT1. Metódy molekulovej biológie a cytogenetiky sa v dnešnej dobe kombinujú. Hlavným cieľom predloženej práce je poukázať na dôležitosť metódy MLPA pri stanovovaní správnej diagnózy, porovnať koreláciu cytogenetickej a MLPA nálezov a následne sledovať koreláciu expície WT1 génu s chromozómovými aberáciami, určiť postupnosť použitia jednotlivých molekulovo-cytogenetickej metód pri diagnostike pacientov s MDS.

P20/2532.

Monitorovanie rezistencie na tyrozínkinázové inhibítory u CML pacientov

Hanušová E., Majerová L., Lukačková R., Flimelová K., Tóthová K., Sninská Z. (Klinická genetika, Medirex, a.s., Bratislava – SVK; Klinika hematológie a transfuziológie, Univerzitná nemocnica, Bratislava – SVK)

Chronická myeloická leukémia (CML) je charakterizovaná fúznym génom BCR-ABL1, ktorého expresiou vzniká konštitutívne aktívna tyrozínkináza BCR-ABL. Disregulácia proliferácie a apoptózy vedie k masívnemu nárastu počtu myelických buniek. BCR-ABL proteín sa stal ideálnym cieľom pre malé molekuly: tyrozínkinázové inhibítory (TKI), ktoré blokujú väzbu ATP, alebo substrátu do kinázovej domény (KD) tyrozínkinázy a vedú k inhibícii bunkového rastu. Napriek tomu sa objavuje primárna (neúčinnosť od začiatku) aj sekundárna rezistencia na liečbu. Najbežnejší mechanizmus sekundárnej rezistencie je reaktivácia BCR-ABL kinázovej aktivity v leukemických bunkách napriek prítomnosti liečiva. I keď rezistencia môže byť zapríčinená zvýšeným efluxom liečiva P-glykoproteínom (nadexpresia MDR1 génu), kyslým glykoproteínom, (AGP v plazme), organickým kationovým transportérom (OCT), za najdôležitejší mechanizmus získanej rezistencie sa považujú bodové mutácie v kinázovej doméne BCR-ABL1 génu, jeho amplifikácie a väčšie reorganizácie fúzneho génu. Monitoring pacientov liečených s TKI je založený na meraní hladiny fúzných transkriptov BCR-ABL1 kvantitatívnou reverznou Real Time PCR vo vzorkách periférnej krvi pacienta. V prípade vzrastu BCR-ABL transkriptov (potvrdeného 2-násobného vzrastu v 2 nasledujúcich vyšetreniach), prípadne straty MMR (0,1%IS) hocikedy, alebo pri suboptimálnej odpovedi v určenom časovom horizonte sa odporučuje analyzovať mutačný status kinázovej domény BCR-ABL priamym sekvenovaním. V súbore 329 CML pacientov liečených v 1. línii imatinibom, 23% nedosiahlo v 18. mesiaci optimálnu liečebnú odpoveď, resp. došlo k molekulovému relapsu. Analýzou KD-BCR-ABL sme detekovali 28 mutácií. Vysoko rezistentná mutácia T315I sa u rezistentných klonov potvrdila 5x. Zistená delécia exónu7 v ABL1 géne v Ph+ aj Ph- bunkách je výsledok alternatívneho zstrihu mRNA a nie je spojená s rezistenciou na TKI, ako sa pôvodne predpokladalo. Monitorovanie odpovede CML pacienta na liečbu s TKI je dôležité pre správny manažment pacienta a v prípade zistenej rezistencie je signálom pre zmenu liečby na TKI druhej, alebo tretej generácie, prípadne podstúpenie alogénnej transplantácie krvotvornými bunkami.

P21/2652.

Metabolite profiling of leukocytes from patients with chronic myeloid leukemia

Župková M., Karlíková R., Mičková K., Galoczová M., Janečková H., Friedecký D., Faber E., Adam T. (Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and Faculty Hospital, Olomouc; Laboratory for Inherited Metabolic Disorders, Institute of Molecular and Translational Medicine, Olomouc; Dept. Hemato-Oncology, Faculty Hospital, Olomouc)

Background: Metabolite profiling refers to the interpretation of information-rich data with the aim to understand metabolic processes. The goal of this work was to examine the influence of tyrosine kinase inhibitor on the metabolite profiling of leukocytes from chronic myeloid leukemia (CML) patients. Material and method: Leukocytes from healthy controls (n=10), patients before treatment (n=9), treated with hydroxyurea (n=5), imatinib (n=24), dasatinib (n=8) and nilotinib (n=10) were isolated from whole blood and metabolites were extracted by the chloroform/methanol/water mixture. Analysis of 400 metabolites was performed using high performance liquid chromatography (Ultimate 3000, Dionex) coupled with tandem mass spectrometry (QTRAP 5500, AB Sciex). Metabolites were detected using multiple reaction monitoring in positive and negative mode, quantified using MultiQuant 3.0 software and statistically evaluated in R programme language with statistics packages. **Results and discussion:** Total 171 metabolites were identified on the basis of its transition and retention time in all leukocyte samples. Significant changes in metabolic pathways were found. Both unsupervised and supervised statistic methods (PCA, PLS-DA, OPLS-DA, cluster analysis) separated all the studied groups.

Conclusion: In this study metabolome of human leukocytes was defined and changes of metabolite levels were observed in all groups of patients compared to healthy controls.

Acknowledgements: grants IGA MH NT12218, CZ.1.05/2.1.00/01.0030, LF UP 001-2014.

P22/2651.

Vedení těhotenství u pacientek s chronickou myeloidní leukémií (CML) – reference z 1 centra Skoumalová I., Faber E., Rohoň P., Kuba A., Divoká M., Holzerová M., Jarošová M., Indrák K., Procházková M. (HOK, FN, Olomouc; Porodnicko-gynekologická klinika, FN, Olomouc)

Celkové přežití nemocných s CML po 9 letech sledování je 84–93%. Díky dobré kvalitě života nemocných žen je častěji řešena otázka těhotenství (jen malé procento žen je v reprodukčním věku). Prevalence těhotenství nemocných s CML je 1/100 000 těhotenství. Předmětem našeho sdělení je monitorace a terapie těhotných pacientek s CML. První pacientka *1/1977; diagnóza stanovena (dg.) 12/1998, nízké riziko dle Sokala (nrS), léčena interferonem (INF), imatinibem (IM) s dosažením kompletní cytogenetické (CCR) a velké molekulární odpovědi (MMR) 7/2004. Těhotenství 2005. Nemocná oznámila graviditu ve 4. měsíci, i přes řádné poučení užívala IM, dále nasazen INF. Porod zdravého chlapce 7/2005. CCR po graviditě 1/2007, MMR 7/2008. Další nemocná *6/79; dg. CML 6/2002, nrS, diagnosa během těhotenství – UPT v 7. týdnu. Terapie INF, přechodně MCR. Pro cytogenetickou progresi IM s dosažením CCR 11/2004, kdy současně IM vysazen pro plánovanou graviditu. Během gravidity léčba INF, porod zdravého chlapce císařským řezem 5/2006. Následně léčena IM s dosažením CCR 12/2007, CMR 6/2007. Od roku 2009 opakovaně neúspěšné pokusy o graviditu, úspěch až 12/2013 po přerušení IM od 10/2013 (dvojčata po embryotransferu i), aktuálně neléčena. Třetí nemocná *9/79; dg. CML 11/2006, Sokal střední riziko (srS), komplexní translokace t(9;22;3) – dg. během gravidity, terapie leukaferézami a INF. Porod zdravého chlapce 7/2007. Po porodu IM 600 mg, 800 mg. Pro suboptimální CR dasatinib (DA) 100 mg od 1/2009 s dosažením CCR 4/2009, MMR 3/2010. DA přerušen týdn po koncepci 5/2012. Léčena INF se ztrátou CR, porod zdravého chlapce 1/2014. DA do terapie 4/2014 s dosažením MMR 11/2013. Čtvrtá nemocná *7/83; dg. CML 6/2013 po proběhlém těhotenství během něhož jen trombocytémie, nrS. Porod zdravého dítěte 12/2012. Terapie IM 400 mg s dosažením CCR a MMR 9/2013. Aktuálně 2. (neplánované) těhotenství (IM přerušen ihned při podezření na graviditu) zatím bez terapie. Poslední nemocná *10/77; dg. CML 2/2011 po abortu v 7. týdnu, srS. Provedena leukaferéza, dále IM 400 mg, CCR 5/2011, MMR 9/2011. IM ex pro pokus o další těhotenství, aktuálně těhotná, INF od 15. týdne.

Závěr: příklady našich nemocných dokládají možnosti úspěšného a bezpečného průběhu těhotenství s narozením zdravých dětí. V našem přístupu je snaha ponechat nemocné v graviditě bez léčby, resp. podávat INF s cílem zabránit hematologickému relapsu CML. Velkou důležitost má citlivá a adekvátní informace pacientek.

Podpořeno grantem IGA-LF-2014-001.

P23/2558.

Overcoming tyrosine kinase inhibitors (TKIs) resistance with interferon-alfa (INF-α) in high-risk chronic myeloid leukemia (CML) Patients

Kuba A., Faber E., Divoká M., Rohoň P., Jarosova M., Indrak K. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Background: TKIs have become a golden standard in current treatment of CML. TKIs resistance is one of the major causes of treatment failure. Reports of complete cytogenetic response (CCyR) and complete molecular response (CMR) after INF-α associated with excellent long-term prognosis have been published. We report 3 high-risk (HR) CML patients treated with INF-α alone or in combination with TKI to successfully overcome TKI resistance.

Results: 1. 44-year-old male HR CML patient was treated with imatinib for 34 months achieving only partial cytogenetic response. The patient was switched to dasatinib achieving major molecular response (MMR), nevertheless T315I mutation was detected shortly after 8 months of therapy. INF-α was initiated immediately. First CMR was achieved in 17 months. Since then the patient has maintained fluctuating MR between MMR and CMR and has continued INF-α for more than 60 months. 2. 59-year-old female HR CML patient was diagnosed in the accelerated phase with additional cytogenetic abnormalities. After initial cytoreduction imatinib was started at maximum tolerated doses for 19 months and CCyR and MMR were achieved, however cytogenetical relapse occurred after 17 months and mutation M351T was detected. The patient was switched to dasatinib reaching CCyR and MMR. After 22 months on dasatinib bcr-abl transcript levels started increasing and M351T and F317L mutations were revealed. The patient's therapy was changed to nilotinib and after 3 months of solo nilotinib therapy INF-α was added at minimal doses maintaining the patient in MMR for 12 months and achieving CMR after 13th month

of treatment. 3. 39-year-old male HR CML patient was diagnosed in the accelerated phase. The patient was treated with imatinib for 3 years. However, CCyR was achieved and maintained for 2 years. Then, cytogenetical relapse occurred and the patient was switched to dasatinib. Mutation T315I was detected after 5 months of treatment. INF- α was started and clearance of the mutated clone followed. At the same time increase in bcr-abl transcript levels was observed and thus nilotinib was added to INF- α . A significant decline of bcr-abl transcript was noted after two months of treatment.

Conclusions: Our clinical cases demonstrate the usefulness and safety of INF- α even in HR CML patients harboring TKI resistant mutations including T315I mutation when bone marrow transplantation cannot be performed.

Supported by the grant IGA-LF-2014-001.

P24/2528.

Lower dosage of imatinib (IM) is sufficient to maintain complete molecular response (CMR) in chronic myeloid leukemia (CML) patients with long-term toxicity of the treatment

Faber E., Skoumalová I., Marešová I., Divoká M., Mičová K., Friedecký D., Adam T., Jarošová M., Indrák K. (Department of Hemato-Oncology, Faculty Hospital Olomouc, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc; Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacký University, Olomouc; Institute of Molecular and Translational Medicine, Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Chemistry, Faculty Hospital Olomouc, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc)

Background: Continuation with IM is currently the recommended strategy in all patients (pat.) with CML and optimal treatment response. About 30% of pat. may have problems with long-term side-effects. Information about the response in pat. with complete molecular response (CMR) after IM in whom the dose should have been reduced to relieve from toxicity is insufficient. Aim: Safety and efficacy of IM dose reduction in pat. with toxicity and CMR was assessed retrospectively. Patients: 61 (29.8%) of 205 pat. treated with IM have achieved CMR. In 19 of them (31.2%; 13 females and 6 males aged 20–71; average m=47 years) the dose of IM was reduced due to toxicity. Sokal score was low in 9, intermediate and high in 4 each and in 2 pat. unknown. Pat. achieved MMR and CMR after average 13.3 and 27.7 months respectively. Duration of CMR before dose reduction was 16–123 (m=56.7) months. Reasons for the dose reduction were fluid retention, eye-lid swelling, hemorrhage into conjunctiva, hematologic toxicity, muscle cramps, dyspepsia and complications after surgery. Dose reduction was strictly individualized: in 3 pat. IM was interrupted, 9 pat. received 400mg once to five times a week, 6 pat. 300mg three times weekly to daily and one pat. was treated with 200mg of IM daily.

Results: After average observation of 37 (9–84) months CMR has been maintained in 13 (68.4%) pat.: in three of them with single elevations of BCR-ABL level to MMR. In two other pat. the response fluctuated between CMR and MMR while continuation with lower dose. Three pat. have lost CMR: one re-achieved it on full-dose IM, two maintain MMR on standard or lower dosage. Only one pat. has lost MMR after interruption of treatment: CMR was gained after standard dose of IM and is maintained on lower dose. In each pat. toxicity of the therapy was ameliorated during lower dosage. Even during intermittent treatment pat. were able to achieve comparable IM plasma levels with those achieved on previous standard therapy.

Conclusion: CMR has been maintained in 90 % of our pat. with CML suffering from long-term toxicity of IM using lower dosage regimens. Remaining 2 pat. have maintained MMR. Lower dose of IM have lead to reduction of side-effects and cost and may be used for the pat. who relapse after stopping of IM in CMR. Prospective trials are necessary in order to confirm efficacy and safety of this strategy.

Acknowledgements: Supported by grants IGA MZ ČR NT12218-4/2011 and UP LF-001-2014 and 2013-010.

P25/ 2548.

Transplantácie periférnych krvotvorných buniek pri CML v ére inhibítorov tyrozínkinázy

Sninská Z., Hatalová A., Bojtárová E., Mistrík M., Bátorová A. (KHaT LFUK, SZU a UN, Bratislava – SVK)

Transplantácia krvotvorných buniek pri CML predstavuje aj v súčasnosti v ére modernej cieľovej molekulej liečby jedinou kuratívnu metódu, aj za cenu jej pomerne veľkej toxicity a mortality. Počet transplantovaných pacientov z tejto indikácie v posledných rokoch výrazne klesá, vzhľadom na použitie inhibítorov tyrozínkinázy v prvolíniovej liečbe. Alogénna transplantácia pri CML je v súčasnosti zvažovaná u mladých pacientov, s vysokým rizikom podľa Sokala, Hasforda alebo EUTOS, s nízkym transplantačným rizikom podľa EBMT a s dostupným HLA zhodným súrodeňeckým alebo nepríbuzenským darcom. Pri zlyhaní liečby všetkými inhibítormi tyrozínkinázy, pri progresii ochorenia do blastovej fázy a predovšetkým u pacientov s dokázanou mutáciou T315I by transplantácia mala byť metódou voľby. V akcelerovanej a blastickej fáze sa odporúča navodiť čo najlepšiu cytogenetickú odpoveď inhibítormi tyrozínkinázy a v tejto fáze uskutočniť transplantáciu s myeloablätívnym prípravným režimom. Na Klinike hematológie a transfuziológie LF UK, SZU a UN v Bratislave sme v období od 1.1.2011 do 31.12.2013 uskutočnili alogénnu transplantáciu u 4 pacientov (1 žena) s CML vo veku 36–55 rokov. Interval od stanovenia diagnózy do transplantácie bol 16–124 mesiacov. Všetci pac. boli pred transplantáciou liečení inhibítormi tyrozínkinázy 1. aj 2. generácie. 3 z nich boli transplantovaní v chronickej fáze, 1 pac. po podaní ICHT podľa protokolu GMALL po lymfoblastovom zvrate. U 2 pac. bola potvrdená mutácia T315I. U 3 pac. sme zrealizovali nepríbuzenskú, u 1 príbuzenskú transplantáciu. V rámci prípravného režimu bola u 1 pac. podaná schéma BuCy (v prípade príbuzenskej transplantácie), u 2 pac. BuCy+ATG a u 1 pacienta TBI+Cy+ATG. Zdrojom krvotvorných buniek boli u všetkých pacientov periférne krvotvorné bunky. Zhoda v pohlaví bola u 2 pacientov. AB0 kompatibilita bola u 1, AB0 malá inkompatibilita u 2 a veľká u 1 pacienta. Regeneráciu hemopoézy sme zaznamenali nasledovne: vzostup Le nad 1x10⁹/l deň 16–22, vzostup Tr nad 50x10⁹/l deň 14–21. Pacienti boli prepustení domov na 21.–33.deň po transplantácii. U žiadneho pacienta sa nevyskytla akútna ani chronická GvHD. Všetci pacienti žijú, dĺžka sledovania po transplantácii je 28–32 mesiacov. 3 pac. sú v remisii, u 1 pac. s lymfoblastovým zvratom prišlo po 15 mesiacoch k relapsu ochorenia. Správne indikovaná a správne načasovaná transplantácia predstavuje potenciálne kuratívny postup u pacientov po zlyhaní predchádzajúcich liečebných možností.

P26/2527.

Alogenní transplantace krvotvorných kmenových buněk u pacientů s primární myelofibrózou - zkušenosti jednoho centra

Palová M., Szotkowski T., Raida L., Indrák K., Szotkowská R. (HOK, FN, Olomouc)

Úvod: Primární myelofibróza patří do skupiny chronických Ph-negativních myeloproliferativních chorob spolu s esenciální trombocytémií a pravou polycytemií, které ve svém průběhu také mohou přecházet do fibrotického stadia. Prognóza myelofibrózy je u středně a vysoce rizikových pacientů značně nepříznivá. Transplantační přístup provázený vysokou mortalitou a morbiditou je v současnosti stále jedinou potenciálně kurativní modalitou.

Pacienti a metody: Retrospektivní analýza výsledků alogenní transplantace krvotvorných buněk 4 pacientů s primární myelofibrózou (n=3) nebo post-PV myelofibrózou (n=1), JAK2V617F pozitivních, provedených v letech 2008–2012. V době transplantace byli nemocní ve vyšším středním (n=2) nebo vysokém (n=2) riziku dle DIPSS skóre ve věku 34, 40, 50, 61 let, čas od diagnózy se pohyboval v rozsahu 1,5 roku až 7 let. Tři pacienti dostali v přípravě režim s redukovanou intenzitou, jehož základem byl fludarabin v kombinaci s busulfanem (n=2) nebo melfalanem (n=1), doplněný thymoglobulinem. 1 pacient byl před ASCT indikován k nízké dávkované radioterapii sleziny, 1 ke splenektomii pro traumatickou rupturu. Transplantovány byly alogenní kmenové krvotvorné buňky z kostní dřeně (n=1) nebo periferní krve (n=3). V 1 případě byl dárcem HLA identický příbuzný dárc, 3 nemocní byli transplantováni od HLA-identického nepříbuzného dárc. Profylaxe reakce štetu proti hostiteli (GvHD) byla zajištěna cyklosporinem A (n=3), nebo v kombinaci s mykofenolát mofetilem (n=1).

Výsledky: U všech pacientů došlo k přijetí štetu s mediánem vzestupu neutrofilních granulocytů $\geq 0,5 \times 10^9/l$ 14 dní (13–28), trombocytů $\geq 20 \times 10^9/l$ 20dní (18–30). U všech pacientů bylo dosaženo negativity JAK2, parciální regrese splenomegalie, transfuzní nezávislosti. Vývoj buněčného chimerismu byl monitorován v populaci jaderných buněk periferní krve, u všech bylo dosaženo chimerismu nad 99%, u 1 pacienta se smíšenou chimérou po infúzi dárcovských lymfocytů (DLI). K rozvoji akutní GvHD II. – IV. stupně došlo u 2 pacientů s přechodem do chronické GvHD. Příčinou smrti 1

pacienta bylo krvácení do mozku při těžké imunitní trombocytopenii. Tři pacienti žijí 11–70 měsíců po transplantaci krvetvorných buněk.

Závěr: Alogenní transplantace kostní dřeně může vést u pacientů s myelofibrózou k delšímu přežívání bez relapsu/progrese choroby. Režimy s redukcí intenzitou mohou být alternativou pro nemocné vyššího věku nebo s komorbiditou.

P27/2549.

Efekt léčby ruxolitiniibem u pacientů s primární myelofibrózou

Nosál M., Mistrík M., Babál P., Copáková L. (KHaT LFUK, UNB, SZU, Nem.sv.Cyrila a Metoda, Bratislava – SVK; Nemocnica – Staré Mesto, UNB, Bratislava – SVK; ÚPA LFUK, Bratislava – SVK; NOU, Bratislava – SVK)

Úvod: V súčasnej dobe sa predpokladá, že primárna myelofibróza (PMF) vzniká zo získaných mutácií, ktoré sú namierené na hemopoetickú kmeňovú bunku a spôsobuje dysreguláciu kinázovej signalizácie, klonálnu myeloproliferačnú a abnormálnu cytokinovú expresiu. Tieto patogenetické procesy sú nezávislé a tiež sa samostatne podieľajú na fenotype choroby-stromálne zmeny kostnej drene, na extramedulárnej hemopoéze, inefektívnej erytropoéze a konštitučných symptómoch. Liek ruxolitiniib – je JAK1/JAK2 inhibítor, ktorý pre pacientov s PMF predstavuje významný klinický prínos. Metoda: Uvádžame dva prípady pacientov. 74 ročný pacient, u ktorého sa v roku 2007 diagnostikovala PV, potvrdená histologicky, bez fibrózy kostnej drene. JAK2 V617F negat., s hraničnou splenomegáliou. Liečba: venepunkcie, opakované erytrocytoférezy, HYU, intolerancia INF-a pre flulike sy. Postupný nárast splenomegálie z 15x7x8 cm v XII/2012 po umbilikus, potvrdená USG. Opakované histologické vyšetrenie XII/2012 potvrdilo PV s fibrózou k.d. I.st. JAK2 exón 12 pozit. V III/2013 zahájená liečba Ruxolitiniibom 2x15 mg p.o. Po mesiaci liečby regresia lienu na USG 15.0x5.7 cm, úprava hodnôt ČKO, bez Leuko a Tr-pénie. Prechodná progresia splenomegálie s dyskomfortom v dutine brušnej po asi mesačnom prerušení liečby z dôvodu neschálenia lieku ZP. Po opätovnom nasadení liečby Jakavi v dávke 2x15 mg regresia sleziny s ústupom bolesti v oblasti lienu. Druhý pacient 63 ročný, v X/2012 sme diagnostikovali primárnu myelofibrózu JAK2 V617F pozit. Spočiatku bez hepatosplenomegálie, ktorá sa objavila až v IX/2013. Od začiatku prítomná anémia stredne ťažkého stupňa, podaný ESA(Aranesp 300 ug 6 inj.v dvoch cykloch). Na tretíkrát schválená liečba ruxolitiniibom 2x20 mg, ktorú sme začali II/2014. Pacient liečbu toleruje dobre, postupne ustupujú bolesti v oblasti lienu a dyskomfort v dutine brušnej.

Záver: PMF je choroba s mnohými molekulovými znakmi. V súčasnej dobe kuratívnu metódou je alloTKB. JAK2 inhibítory vedú k regresii lienu, ale samotné nemusia predstavovať dostatočnú liečebnú možnosť, v kombinácii s inými liekmi (napr. INF- α , statiny, HDAC-inhibítory, hydroxyurea) sa očakáva ich dlhodobý liečebný účinok.

MNOHOČETNÝ MYELOM

P28/2627.

Imunitní paréza u MGUS – vztah suprese alternativního páru imunoglobulinu a hladin polyklonálních imunoglobulinů k rizikosti MGUS

Pika T., Lochman P., Maisnar V., Šolcová L., Tichý M., Zapletalová J., Minařík J., Hájek R., Ščudla V. (III. interní klinika-NRE, FN, Olomouc; Oddělení klinické biochemie, FN, Olomouc; IV. interní klinika – oddělení klinické hematologie, FN, Hradec Králové; Oddělení klinické biochemie, Oblastní nemocnice, a.s., Trutnov; Ústav klinické biochemie a diagnostiky, FN, Hradec Králové; Ústav lékařské biofyziky a statistiky, LF UP, Olomouc; Klinika hematologie, LF OU a FN, Ostrava)

Úvod: Monoklonální gamapatie nejistého významu (MGUS) je potenciálně maligní stav charakterizovaný nezhoubnou klonální proliferací plazmatických buněk secernujících monoklonální imunoglobulin. Mezi známé faktory určující míru rizika maligní progrese patří kvantita, typ M-proteinu a poměr volných lehkých řetězců imunoglobulinu (VLŘ) umožňující stratifikaci jedinců s MGUS. Někteří autoři pokládají i za možný faktor progrese přítomnou supresi hladin polyklonálních imunoglobulinů (Plg). Cíl: Cílem studie bylo provedení porovnání hladin Plg a hladin alternativního páru těžkých/lehkých řetězců (HLC) s cílem ověření stupně imunitní parézy v závislosti na rizikosti MGUS.

Metody: Sestava zahrnovala 159 vzorků sér od jedinců s MGUS (102 IgG, 57 IgA), kteří byli v závislosti na hladinách, typu M-proteinu a indexu VLŘ stratifikováni do 4 rizikových skupin (nízké, nízké střední, vysoké-střední a vysoké riziko transformace). Pro stanovení hladin VLŘ, Plg a HLC bylo využito turbidimetru SPAplus.

Výsledky: Porovnáním míry suprese Plg u rizikových tříd u IgG MGUS byly zjištěny vyšší hladiny IgA u jedinců s nízkým resp. nízkým středním rizikem ve srovnání se skupinou s vysokým středním rizikem ($p=0,0001$ resp. $p=0,047$). Při porovnání hladin alternativních HLC párů mezi rizikovými skupinami byly u jedinců s dominantní sekrecí IgG κ resp. IgG λ zjištěny vyšší hladiny alternativního páru IgG λ resp. IgG κ ve skupinách nízkého a nízkého středního rizika nežli ve skupině vysokého středního rizika ($p=0,003$ a $p=0,006$ resp. $p=0,0006$ a $p=0,009$). Při analýze skupiny MGUS s IgA izotypem byly zjištěny ve skupinách s nízkým středním a vyšším středním rizikem vyšší hladiny IgG resp. IgM nežli u jedinců s vysokým rizikem ($p=0,0003$ a $p=0,03$ resp. $p=0,0002$ a $p=0,024$). Při porovnání hladin alternativních HLC párů byly u jedinců se sekrecí IgA κ zjištěny vyšší hladiny alternativního páru IgA λ ve skupině nízkého středního a vysokého středního rizika nežli ve skupině vysokého rizika ($p=0,01$ resp. $p=0,009$). V případě dominantní sekrece IgA λ byly zjištěny vyšší hladiny IgA κ u jedinců s nízkým středním rizikem nežli ve skupině s vysokým rizikem ($p=0,005$).

Závěr: Odhalená souvislost míry imunoprese v závislosti na rizikosti MGUS a zejména jasně patrný přínos stanovení alternativního HLC páru přináší další aspekt k pochopení souvislosti biologie, chování a případné maligní evoluce MGUS s výhodou získání dobře měřitelného parametru. S podporou grantu NT 12451/5, NT 14400 a fy The Binding Site.

P29/2618.

Vztah vybraných ukazatelů mikroprostředí kostní dřeně k celkovému přežití u nemocných s mnohočetným myelomem

Minařík J., Golová Z., Petrová P., Bačovský J., Pika T., Zapletalová J., Ščudla V. (III. interní klinika-NRE, FN a UP, Olomouc; Student SVOČ, LF UP, Olomouc; Oddělení klinické biochemie, FN a UP, Olomouc; Ústav lékařské biofyziky, FN a UP, Olomouc)

Úvod: Myelomová kostní nemoc (MKN) je závažným projevem mnohočetného myelomu (MM). Je ovlivňována řadou parametrů souvisejících s mikroprostředím kostní dřeně, z nichž mnohé byly identifikovány jako prognostické faktory MM. Cílem našeho hodnocení bylo posoudit vztah sérových hladin vybraných ukazatelů k době do progrese a celkovému přežití.

Pacienti a metody: Ve skupině 52 nemocných s MM jsme posuzovali sérové hladiny 6 vybraných parametrů – hepacytárního růstového faktoru (HGF), syndekanu-1 (SYN), osteopontinu (OPN), makrofágového inhibičního proteinu 1 α a 1 β (MIP-1 α , MIP-1 β), osteoprotegerinu (OPG) a endostatínu (END). Ukazatele byly hodnoceny ve vztahu k celkovému přežití (OS), době do progrese (TTP) a trvání remise (DOR). Nemocní byli léčeni chemoterapií s novými půsokby (thalidomid, bortezomib a lenalidomid) a s pomocí vysokodávkované chemoterapie s podporou autologní transplantace periferních kmenových buněk.

Výsledky: Významný vztah k OS byl prokázán u HGF ($p = 0,042$), OPN ($p = 0,006$) a OPG ($p = 0,029$). Následně byly vytvořeny ROC křivky k nalezení optimální „cut-off“ hodnoty. Pro HGF byla optimální hodnota 1919 ng/l. Nemocní s HGF < 1919ng/l měli významně delší OS než nemocní s HGF \geq 1919ng/l (medián 6,6 vs 3,1 let, $p = 0,001$). V případě OPN, byla optimální hladina 97 ug/l. Nemocní s příznivou prognózou měli OPN < 97 ug/l, zatímco jedinci s nepříznivou prognózou měli OPN \geq 97 ug/l (medián 8,0 vs 2,9 let, $p < 0,0001$). V případě OPG byla optimální hodnota 5,2 pmol/l. Nemocní s OPG < 5,2 pmol/l měli příznivou prognózu oproti jedincům s OPG \geq 5,2 pmol/l (medián 6,1 vs 3,6 let, $p = 0,015$). Ve vztahu k TTP a DOR nebyl u žádného z ukazatelů nalezen významný rozdíl. Pomocí logistické regrese a Coxovy regresní analýzy byl vytvořen model pro krátké přežití. Významnými prediktory krátkého přežití byly OPN \geq 101 ug/l a OPG \geq 5,2 pmol/l. Hladina OPN \geq 101 ug/l významně zvyšovala riziko nepříznivé prognózy 5,3 násobně (95%CI: 1,4–19,9; $p = 0,013$). Hladina OPG \geq 5,2 pmol/l zvyšovala riziko nepříznivé prognózy 4,3 násobně (95%CI: 1,2–16,2; $p = 0,030$).

Závěr: Hodnocení sérových hladin ukazatelů mikroprostředí kostní dřeně přispívá k bližšímu chopení biologických mechanismů u jedinců s MM. Naše analýza odhalila 3 prognosticky významné ukazatele – jedinci s MM, u nichž byla zjištěna vysoká sérová hladina HGF, OPN či OPG, měli významně horší prognózu bez ohledu na použité léčebné schéma. Za podpory grantů IGA MZ CR NT 14393, NT14400, NT12451-5 a NT12215-4.

P30/2617.

Posouzení vztahu sérových hladin Dickkopf-1 k vybraným ukazatelům mikroprostředí kostní dřeně a k prognóze u nemocných s mnohočetným myelomem

Minařík J., Petrová P., Bačovský J., Pika T., Zapletalová J., Ščudla V. (III. interní klinika-NRE, FN a UP, Olomouc; Student SVOČ, LF UP, Olomouc; Oddělení klinické biochemie, FN a UP, Olomouc; Ústav lékařské biofyziky, FN a UP, Olomouc)

Úvod: Glykoprotein Dickkopf-1 (DKK-1) je jedním z klíčových parametrů homeostázy kostního metabolismu. U nemocných s mnohočetným myelomem (MM) bývá exprimován ve zvýšené míře a vede k rozvoji myelomové kostní nemoci (MKN) inhibicí signální dráhy Wnt, čímž inhibuje osteoblastickou formaci a aktivuje osteoklastickou destrukci kostní tkáně. Cílem našeho hodnocení bylo porovnat vztah sérových hladin DKK-1 k vybraným ukazatelům mikroprostředí kostní dřeně a posoudit též jejich prognostický potenciál u jedinců s MM.

Pacienti a metody: Ve skupině 128 nemocných s MM jsme posuzovali sérové hladiny DKK-1 ve vztahu k prognóze a k sérovým hladinám thymidinkinázy (TK), osteokalcinu (OC), kostní frakce alkalické fosfatázy (bALP), parathormonu (PTH), C-terminálního telopeptidu kolagenu typu I (ICTP), N-terminálního prokolagenu typu I (PINP), inzulínu podobného růstového faktoru 1 (IGF-1), hepatocytárního růstového faktoru (HGF), receptoru pro interleukin-6 (IL-6R), syndekanu-1 (SYN), vasikulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), osteoprotegerinu (OPG), endostatínu (END), makrofágového inhibičního proteinu 1 α a 1 β (MIP-1 α , MIP-1 β), a angiogeninu (ANG).

Výsledky: Pomocí Spearmanovy korelační analýzy byl zjištěn slabý signifikantní vztah mezi sérovými hladinami DKK-1 a TK ($r = 0,274$; $p = 0,045$); mezi ostatními vyšetřenými ukazateli nebyla zjištěna významná korelace. Při posuzování prognostického potenciálu DKK-1 pomocí Coxovy regrese s následnou Kaplan-Meierovou analýzou byl zjištěn vztah k době do progresu (TTP) u nemocných léčených s podporou autologní transplantace periferních kmenových buněk (ASCT). Jedinci s DKK-1 ≥ 9399 ng/l měli výrazně delší TTP než nemocní s DKK-1 < 9399ng/l (medián 4,2 let vs 2,6 let, $p = 0,008$). U nemocných léčených konvenční chemoterapií včetně nových léků s biologickým mechanismem účinku (thalidomid, bortezomib, lenalidomid) uvedený vztah k prognóze prokázán nebyl.

Závěr: Sérové hladiny DKK-1 jsou nezávislým prognostickým ukazatelem u nemocných s MM léčených pomocí ASCT. Jedinci s nízkými hladinami DKK-1 měli významně kratší dobu do progresu než nemocní s vysokými hladinami DKK-1. Použití nových léků s biologickým mechanismem účinku však tento rozdíl stírá, zřejmě v důsledku širšího ovlivnění mikroprostředí kostní dřeně.

S podporou grantů IGA MZ CR NT 14393, NT14400, NT12451-5 a NT12215-4.

P31/2541.

Cirkulující MIR-34a a MIR-130a jako biomarkery extramedulární formy mnohočetného myelomu

Kubiczková L., Sedlaříková L., Kryukov F., Vrabel D., Nekvindová J., Radová L., Adam Z., Hájek R., Pour L., Ševčíková S. (UPF LF, MU, Brno; Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP, Olomouc; Ceitec, Brno; IHOK, FN, Brno)

Úvod: MikroRNA (miRNA), krátké nekódující RNA, se podílejí na patogenezi mnohočetného myelomu (MM) a je možné, že jsou zapojeny i do vzniku extramedulární formy MM (EM). Cirkulující miRNA jsou stabilní, kvantifikovatelné v tělních tekutinách a mají potenciál stát se diagnostickým markerem, jak bylo dříve prokázáno u MM. Cílem této studie bylo identifikovat profil cirkulujících miRNA pomocí TaqMan Low Density Arrays (TLDA) a kvantitativní PCR (qPCR) u pacientů s EM, MM a zdravých dárců (ZD) a porovnat hladiny exprese deregulovaných miRNA s klinickými parametry.

Metody: Celkově bylo do studie zahrnuto 100 vzorků séra EM pacientů, nově diagnostikovaných MM pacientů a ZD. TLDA screening 667 miRNA byl proveden u 5 EM, 5 MM a 6 ZD. Vybrané rozdílně exprimované miRNA ($p < 0,05$) mezi vzorky EM a MM a mezi EM a ZD byly potvrzeny pomocí qPCR s využitím absolutní kvantifikace u 35 EM, 35 MM a 30 ZD. Byla provedena ROC analýza každé sledované miRNA a jejich kombinací a také korelace s biochemickými parametry u EM a MM. Výsledky MiRNA profilování odhalilo 14 deregulovaných miRNA (vš. $p < 0,05$, po korekci $p < 0,41$) mezi MM a EM a 20 miRNA deregulovaných mezi EM a ZD (vš. $p < 0,05$, po korekci $p < 0,40$). Hladiny exprese miR-222, miR-130a, miR-34a a miR-195 byly dále ověřeny na větším souboru vzorků EM, MM a ZD. Hladina miR-130a byla významně snížena, miR-222 a miR-34a naopak zvýšena u EM ve srovnání se ZD (vš. $p < 0,005$); navíc miR-130a byla snížena a miR-34a zvýšena u EM oproti MM ($p < 0,06$). ROC analýza kombinace miR-130a a miR-34a odlišila EM od ZD se senzitivitou 74,3 %, specificitou 90 % a AUC=0,879. Dále, tato kombinace miRNA při porovnání EM s MM odlišila EM se senzitivitou 54,3 %, specificitou 80 % a AUC=0,675. V EM souboru, miR-130a pozitivně korelovala s hladinou hemoglobinu a počtem trombocytů ($rs=0,397$ a $0,439$, vš. $p < 0,05$), a negativně s hladinou monoklonálního imunoglobulinu, β 2-mikroglobulinu a C-reaktivního proteinu ($rs= 0,398$, $-0,427$ a $-0,488$, vš. $p < 0,05$). Hladina exprese této miRNA asociovala s vyšším stádiem ISS ($p=0,017$). MiR-222 pozitivně korelovala s hladinou laktát dehydrogenázy ($rs=0,417$, $p < 0,05$); miR-222 a miR-34a byly v pozitivní asociaci s procentuální infiltrací kostní dřeně plazmatickými buňkami ($rs=0,435$ a $0,562$, $p < 0,05$).

Závěr: Naše výsledky ukazují, že sérové miR-130a a miR-34a by se mohly stát slibnými biomarkery pacientů s extramedulární formou MM.

Grantová podpora NT14575, NT12130, NT14599, MUNI/11/InGA17/2012.

P32/2644.

Hodnocení postižení kostní dřeně u pacientů s maligními lymfomy

Cmunt E., Trněný M., Karban J., Bulvasová A., Velenská Z., Stříteský J., Kubinyi J. (1. interní klinika, VFN a 1. LF UK, Praha; Ústav patologie, VFN a 1. LF UK, Praha; Ústav nukleární medicíny, VFN a 1. LF UK, Praha)

Jedním ze základních vyšetření stadiu maligních lymfomů je vyšetření kostní dřeně. Porovnali jsme záchytnost vyšetření různými metodami (biopsie, imunofenotypisace, PET/CT), shodu/neshodu při vyšetření bilaterálním. Celkem bylo zhodnoceno 373 pacientů u kterých bylo provedeno vyšetření kostní dřeně, v rámci stadiu proběhlo 271 vyšetření, 102 pak během restagingu/kontrol během/po léčbě. U 320 pacientů bylo provedeno vyšetření bilaterálně, u 53 unilaterálně. Základní diagnosa byla u 130 pac. difusní velkobuněčný lymfom (DLBCL), u 83 pacientů folikulární lymfom, u 56 pacientů lymfom plášťové zony (MCL), u 23 pacientů klasický Hodgkinův lymfom, u 15 MALT lymfom, u 13 pacientů lymfom marginální zony, v 11 případech T-lymfom, 10 x B-NHL nespecifikovaný, 6x B-CLL resp. CLL/SLL. Při hodnocení bilaterálních biopsií byla jistá shoda (obě strany stejně hodnocení z hlediska infiltrace) nálezu na obou stranách v 305 případech (95,3%), jistá neshoda (obě strany rozdílné hodnocení infiltrace) v 7 případech (2,2%), nejistá neshoda (na jedné straně neohodnotitelné) pak v 8 případech (2,5%) Pokud jsme hodnotili po jednotlivých typech lymfomů – u DLBCL ze 104 bilaterálně provedených biopsií byla jistá shoda ve 102 případech (98,1%), zbytek (1,9%) jistě neshodný nález; u folikulárních lymfomů z 72 byl u 68 případů (94,4%) shodný nález, u 1 (1,4%) jistě neshodný a u 3 (4,2%) nejistě neshodný; u MCL z 37 bilaterálně vyšetřených byla shoda u 36 pacientů (97,3%). Stoprocentní shoda nálezů na obou stranách byla u pacientů s Hodgkinovým lymfomem. Při porovnání nálezu biopsického s imunofenotypisací byla neshoda u DLBCL pouze v 5 případech (3,8%) (1x neprovedena, 1x hraniční), u FL v 10 případech (12%); u MCL, MZL a MALT lymfomů byla shoda nálezů biopsie a imunofenotypisace ve 100 %. Dále jsme porovnávali s nálezy PET/CT (byl proveden u 268 pacientů = 71,8%) Při hodnocení PET/CT je možné, že difusní postižení kostní dřeně (bez výraznějšího dráždění a větších metabolických změn) se neprojevuje na PET – může tedy být častěji diskrepance ve smyslu PET negativní/biopsie pozitivní. Takových nálezů byla zhruba polovina, u ložiskového postižení pak je možnost odběru biopsie z jiného místa.

P33/2608.

Potential prognostic and predictive factors in diffuse large B-cell lymphoma

Flođr P., Látalová P., Tichý M., Kubová Z., Papajík T., Šváchová M., Radová L., Jarošová M. (ÚKMP, LF UP, Olomouc; HOK, FN, Olomouc; ÚMTM, LF UP, Olomouc)

Evolving experimental platform in hematocology and particular malignant lymphoproliferations is still searching for new and more valid prognostic and predictive factors with useful sorting on the clinical, morphologic and molecular grounds. The proper bridge more close to daily practice is so called translation medicine and in this point of view we have tried to sort our cohort of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) according to morphology (centroblastic, immunoblastic and anaplastic subtype of DLBCL, bone marrow involvement), Hans classifier (Hans et al., 2004) and expression of Bcl2, CD5, CD20, CD30 and NfκappaB family of proteins (p50, p52, p65) with correlation to clinical (Ann Arbor stage, B-symptoms, IPI, aa-IPI, PFS, OS), laboratory (peripheral blood count, LDH, Beta2-mikroglobulin) and molecular data (complex and simplex karyotype). In our retrospective study 59 patients with de novo DLBCL (27 men and 32 women) with median age 64 years has been included. The criteria for patients' selection were adequate formaline-fixed and paraffin-embedded (FFPE) material and available clinical data. Classification and subclassification of DLBCL has been assessed according to WHO classification scheme (WHO 2008). All statistical analyses were performed using software STATISTICA 10 (Statsoft, Inc.). Prognostic values of immunohistochemical detections have been analysed with Cox regressive analysis (Cox 1972), Mann-Whitney and Kruska-Wallis test. The interval of PFS and OS has been assessed according to Kaplan-Meier analysis. Acknowledgements for my excellent mentor in general hematopathology Associate Professor Martin Tichý, MD, PhD, for

my excellent mentor in biology of EBV-associated lymphoproliferations Professor PG Murray, for my excellent mentor in lymphoma biology Professor Marie Jarošová PhD, and IGA NT11103 and Leukemia and Lymphoma Fund for kind support.

P34/2605.

Jak léčíme B-buněčný lymfom, neklasifikovatelný, s rysy intermediárními mezi difuzním velkobuněčným B-lymfomem a Burkittovým lymfomem

Michalka J., Janíková A., Šálek D., Petrová J., Král Z., Křen L., Moulis M., Mayer J. (1. Interní hematologická a onkologická klinika, FN a LF MU, Brno; Ústav patologie FN a LF MU, Brno)

Úvod: B-buněčný lymfom, neklasifikovatelný, s rysy intermediárními mezi difuzním velkobuněčným B-lymfomem a Burkittovým lymfomem (DLBCL/BL) je zatím provizorní kategorií pro spektrum nemocí mezi dvěma hraničními lymfomy – difuzním velkobuněčným B-lymfomem (DLBCL) a Burkittovým lymfomem (BL). Tyto lymfomy mají morfológické a genetické znaky obou DLBCL i BL, většinou agresivní chování a nejsou k dispozici žádné standardní doporučené léčebné postupy. Metodika: Retrospektivně jsme zhodnotili klinická data z našeho registru pacientů mezi lety 2010 – 2013 a vyhodnotili léčebný postup. Rozhodnutí o způsobu léčby záviselo na věku pacienta, klinickém stádiu nemoci a IPI skóre. Všechny histologické vzorky byly revidovány zkušeným patologem, ve většině případů včetně vyšetření FISH a molekulárně biologického vyšetření.

Výsledky: Od ledna 2010 do prosince 2013 evidujeme 30 pacientů s nově diagnostikovaným DLBCL/BL, to představuje přibližně 3.4% všech ne-hodgkinských lymfomů (n=881). Jedna 86-letá pacientka byla léčena pouze paliativní radioterapií a zemřela do 1 měsíce od stanovení diagnózy na progresi lymfomu. 10 z 30 pacientů (33%), průměrného věku 53 let (38–66 let), bylo léčeno s intenzivnějším přístupem, kdy léčba režimem R-CHOP byla posílená o 3–4 cykly R-CODOX-M s nebo bez R-IVAC do celkem 5–7 cyklů chemoterapie. 2 pacienti (20%) z této skupiny zemřeli, první (53 let) měl potvrzený tzv. double hit lymfom, byl primárně chemorezistentní a zemřel do 4 měsíců od diagnózy na progresi lymfomu. Druhý pacient z této skupiny (60 let) zemřel kvůli toxicitě léčby krátce po jejím ukončení. 8 pacientů (80%) ze skupiny intenzivně léčených je v kompletní remisi trvající 3–30 měsíců. 19 z 30 pacientů (63%), průměrného věku 71 let (57–86 let), dostalo standardní R-CHOP chemoterapii, v 9 případech (47%) včetně 1–2 cyklů vysokodávkovaného methotrexátu nebo cytarabinu. 3 pacienti (16%) z této skupiny zemřeli během léčby nebo do 6 měsíců po jejím ukončení na progresi, další 3 pacienti (16%) zrelabovali do 1 roku od ukončení léčby. 13 pacientů (68%) z této skupiny je v kompletní remisi.

Závěr: Přes krátkou dobu sledování naše data svědčí pro to, že R-CHOP chemoterapie je méně efektivní než její kombinace s některým z intenzivnějších režimů jako R-CODOX-M či R-IVAC. Nejdůležitější faktor, který ovlivnil léčebný přístup byl věk pacientů. Pro stanovení vhodných léčebných doporučení je potřeba delší doba sledování a větší počet sledovaných pacientů.

P35/2598.

Splenický absces komplikující imuno-chemoterapii pacienta s lymfomem plášťové zóny

Turcsányi P., Papajík T., Starostka D., Formánek R., Szkorupa M. (HOK, FN, Olomouc; Odd.kl. hematologie nem., Havířov; Klinika nukleární medicíny, LF UP FN, Olomouc; I.chir.klinika FN, Olomouc)

Kazuistika popisuje případ pacienta s lymfomem z plášťových buněk (MCL), pokročilým klinickým stadiem, včetně postižení sleziny u kterého léčba byla komplikovaná vznikem abscesu sleziny jehož substrátem mohlo být prokrváčené ložisko sleziny v době diagnózy. Diferenciální diagnostika byla složitá kdy paraneoplastické fenomény i infekce mají často společné laboratorní i klinické projevy. Taktéž obtížné je rozlišení zánětlivé afekce od nádorové aktivity za pomoci PET/CT vyšetření (pozitronová emisní tomografie/výpočetní tomografie). Diagnóza abscesu byla ověřena splenektomií, za krytí ATB (antibiotik), což se zdálo být nejvhodnějším diagnosticko – terapeutický přístupem. Následná imuno-chemoterapie po splenektomii proběhla bez závažných infekčních komplikací.

FISH a aCGH u souboru nemocných s primárním mediastinálním B-buněčným lymfomem (PMBCL)

Mikešová M., Nedomová R., Holzerová M., Flodr P., Procházková V., Papajík T., Jarošová M., Prouzová Z., Indrák K. (HOK, FN, Olomouc; Ústav klinické a molekulární patologie, FN a LF UP, Olomouc)

WHO klasifikace lymfoidních neoplazií určuje primární mediastinální B-buněčný lymfom (PMBCL) samostatnou klinicko-patologickou jednotkou ne Hodgkinských lymfomů (NHL). PMBCL vzniká pravděpodobně z thymických B-buněk, představuje asi 2 % všech NHL a je často pozorován u mladších nemocných. Genetickým markerem PMBCL je zmožení genetického materiálu subtelomerické oblasti chromosomu 9p zahrnující gen JAK2, pozorovaný až u 75 % případů. Další rekurentní změny postihují chromosom 2p15, mutace genu SOCS1 a CIITA lokalizované na chromosomu 16p. Všechny tyto změny jsou dávány do souvislosti s prognosou nemocných. Cílem naší studie bylo provést molekulárně cytogenetickou analýzu metodou FISH a arrayCGH souboru nemocných s PMBCL, určit frekvenci a typy nebalancovaných změn, analyzovat a určit změny genů JAK2, CIITA a MYC, a pokusit se určit rozsah amplifikované oblasti 9p. Souboru 34 pacientů tvořilo 20 žen a 14 mužů s mediánem věku při diagnóze 32,5 roků. Celkem 31 pacientů bylo vyšetřeno metodou FISH s lokusově specifickými sondami pro geny JAK2, CIITA a MYC. Vyšetřovaným materiálem byla nádorová tkáň (18) nebo řezy z formálním fixovaných parafinových bločků tkáně (13). arrayCGH byla provedena u 20 pacientů, v 15 případech byla DNA izolovaná z čerstvé nádorové tkáně, v 5 případech z řezů parafinových bločků. Z 31 pacientů vyšetřovaných pomocí FISH bylo u 20 pacientů (65 %) pozorováno zmožení oblasti 9p24 zahrnující gen JAK2, z toho u 16 pacientů (52 %) byl gen JAK2 amplifikován. Změny v genu CIITA byly prokázány u 8 (26 %) pacientů, pouze u 3 pacientů byla prokázána přestavba genu CIITA (10 %). U 10 pacientů (32 %) bylo prokázáno zmožení počtu kopií genu MYC. Z celkového počtu 20 pacientů vyšetřených metodou arrayCGH byly pozorovány nebalancované změny u 18 pacientů (90 %) se značnou převahou získků genetického materiálu nad ztrátami. Nejčastější změnou bylo zmožení oblasti 9p pozorované u 13 pacientů. Určili jsme minimální zmoženou oblast o velikosti 2,3 Mb, zahrnující celkem 9 genů, mezi které patřily také geny JAK2, PDCD1LG2 a JMJD2C. Naše výsledky potvrdily význam metod FISH a arrayCGH při určování genetických změn u PMBCL. Plánované rozšíření souboru může přinést významné poznatky pro vyhodnocení prognostického významu určených změn a jejich roli v patogenezi onemocnění. Práce je podporována grantem IGA NT 11103 a LF UP LF-2014-001.

P37/2524.**Hepcidin pri niektorých lymfoproliferatívnych ochoreniach**

Nosál M., Pospíšilová D., Holub D., Štefániková Z., Stecová A., Waczuliková I., Slezák P. (Klinika hematologie a transfuziologie, LFUK, UNB, SZU, Nemocnica Staré Mesto, Bratislava – SVK; Klinika hematologie a transfuziologie LFUK, UNB, SZU, Nem.sv.Cyrila a Metoda, Bratislava – SVK; Dětská klinika, LFUP a FN, Olomouc – CZE; Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP, Olomouc – CZE; Medirex, s.r.o, Bratislava – SVK)

Úvod: Hepcidin je nízkomolekulový peptidický hormón objavený pred viac ako 10 rokmi, ktorý pozostáva z 25 aminokyselín (AMK) a je hlavným regulátorom homeostázy železa (Fe). Cieľ: v práci sme chceli zistiť ako sa chová metabolizmus železa pri niektorých lymfoproliferatívnych ochoreniach. Cieľom štúdie bolo porovnať zápalové markery IL-6 a CRP s hodnotami zásobného železa feritínu, solubilným transferínovým receptorom, feritínovým indexom, hladinou hepcinu a ďalšími sledovanými parametrami.

Metóda a pacienti: vyšetřili sme 18 pacientov s lymoproliferatívnymi ochoreniami. 15 pacientov s Non-Hodgkinovým lymfómom, dvoch pacientov s mnohopočetným myelómom a jedného pacienta s chronickou lymfocytovou leukémiou. Kontrolnú skupinu tvorilo 10 pacientov s iným interným ochorením, bez anémie a deficitu železa. U všetkých pacientov sme vyšetřili krvný obraz, hladinu FeS, Feritin, Transferin, saturáciu transferinu, solub. Trf.rec., feritínový index= sol. Trf.rec./ log. feritin, CRP, IL-6, hladinu erythropoetinu a hladinu hepcidinu. Štatisticky sme vyjadřili jednotlivé parametre a vzájomné korelácie.

Výsledky: Pacienti mali nižšie hladiny sérového železa (p=0,0041), sérového transferínu (p=0,038) a saturácie transferínu (p=0,023). Ďalej sme zistili u pacientov vyššie hladiny feritínu (p=0,0039) a vyššie hladiny hepcidinu (p= 0.02). Významné negatívne korelácie sme potvrdili

pre solubilný transferínový receptor (sTrRe) v.s. sérové železo (tau b= -0,43) a pre feritínový index v.s. sérové železo (tau b=-0,53). Feritín v.s. transferín (Trf; tau b=-0,36) slabá negatívna korelácia.

Záver: zaznamenali sme štatisticky významné hladiny niektorých parametrov metabolizmu železa pri lymfoproliferatívnych ochoreniach. Zaujímavé by bolo opakované vyšetřenie u liečených dlhodob sledovaných pacientov (napr. po transplantácii kostnej drene). V budúcnosti aj efekt antihepcidínových protilátok, na vývoji ktorých sa súčasne intenzívne pracuje.

P38/2604.**Sledování minimální reziduální nemoci u pacientů s non-Hodgkinskými lymfomy bez iniciální infiltrace kostní dřene a/nebo periferní krve**

Kalinová M., Froňková E., Lokvenc M., Mejstříková E., Klener P., Trněný M., Belada D., Móciková H., Trka J., Kodet R. (Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha; Klinika dětské hematologie a onkologie, 2.LF UK a FN Motol, Praha; I. interní klinika-klinika hematologie, 1. LF UK a VFN, Praha; Interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové; Interní hematologická klinika, FNKV, Praha)

Detekce minimální reziduální nemoci (MRN) u pacientů s hematologickými malignitami pomocí kvantifikace klonálně specifických přestaveb genů pro imunoglobuliny (Ig) a T buněčné receptory (TCR) patří mezi standardizované laboratorní postupy. U pacientů s non-Hodgkinskými lymfomy (NHL) a dostupnými iniciálními vzorky kostní dřene (KD) a/nebo periferní krve (PK) s výraznou infiltrační nádorovými buňkami (detekovanou pomocí průtokové cytometrie) lze tento materiál použít jak pro detekci klonality Ig/TCR, tak pro následnou monitoraci MRN. Pacienti s nízkou iniciální infiltrací (pod 1%), případně bez infiltrace KD/PK však nemají vhodný materiál pro vytvoření MRN esej. Aby i tito pacienti mohli profitovat z možnosti sledování MRN, je zapotřebí najít alternativní diagnostický materiál. Pacienti s NHL jsou diagnostikováni na základě biopsie tkáně, ve které je dle histologického zhodnocení znám přesný počet nádorových buněk. Vzorkem může být zmrazená tkáň, častěji je však k dispozici pouze tkáň fixovaná ve 4% roztoku formaldehydu a zalitá do parafínu (FFPE). Obecně je FFPE materiál nevhodný pro molekulární analýzy kvůli možné degradaci nukleových kyselin při fixaci tkáně. Cílem práce bylo testování MRN esejí za využití tkání (FFPE, zmrazených) u pacientů bez dostatečné iniciální infiltrace KD/PK. U 7 pacientů jsme simultánně sestrojili MRN esej jak za využití tkáně (6x FFPE, 1x zmrazená), tak z infiltrovaných vzorků KD/PK, a následně jsme porovnávali hladiny MRN stanovené pomocí obou esejí. Korelace mezi hodnotami MRN byla velmi dobrá (Spearmanův korelační koeficient 0,975). Dále jsme vyšetřili pacienty bez iniciální infiltrace nebo s nízkou infiltrační stagingové KD/PK (23xMCL, 1x DLBCL, 2x B lymfoblastický lymfom, 2x T lymfoblastický lymfom a 2x ALCL). MRN esej za využití primárního nádoru ukázaly hladiny ve stagingových KD od negativních až po 4,00E-01 (medián 9,13E-03). Hladiny korelovaly s hladinami měřenými pomocí průtokové cytometrie. Všechny MRN esej odvozené od vzorků tkáně (17x FFPE, 13x zmrazená tkáň) dosahovaly citlivosti nejméně 1E-4, která je požadována v rámci kritérií EuroMRD. U pacientů s NHL bez iniciální infiltrace KD/PK nebo s velmi nízkou infiltrační jsme díky dostupnosti vzorku primárního nádoru byli schopni připravit MRN esej a spolehlivě měřit hladiny MRN s citlivostí minimálně 1E-4.

Podpořeno projektem (MZ) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN MOTOL), IGA NT13072, OPVK CZ.2.16/3.1.00/24022 a PRVOUK-27/LF1/1.

P39/2635.**Bioptická analýza veľkobunkových lymfómov CNS**

Mičák J., Plank L., Farkašová A., Balhárek T., Szépe P. (Ústav patologie, JLF UK a UN, Martin – SVK)

Úvod: Malígne lymfómy (ML) CNS sú zriedkavé – tvoria pribl. 5% všetkých nádorov CNS a viac ako 95% z nich patrí do spektra veľkobunkového B-lymfómu (DLBCL). Biologicky môže ísť o primárny ML vznikajúci v mozgu, mieche, alebo v oku – tzv. PCNSL, alebo o prejav systémovej diseminácie DLBCL iného než CNS pôvodu. PCNSL predstavuje v klasifikácii ML podľa SZO (2008) samostatnú, klinicky agresívnu nozologickú jednotku. Cieľom práce je pilotná analýza veľkého súboru pacientov s veľkobunkovým B-lymfómom CNS ako súčasťou projektu zameraného na DLBCL všeobecne.

Materiál a metody: V našem registri sme v rokoch 2004–2014 identifikovali 84 prípadov ML CNS, ktoré boli diagnostikované v neurochirurgických vzorkách mozgu a miechy. Biopický materiál bol štandardne vyšetrený panelom histologických a imunohistochemických (IHC) vyšetrení. Zo súboru 84 pacientov 80 prípadov zodpovedalo CD20+ B-ML typu DLBCL a 4 prípady iným typom ML B- a T-pôvodu. Zistené parametre morfológie a fenotypu týchto 80 prípadov boli korelované s dostupnými klinickými údajmi. V časti prípadov (n=10) bola analýza doplnená aj o FISH analýzu prestavby génov MYC, BCL2 a BCL6. Táto nie je možná v prípadoch malej vzorky, v ktorých bolo tkanivo „spotrebované“ biopickým vyšetrením. Väčšinu prípadov súboru tvorili vyšetrenia konzultačné, preto sa snažíme opätovne získať bloky tkaniva a doplniť chýbajúce, najmä FISH analýzy.

Výsledky: V 5 prípadoch išlo o disemináciu systémového DLBCL a 75 (93.8% všetkých veľkobun- kových B-ML) prípadov zodpovedalo definícii PCNSL, ktorý bol morfológicky tvorený pruhmi a agre- gátmi blastov (prevažne centro- a imunoblastov) s črtami angiocentrizmu. IHC analýza dokázala vysoký výskyt „tripple“ pozitívnej expresie MUM1, bcl2 a bcl6 proteínov (97.3%, 89.1, resp. 78.6% všetkých), pri zriedkavosti pozitivity CD10 antigénu (pribl. 15%). Realizovanými FISH vyšetreniami (doteraz) 10 prípadov sme v 5 dokázali prestavbu génu BCL6 (n=3) a BCL2 (n=1), v žiadnom sme nezistili prestavbu MYC génu, resp. dvoch génov súčasne.

Záver: V súbore boli v súlade so známymi údajmi zistené a) „typický“ fenotyp PCNSL a b) vysoko- agresívne biologické parametre (prežívanie pacientov v rozsahu skôr mesiacov než rokov) PCNSL. V ďalšom sa pokúsime parametre súboru doplniť o uvedené ďalšie analýzy.

Podakovanie: Práca bola podporená grantom VEGA SR, č.1/0378/12 a projektami MBRKM a Bio- Med Martin (ITMS kód 26220220113, resp. 26220220187) – sú riešené na JLF UK a spolufinanco- vané z prostriedkov EÚ.

CLL

P40/2633.

Epidemiologie a klinický průběh u nemocných s chronickou lymfocytární leukemií: analýza u neselektované skupiny nemocných

Motyčková M., Šimkovič M., Vodárek P., Belada D., Žák P., Smolej L. (IV. interní hematologická klinika, FN a LF UK, Hradec Králové)

Úvod: Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je onemocnění s extrémně variabilním klinickým prů- během. Vzhledem k tomu, že velká část nemocných není nikdy pro CLL léčena a je proto sledována na regionálních hematologických pracovištích, jsou přesná epidemiologická data v literatuře výji- mečná, neboť téměř všechny analýzy ze sekundárních a terciárních center jsou významně zkres- leny zvýšeným podílem nemocných s nepříznivou prognózou. Cíl: Analýza souboru nemocných s CLL diagnostikovaných v okrese Hradec Králové (HK) od 1999–2013, zhodnocení trendů v epi- demiologii a klinickém průběhu. Pacienti a metodika: Od 1999–2013 bylo v okrese HK (162,820 obyvatel k 31.12.2011) diagnostikováno 193 nemocných s CLL. K posouzení trendů v epidemi- ologii a klinickém průběhu byla kohorta rozdělena na dvě podskupiny dle data diagnózy: v období 1999–2005 bylo diagnostikováno 90 pacientů (50 mužů, medián věku 71 let; rozmezí 31–88), v ob- dobí 2006–2013 103 nemocných (66 mužů, medián věku 67 let; rozmezí 41–89). Základní charak- teristiky obou skupin jsou uvedeny v tabulce.

Výsledky: Průměrná incidence CLL v okrese HK za 1999–2013 byla 7,9 nemocných/100.000 oby- vatel/rok; incidence v obou obdobích byla shodná. Nemocní s CLL diagnostikováni v období 2006– 2013 byli významně mladší (medián 67 vs. 71 let, p=0,037), byly méně často autoimunitní cytopenie (p=0,03). Zastoupení klinických stádií, pohlaví ani výskyt Richterovy transformace se v obou obdo- bích významně nelišilo. V porovnání s obdobím 1999–2005 nebyl rozdíl v období do zahájení léčby 1. linie (medián 72 vs. 61 měsíců), došlo však k významnému prodloužení celkového přežití (medián nedosažen vs. 78 měsíců, p = 0,001).

Závěry: Naše výsledky představují skutečná epidemiologická data neselektované populace nemoc- ných s CLL. Analýza za uplynulých 15 let ukázala vyšší incidenci v porovnání s literaturou, snižování mediánu věku v době diagnózy a pokles výskytu autoimunitních komplikací. Velmi důležitým aspek- tem je významné prodloužení celkového přežití, k čemuž přispívá použití intenzivních léčebných

modalit (zejména chemoimunoterapie) a kvalitní podpůrné léčby. Alogenní transplantace je prováděna pouze u velmi malé části nemocných.

Podpořeno projektem PRVOUK P37/08, grantem IGA NT/13412-4 a rozvojovým projektem MZO 00179906 Ministerstva zdravotnictví ČR.

P41/2611.

Žilní tromboembolická nemoc: častá komplikace nemocných s chronickou lymfocytární leukémií

Vodárek P., Šimkovič M., Motyčková M., Belada D., Smolej L. (IV. interní hematologická klinika, FN a LF UK, Hradec Králové)

Úvod: Žilní tromboembolická nemoc (TEN) je významnou příčinou morbidity a mortality nemocných s maligními nádory. Zvýšené riziko TEN bylo prokázáno u řady hematologických malignit. Data tý- kající se výskytu TEN u nejčastějšího typu leukémie dospělých v euroamerické populaci chronické lymfocytární leukémie (CLL) jsou velmi omezená. Nedávná studie britských autorů (Whittle et al., Leuk Res 2010) však uvádí vyšší výskyt TEN u nemocných s CLL v porovnání s běžnou populací. Cíle práce: Zhodnotit výskyt TEN a posoudit rizikové či prognostické faktory jejího vzniku u ne- nemocných s CLL. Nemocní a metodika: Retrospektivně jsme analyzovali data nemocných s CLL sledovaných na IV. interní hematologické klinice FN a LF UK HK v letech 1999–2013. Celkově jsme hodnotili 346 nemocných (222 mužů, 114 žen, věkový medián v době diagnózy 64 let). Nízké/střed- ní/vysoké riziko dle Raiova modifikovaného stagingového systému bylo v době diagnózy přítomno u 41/47/12 % nemocných. Do analýzy byli zařazeni pouze nemocní s radiologicky potvrzenou hlubou- kou žilní trombózou (ultrazvukové vyšetření) nebo plicní embolií (počítačová tomografie).

Výsledky: Při mediánu sledování 72 měsíců (rozmezí 26–138) došlo k minimálně jedné epizodě TEN u 38 pacientů (11 %). Základní charakteristika souboru je uvedena v tabulce 1.). K rozvoji TEN došlo po mediánu sledování 34 měsíců od stanovení dagnózy CLL. Jednalo se o pacienty s nepříznivým profilem prognostický ukazatelů (pokročilé stádium dle Raie, nemutovaný stav IgVH a nepříznivé cytogenetické změny). Nebyl pozorován vztah výskytu TEN k hyperleukocytóze a dalším změnám v krevním obraze. Zjevná vyvolávající okolnost pro rozvoj TEN byla pozorována u 4 pacientů (akutní infekce). Přítomnost 0/1/2/3 rizikových faktorů pro TEN bylo zjištěno u 2/16/14/6 nemocných. V 17 případech se jednalo o dosud neléčené pacienty, 10x se TEN vyskytla v průběhu léčby CLL a 7x u dříve léčených nemocných. Nejčastějšími rizikovými faktory kromě věku (n=24) byly kortikoterapie (n=13), další malignita (n=9) a obezita (n=7). K rekurenci TEN došlo u 8 nemocných (21 %). Celkové přežití nebylo závislé na výskytu TEN.

Závěr: Lze shrnout, že výskyt žilního trombembolismu u nemocných s CLL je relativně vysoký. Ačkoli byl ve většině případů prokazatelný jiný rizikový faktor pro rozvoj TEN než léčba CLL, u 29 % ne- nemocných nebyl přítomen žádný rizikový činitel nebo pouze věk ≥ 65 let. Právě tento nález podporuje představu o tom, že je aktivita CLL spojena s rizikem rozvoje TEN.

P42/2601.

Méně časté přestavby genů pro imunoglobulinové řetězce u nemocných s CLL

Holzerová M., Krůzová L., Mikešová M., Píkalová Z., Pocatková H., Papajík T., Urbanová R., Prekopová I., Kropáčková J., Hanzlíková J., Indrák K., Jarošová M. (Hematoonkologická klinika, FN, Olomouc)

Chromosomové translokace zahrnující imunoglobulinové geny (IG) jsou u chronické lymfocytární leukemie (CLL) rekurentní, avšak jejich frekvence je nízká a pohybuje se kolem 5–8 %. Přesto bylo prokázáno, že translokace zahrnující IG geny jsou spojeny s nepříznivou prognózou a pokročilým stádiem onemocnění. Cílem naší studie bylo určit frekvenci IG přestaveb u našeho souboru CLL nemocných a určit partnerské geny vstupující do translokací. V období let 2003–2013 jsme vyšetřili 392 CLL nemocných klasickou cytogenetikou a metodou FISH s panelem sond pro detekci delecí 11q-, 17p-, 13q-, 6q-, trisomie 12, aberaci 8q24 a přestavby IgH (Abbott Molecular, Kreatech, MetaSystems). Pro mapování zlomových míst byly použity lokusové specifické sondy, sondy pro geny IGL, IGK (DAKO) a BAC sondy (BlueGnome). Přestavbu IG genů jsme prokázali u 18 (5 %) nemoc- ných – 7 mužů a 11 žen, medián věku 66,5, s klinickým stadiem Binet A (10 nemocných), Binet B (3) a Binet C (5). 15 nemocných bylo vyšetřeno v době diagnózy, 2 v průběhu onemocnění – jeden před

zahájením terapie, druhý v relapsu onemocnění. Cytogenetické vyšetření prokázalo změny karyotypu u 13 nemocných, 2 nemocní měli normální karyotyp a u 4 bylo vyšetření neúspěšné. Přestavba IG genů se vyskytovala společně s delecí 13q14 (7x), trisomií chromosomu 12 (6x), delecí ATM (2x) a delecí TP53 (1x). Translokace IgH byla potvrzena u 17 nemocných, u jednoho nemocného byla prokázána translokace IgL. Jako samostatná změna karyotypu byla translokace IgH prokázána u 4 nemocných, společně s jednou přídatnou změnou u 11 nemocných a u 3 nemocných byla součástí komplexního karyotypu. Nejčastějším partnerským genem v translokaci s IG geny byl gen BCL2 v translokaci t(14;18) – 8x, v translokaci t(18;22) – 1x. U 3 nemocných byly prokázány translokace t(8;14), t(11;14) a t(14;19) s partnerskými geny MYC, CCND1 a BCL3. U 4 nemocných s translokací t(2;14), t(3;14), t(6;14) a t(9;14) jsme mapovali dosud nepopsaná zlomová místa. Molekulárně cytogenetickou analýzou jsme určili přestavbu IG genů u 18 (5%) nemocných s CLL a určili 4 dosud nepopsaná zlomová místa partnerských chromosomů.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NT 13 576 a grantem IGA LF 2014-001.

P43/2578.

Expres markerů funkční inaktivity cytotoxických T-lymfocytů (PD-1) u CLL koreluje se stádiem onemocnění

Novák M., Procházka V., Píkalová Z. (Hematoonkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc)

Úvod: Interakce receptoru programované buněčné smrti (PD-1) se svými ligandy (PD-L1, PD-L2) je jedním z mechanismů, které maligní populace využívá k úniku před imunitní odpovědí hostitele. Chronická aktivace dráhy programované buněčné smrti vede ke ztrátě imunokompetence CD4+ i CD8+ T-lymfocytů, ústící v defekt cytotoxického působení, redukci produkce cytokinů a ztrátě proliferací kapacity, což komplexně označujeme jako vyčerpání (exhausting) efektorových T-lymfocytů. Cíl: Analýza exprese markeru PD-1 na subpopulacích T-lymfocytů nemocných s CLL v různém stádiu onemocnění a porovnání se zdravými probandy. Metoda: Multiparametrická průtoková cytometrie na přístroji FACS Calibur (BD) s využitím analytického software Cell Quest Pro (BD), pomocí protilátek: anti CD3 FITC, anti PD-1 PE (CD279), anti CD4 APC, anti CD8 Per CP. Populace PD-1 (CD279) byla gatována z CD3+ T-lymfocytů s akvizicí minimálně 10 000 CD3+ buněk.

Výsledky: Bylo vyšetřeno 15 zdravých probandů (7 mužů a 8 žen) a 52 nemocných s CLL (36 mužů a 16 žen, medián věku při vyšetření 54 let, 30 vyšetřeno před zahájením terapie, 22 ve stádiu aktivního onemocnění/ relapsu onemocnění). Střední hodnota procentuálního zastoupení CD8+/PD-1+ buněk z gatů CD3+ lymfocytů u zdravých dárců krve byla 9,67%, u neléčených nemocných při diagnóze 14,96 %, u aktivního onemocnění nebo relapsu 19,78%. Rozdíl byl statisticky signifikantní jak v porovnání se zdravými probandy, tak v porovnání obou skupin nemocných. U subpopulace CD4+/PD-1+ buněk z gatů CD3+ lymfocytů dosahovala střední hodnota procentuálního zastoupení u zdravých dárců 13,22%, u neléčených nemocných při diagnóze 21,29%, u aktivního onemocnění nebo relapsu 23,71%. Rozdíl byl rovněž ve všech případech statisticky signifikantní.

Závěr: Expres markerů funkční inaktivity je u nemocných s CLL signifikantně vyšší, než u zdravých dárců. Procentuální zastoupení exprese receptoru PD-1 na imunokompetentních subpopulacích T-lymfocytů navíc koreluje se stádiem onemocnění. Výsledky jsou v souladu s hypotézou aktivního působení nádorových buněk na adaptivní složky hostitelovy imunity
Podpořeno grantem IGA-LF-2014-001

P44/2535.

Dá sa chronická lymfocytová leukémia liečiť interferónom? Kazuistika.

Hrubiško M., Oltman M. (Klinika hematológie a transfúziológie UN Bratislava – SVK; Thalio, Gastroentero-hepatologické centrum, Bratislava – SVK)

Predstavujeme kazuistiku v súčasnosti 66-ročného pacienta, u ktorého bola pred 13 rokmi (vo veku 53 r.) zistená hepatitída C a zároveň lymfocytóza. Odoslaný na KHaT za účelom stanovenia diagnózy a konzultácie ohľadne plánovanej liečby interferónom-alfa (IFN). Zistená ľahká leukocytóza (Le) 12,7 G/l a relatívna (65%) i absolútna (8,0 G/l) lymfocytóza (Ly). Trepanobiopsiou a imunofenotypizáciou bola potvrdená diagnóza B-chronickej lymfocytovej leukémie (CLL). Keďže ochorenie bolo zistené v štádiu A, nevyžadovalo hematologickú liečbu a pre terapiu IFN neboli žiadne kontraindikácie, pacient bol v rokoch 2001–2002 dvanásť mesiacov liečený kombináciou IFN 3 mil.j. 3x/

týždeň + ribavirín 1000 mg/deň. Z hepatologického hľadiska bolo dosiahnuté zastavenie progresie ochorenia. Pri hematologickej kontrole v apríli 2002 zistená parciálna hematologická remisia ochorenia – leukocyty v norme, hraničná relatívna (62%) i absolútna lymfocytóza (4,4 G/l). Postupne zaznamenávame progresiu CLL až na hodnoty Le 18 G/l, Ly 67%, abs. 12,2 G/l (2003). Pre progresiu hepatitídy bol pacient v rokoch 2003–2004 celkovo 12 mesiacov liečený kombináciou Pegintron 120 ug a 7 dní + ribavirín 1000 mg/deň. Opäť bola dosiahnutá hematologická remisia (Le 6,1 G/l; Ly 37%; abs. 2,3 G/l). V ďalších rokoch sa pohybovali leukocyty v rozmedzí 14,9–6,7 G/l s lymfocytózou 69–23%, po krátkodobom vzostupe Le i Ly v roku 2006 už len s klesajúcou tendenciou napriek tomu, že pacient bol bez akejkoľvek hematologickej alebo virostatickej liečby. Kontrolné vyšetrenie kostnej drene (KD) v r. 2008 preukázalo normálne hodnoty Ly v KD (21,2%) bez prítomnosti buniek s koexpresiou CD5/19/23. Našli sa len bunky s koexpresiou CD 19/23 (5%), CD5/19 (6%) a CD5/23 (5%). Molekulové vyšetrenie nepreukázalo žiadnu mutáciu. Ďalších 5 rokov po tomto vyšetrení boli hodnoty krvného obrazu (KO) trvale v norme. Hodnoty KO z júna 2013 (pred opätovným začatím liečby Pegintronom) boli: Le 6,67 G/l; Hb 130 g/l; Tr 97 G/l; Ly 23%; abs. 1,5 G/l. Od 08/2013 pacient znova absolvoval 20 týždňov kombinovanej liečby Pegintron + ribovirín + boceprevir, ktorú pre neznašanlivosť ukončil. Aktuálny KO zodpovedá stavu po liečbe: Le 3,5 G/l; Hb 128 g/l; Tr 154 G/l, Ly 39,6%, abs. 1,4 G/l.

Záver: Napriek tomu, že interferón nie je bežným liekom pre dg. CLL, v našej kazuistike sme chceli poukázať na zaujímavý prípad, keď je liečba IFN schopná navodiť dlhodobú 9 rokov pretrvávajúcu kompletnú hematologickú remisiu lymfoproliferatívneho ochorenia.

P45/2603.

Analýza mutace NOTCH1 genu u souboru 100 pacientů s CLL

Pocztaková H., Humplíková L., Urbanová R., Krůzová L., Kolářková M., Orviská M., Divoká M., Papajík T., Indrák K., Jarošová M. (Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc)

NOTCH1 je protoonkogen, jehož aktivující mutace byly popsány u řady nádorů jako akutní lymfoblastická leukemie (ALL), lymfom plášťové zóny a chronická lymfocytární leukemie (CLL). Zatímco prognostický význam mutace u ALL je stále kontroverzní, mutace NOTCH1 PEST domény u pacientů s CLL je spojena s nepříznivou prognózou a vyšším rizikem progresu do Richterova syndromu. 92 % všech mutací v NOTCH1 PEST doméně jsou inserce nebo delece a pouze 8 % jsou bodové mutace. NOTCH1 mutace je pozorována u 8–10 % CLL pacientů v době diagnózy, často ve spojení s nemutovaným stavem IgVH a trizomií chromosómu 12. Cílem naší práce bylo provést retrospektivní analýzu mutace NOTCH1 (c.7544_7545delCT) na souboru 100 pacientů s CLL, určit frekvenci mutace a výsledky porovnat s dalšími klinickými a laboratorními parametry. Analyzovaný soubor 100 CLL pacientů tvořilo 66 mužů a 34 žen s mediánem věku 63 let (rozmezí 27–87 let). U všech pacientů byl vyšetřen mutační stav IgVH, provedena klasická cytogenetika a metoda FISH s panelem CLL sond. U všech nemocných byla vyšetřena mutace c.7544_7545delCT v PEST doméně metodou PCR-ARMS (amplification refractory mutation system). Opakovaně byla mutace vyšetřena u 9 nemocných. Z celkového počtu 100 vyšetřených pacientů byla mutace c.7544_7545delCT v PEST doméně NOTCH1 genu určena u 19 (19 %) pacientů (10 mužů a 9 žen). Celkem 18/19 mělo nemutovaný stav IgVH, 6/19 bylo vyšetřeno v době diagnózy, 10/19 před léčbou 1. linie a 3/19 při relapsu onemocnění. Celkem 14/19 NOTCH1MUT pozitivních pacientů mělo trizomii 12, dva společně s delecí ATM a jiní dva s delecí TP53. Pouze jeden nemocný neměl kromě mutace žádnou jinou změnu. Opakované vyšetření bylo provedeno u 9 pacientů po léčbě, z toho jeden po alloHSCT. Po léčbě vymizela mutace v NOTCH1 genu u 4/9 pacientů, z nich u 3 byla dosažena kompletní a u jednoho parciální remise. U jednoho pacienta negativního v době diagnózy, byla mutace určena po 7 letech bez léčby. Zjistili jsme v souladu s literaturou, že výskyt mutace c.7544_7545delCT v PEST doméně NOTCH1 genu u CLL nemocných je úzce spojená s nemutovaným stavem IgVH a trizomií 12. Opakované vyšetření nemocných po léčbě ukázalo vymizení mutace u pacientů, kteří po léčbě dosáhli kompletní nebo parciální remise. Richterova transformace nebyla prokázána u žádného pacienta s mutací v NOTCH1 genu. Práce je podporována granty: IGA MZ ČR NT 13576 a IGA-LF-2014-001.

P46/2540.

ArrayCGH analýza delecí chromosomu 13q u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií

Krůzová L., Holzerová M., Hrubá M., Mikešová M., Urbanová R., Papajík T., Indrák K., Jarošová M. (HOK, FN, Olomouc; HOK, FN, Pízeň)

Nejčastější cytogenetickou abnormalitou detekovanou pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH) je delecie 13q14 vyskytující se u ~50 % CLL pacientů. Jako solo aberace je delecie 13q14 spojována s dobrou prognosou. Prognostický význam dalších změn jako jsou bialelická delecie 13q14, monosomie 13 nebo přestavba chromosomu 13 jsou stále kontroverzní. Snaha o jednoznačné určení rozsahu delecie, o určení významných genů lokalizovaných v deletované oblasti a klinický dopad změn jsou stále předmětem studií. Cílem bylo provést arrayCGH analýzu souboru pacientů s delecí 13q14, určit rozsah delecie a vzájemně porovnat nálezy u pacientů se solo aberací, s delecí 13q14 a jednou přídatnou změnou a u pacientů s komplexními změnami. Současně určit nejmenší deletovanou oblast a rozsah delecí porovnat s některými klinickými parametry. Metodou FISH s panelem CLL sond byl vyšetřen soubor 671 pacientů. Z tohoto souboru bylo 51 pacientů s určenou delecí 13q vyšetřeno metodou arrayCGH (PK 46 pacientů, 4 pacienti KD a u 1 pacient uzlina). V souboru 671 pacientů byla delecie 13q14 určena u 301 (45 %) pacientů. Z nich bylo vyšetřeno metodou arrayCGH 14 pacientů se solo aberací 13q14, 11 pacientů se dvěma změnami a 26 pacientů s komplexními změnami. Soubor tvořilo 38 mužů a 13 žen s mediánem věku 62 let (27 – 86 let). 17 pacientů mělo Binet stádium A, 10 pacientů stádium B, 17 pacientů stádium C a u 7 pacientů není stádium uvedeno. 31 pacientů mělo nemutovaný status IgvH, mutovaný stav 11 a u 9 pacientů nebyl mutační status vyšetřen. Celkem 9 pacientů zemřelo. 10 pacientů mělo bialelickou delecí 13q14, 8 z nich společně s monoalelickou delecí 13q14. arrayCGH určila nejmenší deletovanou oblast o rozsahu 850 kb v oblasti 13q14.2 – 13q14.3, oblast zahrnovala geny MIR15a a MIR16-1, DLEU1, DLEU2, DLEU7. U jednoho pacienta byla delecie 13q zjištěna pouze metodou arrayCGH v oblasti 13q21.1-q21.2 v rozsahu 1,1 Mb. U dvou pacientů byla prokázána monosomie 13. ArrayCGH analýza souboru 51 CLL pacientů s delecí 13q určenou metodou FISH potvrdila velkou heterogenitu v rozsahu delecie. Porovnání nálezů delecie s některými sledovanými parametry jako mutační stav IGVH, klinické stádium, typ 13q delecie a výskytem dalších chromosomových změn, neprokázalo zatím přímou souvislost s rozsahem delecie, pouze u pacientů s komplexními změnami byla pozorována tendence k vyššímu výskytu rozsáhlejších delecí. Tato práce je podpořena granty: IGA MZ ČR NT 13576 a IGA-LF-2014-001.

AKUTNÍ LEUKÉMIE

P47/2646.

Izolovaný myeloidní sarkóm testis a retroperitonea

Martišová M., Roziaková L., Horváthová D., Mistrík M. (Klinika hematologie a transfuziologie LF UK, SZU a UNB, Bratislava – SVK)

WHO klasifikácia z roku 2008 vyčlenila myeloidný sarkóm ako samostatnú entitu myeloidných neoplázií, definovanú prítomnosťou myeloidných blastov s/bez maturácie, formujúcich nádorovú masu deštruujúcu pôvodnú tkanivovú architektúru. Vyskytuje sa v čase diagnózy/relapsu AML, pri transformácii MDS a progresii MPO. Veľmi raritne sa popisuje izolovaný MS, charakterizovaný absenciou AML, MDS aj MPO v trepanobiopťickom vyš., ktorý predchádza vývoju AML v kostnej dreni. Najčastejšou lokalizáciou bývajú mäkké tkanivá, kosti, perióst a lymfatické uzliny. Prognostický význam MS zostáva nejasný – napriek tomu, že extramedulárna manifestácia AML býva asociovaná s horšou prognózou a kratším prežívaním, krivka 5-ročného prežívania s MS dosahuje 20–30%, čo je porovnateľné s AML bez EM šírenia. Predstavujeme kazuistiku 55-ročného pacienta s anamnézou poruchy senzitivity a motoriky PDK a mesiac trvajúceho nebolestivého zväčšenia pravého testis. Histologizácia tumoru po pravostrannej orchiektómii potvrdila dg. myeloidného sarkómu. Hemogram a mikroskopický dif. leukogram boli v čase dg. fyziologické, cytologické a trepanobiopťické vyšetrenie vylúčilo infiltráciu KD primárnou aj sekundárnou malignitou. Na CT brucha bola zachytená retroperitoneálna tumorózna masa šíriaca sa po prednom retroperitoneálnom liste po pravý inguinálny kanál – supponovaná identická malignita (MS). Pri elevácii renálnych parametrov, bola USG vyš. potvrdená dilatácia pravého dutého systému a obraz hydronefrózy II. – III. stupňa v dôsledku externého útlaku ureteru. Počas štandardnej indukčnej CHT (DA 3+7) došlo k normalizácii renálnych parametrov, s takmer kompletnou regresiou hydronefrózy 8. deň po začatí CHT a vymiznutie neurologickej symptomatológie. Tri týždne po ukončení ICHT bola CT vyš. potvrdená výrazná regresia tumoru. Pacient absolvoval 1.konsolidačnú CHT (HD-AraC) s plánovaným využitím regenerácie na zber

autológnych kmeňových buniek, stimulácia G-CSF však nebola úspešná (poor mobilizer). Deväť týždňov po 1.KCHT došlo k zhoršeniu klinického stavu so vzostupom renálnych markerov, obnovením útlakovej symptomatológie a D72/68 po 1.KCHT bola na CT popísaná výrazná progresia nálezů. Cytológia a biopsia KD boli bez dôkazu progresie do AML. Zahájená reindukčná CHT (EMA) mala veľmi komplikovaný priebeh, bez dosiahnutia parciálnej remisie. Zvažovaná paliatívna RAT nebola realizovaná. Pacient exital 9 mesiacov po stanovení dg. bez dokázanej infiltrácie KD neopláziou zo spektra AML.

P48/2638.

Sérové hladiny cytokinů a adhezních molekul u pacientů s akutní myeloidní leukémií s normálním karyotypem

Kupsa T., Vašatová M., Jebavý L., Žák P., Horáček J. M. (Katedra válečného vnitřního lékařství, Kupsa T., Vašatová M., Jebavý L., Žák P., Horáček J. M. (Katedra válečného vnitřního lékařství, Universita obrany Brno, Fakulta vojenského zdravotnictví, Hradec Králové; Ústav klinické biochemie a diagnostiky, FN, Hradec Králové; IV. Interní hematologická klinika, FN a LF UK, Hradec Králové)

Cíl: Zhodnotit sérové koncentrace vybraných cytokinů a adhezních molekul v době diagnózy akutní myeloidní leukémie (AML) a analyzovat změny související s cytogenetickými a molekulárně-genetickými abnormalitami. Metodika: Soubor 51 pacientů s AML byl rozdělen na 2 skupiny zahrnující pacienty s normálním karyotypem (CN-AML, n=24) a cytogenetickou abnormalitou (n=27) v době diagnózy. Tyto skupiny se nelišily věkem (49.8 ± 12.3 vs. 55.3 ± 13.4 let), středním počtem leukocytů (44.8 ± 37.9 vs. 21.0 ± 25.7 x 1000/μL) ani známkami zánětu - CRP (34.7 ± 37.2 vs. 32.4 ± 30.6 mg/L). Dále jsme zhodnotili rozdíly mezi podskupinou s mutovaným NPM 1 (n=5) a podskupinou s mutací v NPM 1 a FLT3-ITD pozitivitou (n=8). Ani tyto podskupiny se nelišily věkem, středním počtem leukocytů nebo CRP. Hodnotili jsme sérové hladiny 22 cytokinů a adhezních molekul: interleukiny (IL-1A, IL-1B, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-23), vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor-alfa (TNF-α), interferon-gama (IFN-γ), epidermal growth factor (EGF), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), E-selektin, L-selektin, P-selektin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Biomarkery byly měřeny za použití biochip array technologie na analyzátoru Evidence Investigator (Randox). Odchyly s (p) < 0.05 byly považovány za statisticky signifikantní. **Výsledky:** Ve skupině CN-AML byly vyšší koncentrace E-selektinu (34.49 ± 18.23 ug/L vs. 13.98 ± 9.11 ug/L; p=0.0002), L-selektinu (2962 ± 706 ug/L vs. 2187 ± 1060 ug/L; p=0.009) a VCAM-1 (855.34 ± 386.02 ug/L vs. 600.73 ± 180.79 ug/L; p=0.04) a zároveň pokles hladin IL-7 (3.12 ± 1.98 ng/L vs. 5.81 ± 3.66 ng/L; p=0.03) a EGF (7.36 ± 7.06 ng/L vs. 21.08 ± 23.98 ng/L; p=0.04). Ve skupině CN-AML se FLT3-ITD pozitivita při mutaci v NPM 1 projevila zvýšením hladin IL-1A (0.66 ± 0.16 ng/L vs. 0.20 ± 0.27 ng/L; p=0.04), IL-4 (1.69 ± 0.89 ng/L vs. 0.34 ± 0.54 ng/L; p=0.046), E-selektinu (54.76 ± 16.32 ug/L vs. 25.06 ± 7.61 ug/L; p=0.01) a P-selektinu (206.21 ± 61.44 ug/L vs. 106.72 ± 29.28 ug/L; p=0.04).

Závěr: Sérové hladiny IL-1A, IL-4, IL-7, EGF, E-, P-, L-selektinu mohou souviset s cytogenetickými a molekulárně-genetickými změnami u AML. K hodnocení prediktivního potenciálu bude třeba dalších studií na větším počtu pacientů.

Práce byla podpořena z Projektu specifického výzkumu „Analýza vybraných prognostických markerů u nemocných s AML“ a z projektu RO 1011 (FVZ).

P49/2625.

Možnosti detekce zlomových míst u přestaveb zahrnujících gen MLL

Žejšková L., Plachý R., Jančušková T., Hardekopf D., Štíka J., Kosyakova N., Liehr T., Zavrhelová A., Žák P., Petečuková V., Novák J., Kozák T., Peková S. (Praha – CZ, Jena –DE, Hradec Králové)

Úvod: Gen MLL (mixed lineage leukemia) se nachází na chromozomu 11 v oblasti 11q23. Přestavby genu MLL s různými fúzními partnery se vyskytují jak u dětských, tak u dospělých pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) i akutní myeloidní leukémií (AML) a patří mezi prognosticky nepříznivé. Detekce minimální reziduální nemoci (MRN) je důležitým nástrojem pro sledování léčebné odpovědi u pacientů s akutní leukémií (AL) a umožňuje rizikovou stratifikaci pacientů. Expresce MLL fúzních transkriptů je obvykle nízká a neumožňuje senzitivní sledování MRN na úrovni mRNA. Možností je identifikace zlomových míst a vyšetřování MRN na DNA úrovni. V této práci bychom chtěli prezentovat naše zkušenosti s mapováním MLL zlomových míst.

Metody: Fúzní transkripty MLL/AF6, MLL/AF9, MLL/AF10 a MLL/ELL byly detekovány v záchytu onemocnění u 4 dospělých pacientů s AML a fúzní transkript MLL/AF4 u 1 dospělého pacienta s ALL. Pro identifi-

fikaci zlomového místa jsme použili 2 různé přístupy. První zahrnoval long-range PCR z intronů spolu se sekvenací získaných produktů, u druhého postupu se využila kombinace konvenční mikrodisekce, sekvenování nové generace a long-range PCR spolu s následnou sekvenací produktů. Získané sekvence byly využity pro návrh pacient-specifické eseje a senzitivní sledování MRN pomocí kvantitativní real-time PCR. Výsledky: S použitím výše uvedených postupů jsme identifikovali zlomová místa přestavby genu MLL u 4 pacientů s AML a 1 pacienta s ALL. Prvním přístupem jsme na nukleotidové úrovni detekovali zlomová místa MLL/AF6, MLL/AF9 a MLL/ELL, druhým přístupem jsme získali sekvence zlomových míst MLL/AF10 a MLL/AF4. Díky identifikaci zlomových míst jsme mohli s vysokou senzitivitou sledovat MRN pomocí kvantitativní real-time PCR. Dynamika počtu reziduálních buněk korelovala s klinickým průběhem onemocnění.

Závěr: Přestavby genu MLL mohou být detekovány různými metodami (např. inverzní PCR, pan-handle PCR). Naše výsledky ukazují další možnosti identifikace přestavby zahrnujících gen MLL nezbytných pro přípravu pacient-specifické eseje pro senzitivní sledování MRN u pacientů s AL.

P50/2557.

Incidence infiltrace CNS u akutní lymfoblastické leukémie a korelace výsledků zobrazovacích metod CNS, flowcytometrie a cytologie likvoru

Zábranská T., Jungová A., Jindra P. (Plzeň)

Úvod: Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) je maligní onemocnění charakterizované proliferací nezralé lymfoidní populace. Incidence onemocnění je v ČR 1,2 případů/100 000 obyvatel a celk. cca 20 % všech akutních leukémií. Infiltrace CNS, bývá přítomna u asi 10% pacientů s ALL a je považována za prognosticky nepříznivý faktor. Diagnóza infiltrace CNS byla dosud primárně definována nálezem elementů v likvoru (CSF), nicméně toto vyšetření je málo citlivé a proto jsou doplňována další vyšetření, především zobrazovací (CT/MRI) a případně cytoflowmetrické vyšetření (FACS) CSF.

Cíl: porovnání jednotlivých vyš. metod postižení CNS u ALL (CT/MRI vs FACS vs klasická cytologie) Soubor pacientů: Provedli jsme retrospektivní analýzu 77 pacientů s ALL konsekutivně diagnostikovaných v letech 2003-2013 u kterých byl alespoň některou z uvedených metodik vyšetřována infiltrace CNS. Přítomnost infiltrace byla definován jako pozitivita alespoň jedné z uvedených metodik a byla zaznamenána u 14 pacientů (20%). Celkově jsme zaznamenali celkem 20 pozitivních případů infiltrace CNS (u 5 pacientů opak. relapsy).

Výsledky: Z celkem 20 pozitivních záchytů infiltrace CNS u 14 pacientů, bylo u všech provedeno FACS CSF spolu s cytologií CSF, CT/MRI bylo provedeno pouze u 16 případů. Cytologie byla pozitivní u 17/20 (85%) s průměrným množstvím elementů v CSF 1205 elementů/ul (1-4533). U cytologicky pozitivních byl vždy pozitivní i FACS (17/20, 85%), zatímco CT/MRI bylo současně pozitivní pouze u 8 z této skupiny (8/17, 47%). Současná pozitivita všemi metodikami byla u 8/20 (40%). U 5/17 (29%) cytologicky/FACS pozitivních bylo CT/MRI negativní. Pozitivní CT/MRI při současně negativitě cytologie a FACS bylo u 3/16 případů kde bylo CT/MRI prováděno (19%).

Medián PFS a OS u CNS pozitivních byl 6 měsíců (4-18), respektive 17 měs.(1-28). U CNS negativních byl PFS 13 měs.(3-118, p=0.05) a OS 20 měs.(1-118, p=0.15).

Závěr: Naš malý soubor potvrzuje obtížnost jednoznačného stanovení infiltrace CNS a dokládá vhodnost současného ověření více metodikami. Nejcitlivější zůstává kombinace cytologie a FACS analýzy, nicméně i zobrazovací metody přispívají k vyšší citlivosti. Byl zaznamenán trend k horšímu přežití u pacientů s infiltrační CNS.

P51/2534.

CD22 jako cíl pro specifickou eliminaci leukemických blastů ve studii IntReALL

Kanderová V., Kužílková D., Hrušák O., Mejstříková E. (Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK a FN Motol, CLIP-Cytometrie, Praha)

CD22, znak B-buněk, je využíván jako cíl pro specifickou terapii humanizovanou anti-CD22 monoklonální protilátkou epratuzumabem. Byl prokázán klinický efekt jak u autoimunitních onemocnění (např. SLE), tak i některých malignit, např. B-NHL. V současné době je plánována studie pro relapsy BCP ALL, kde se plánuje zapojení epratuzumabu v postindukční fázi léčby. Přesný mechanismus účinku epratuzumabu a vliv chemoterapie na expresi molekuly CD22 na leukemických blastech však zatím popsány nejsou. V pilotních experimentech jsme určením viability a měřením absolutních počtů živých buněk v kultuře identifikovali rezistentní leukemické linie (n=3) a linie, které vykazují částečnou

rezistenci na působení epratuzumabu (n=2). Pro další experimenty jsme zvolili B-lymfocyty izolované z periferní krve zdravých dárců (n=3), kde epratuzumab významně snižoval počet živých buněk (p<0.05). Protože molekula CD22 vykazuje rychlý „turnover“ na buněčném povrchu, testovali jsme i závislost exprese CD22 na teplotě, při které je vzorek protilátkou značen (37, 25 a 4°C). Snižující se teplota výrazně snižovala expresi CD22 (nebo afinitu použitých protilátek – epratuzumabu a klonu S-HCL-1) (n=3). Dále jsme testovali kompetici obou klonů o epitopy na molekule CD22. Zjistili jsme, že se oba klony vzájemně zcela neblokují, vazba epratuzumabu je ale částečně snížena. Expresi CD22 na leukemických buňkách je tedy nutné měřit nezávisle oběma klony protilátek (epratuzumab a SHCL-1) při pokojové teplotě. Pro přesnou léčebnou dávku epratuzumabu je dále nutné expresi CD22 kvantifikovat. Otestovali jsme několik kvantifikačních postupů: měření PE Quantibrite beads, CST beads a porovnání s nemaligní kontrolní populací (zdravé B-lymfocyty). Z průběžných dat se zdá být optimálním využití zdravé kontrolní populace, exprese CD22 na zralých B-buňkách je srovnatelná mezi jednotlivci (n=11). Expresi CD22 při diagnóze BCP ALL je detekovatelná u většiny pacientů (> 98%), vzácné výjimky tvoří někteří pacienti s proB ALL. Buněčnou signalizaci mediovanou epratuzumabem sledujeme pomocí tzv. single cell fosfo analýzy v časových bodech 0.5–15min po vazbě epratuzumabu na CD22. V pozdějších časových bodech (15–30min) dochází k internalizaci CD22 do nitrobuňkových kompartmentů (měřeno konfokální mikroskopii). Efekt epratuzumabu na expresi molekuly CD22 na leukemických buňkách a signalizační mechanismy jím spouštěné jsou velmi důležitou součástí hodnocení účinku cíleného léčiva. FP7 IntreALL, IGA NT13462, GAUK596912.

TRANSFUZNÍ PROBLEMATIKA

P53/2649.

Granulocytferéza s použitím Voluven : Čo ďalej v Slovenskej Republike?

Choudhury S., Samcová G., Sviteková K. (Národná transfúzna služba, Bratislava-Ružinov – SVK)

Úvod: Poster porovnáva dva hydroxyetylškrobové roztoky s priemernou molekulovou hmotnosťou 200000 Da (HAES-steril 10%) a 130 000 Da (Voluven 10%) pri produktívnej granuloctyferéze so separátrom Cobe Spectra u darcov stimulovaných Filgrastimom 480 µg s.c. Hydroxyetylškroby sa reverzibilne viažu počas granulocytferézy a ich molekulová hmotnosť vyjadrená v daltonoch má vplyv na výslednú výťažnosť granulocytov. Dôvodom použitia hydroxyetylškrobu s nižšou molekulovou hmotnosťou bola skutočnosť, že dodávateľská firma stiahla z trhu roztoky s vyššou molekulovou hmotnosťou. Metodika – Porovnávali sme výťažnosť počtu granulocytov v TU z 26 granulocytferéz za obdobie od 02.07.2012 do 28.02.2013 s použitím HAES – Steril 10% a výťažnosť 36 granulocytferéz za obdobie 11.4.2014 do 28.02.2014 s použitím Voluven 10%. Porovnali sme iba granulocytferézy, pri ktorých bol použitý Filgrastim ako rastový faktor.

Výsledky: Priemerná výťažnosť pri hydroxyetylškrobových roztokoch s 200 000 daltonovou molekulovou hmotnosťou bola 3,27 x1010/ TU a pri pri hydroxyetylškrobových roztokoch s 130 000 daltonovou molekulovou hmotnosťou bolo 2,41x1010/TU. Zo všetkých produktov s použitím Voluven 10% až 91,67 % produktov spĺňalo európske odporúčanie pre minimálne množstvo granulocytov t.j. 1 x 1010/ TU (3x za 36 granulocytferéz nedosiahli minimálne množstvo). Komplikácie a vedľajšie účinky počas granulocytferézy sa u darcov významne nelíšili.

Záver: Granulocytové koncentráty z aferézy majú svoje miesto pri indikovaných prípadoch pri lokalizovaných zápaloch pri neutropénii. Predpokladaná nižšia výťažnosť pri použití 130 000 daltonových hydroxyetylškrobových roztokov sme upozornili aj kliniky pri objednávke granulocytferézy. Viaceré analýzy z minulosti ukázali, že úspešnosť transfúzie granulocytov mohla súvisieť s množstvom separovaných granulocytov v produkte. Pri nižších výťažnostiach po použití hydroxyetylškrobových roztokov s molekulovou hmotnosťou 130 000 daltonov sa pri granulocytferéze otvárajú otázky pre všetkých zúčastnených o transfúzii granulocytov. Zároveň sa vyskytujú aj etické otázky v súvislosti so stimuláciou zdravých darcov pred granulocytferézou, nakoľko slovenské smernice umožňujú stimulácie zdravých darcov pred produktívnou granulocytferézou v indikovaných prípadoch.

Změny komplementu a rheologických faktorů po rheoferéze.

Bláha M., Dršata J., Andrýs C., Lánská M., Langrová H. (4. interní hematologická klinika, LF UK a FN, Hradec Králové)

Úvod: Náš pracovní tým se dlouhodobě zabývá léčbou pomocí rheoterapie. Jejím efektem je snížení viskozity plazmy a krve; vznikají také příznivé změny cytokinů a odhezných molekul, zvýšená produkce NO endotelem i zlepšení deformability erytrocytů. Nalezli jsme pozitivní vliv rheoferézy (RHF) na pacienty s dyslipoproteinemi, poruchami prokrvení periferních cév, očními chorobami a akutní ztrátou sluchu. V posledních 10 letech však vyšla řada prací, které se zabývají úlohou komplementu při poruchách mikrocirkulace. Pokud jde ale o změny složek komplementu po RHF – podrobné údaje v literatuře dosud chybí. Účelem této práce bylo zjistit, jak RHF ovlivňuje složky komplementu a základní reologické ukazatele.

Pacienti a metody: R. 2012–2013 jsme léčili RHF 32 nemocných, a to 16 pacientů s věkem podmíněnou degenerací sítnice (AMD) – 10 mužů a 6 žen v průměrném věku 69,7 + 6,06 let (62 – 87) a 16 pacientů s akutní ztrátou sluchu – 11 mužů a 5 žen ve věku 56,4 + 11,5 let (34 – 73). Naše modifikace léčby RHF: adaptace dvojité plazmaferézy (double plasma filtration) – plazma se získává při naší modifikaci nikoliv filtrací, ale centrifugací. Aktivita komplementového systému byla analyzována ELISA technikou. Faktor H byl stanoven pomocí jednoduché radiální imunodifuze.

Výsledky: Byly hodnoceny párové vzorky, odebrané vždy před a po RHF, změřené dvakrát. Po RHF došlo k statisticky významnému poklesu u všech tří klasických cest aktivace komplementu ($p < 0,0001$). Poklesla i aktivita složky H komplementu ($p < 0,0001$).

Závěr: Rheoferéza vede k poklesu aktivity sledovaných složek komplementu. Zjištěné výsledky mají v současnosti již nejen výzkumný, ale i praktický klinický význam, protože jsou již vyvíjeny léky pro obnovení rovnováhy v aktivitě složek komplementu – výsledky jsou využitelné při hledání léčebných kombinací k ustavení výhodnější rovnováhy složek komplementu. Jde o nový přístup k prevenci a léčbě uvedených poruch v mikrocirkulaci.

PODĚKOVÁNÍ: Práce byla podporována granty MZ ČR Prvok P37-4, 12 a IGA NT/14037-3, NT/12287-5, NT/13475-4.

P55/2537.**DMT1-mutant erythrocytes have shortened life span, accelerated glycolysis and increased oxidative stress**

Zidova Z., Koralkova P., Mojzíkova R., Kapralova K., Dolezal D., Divoky V., Horvathova M. (Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc)

Mutations in divalent metal transporter 1 (DMT1) are associated with moderate to severe hypochromic microcytic anemia in human patients and a mouse model – mk/mk mice. We have previously reported that DMT1 deficiency leads to an impaired erythroid differentiation hallmarked by accumulation of immature forms of erythroblast, increased apoptosis of erythroid precursors and suppression of colony-forming capacity of erythroid progenitors that can be corrected by the addition of iron saturated chelate Fe-SiH. In our following studies we focused on mature erythrocytes. We observed an accelerated clearance of fluorescently labeled mk/mk red blood cells (RBC) from circulating blood when compared to wt RBC, which indicates increased destruction of DMT1-mutant erythrocytes in vivo. It is known, that mature RBC retain the ability to undergo stress-induced death (eryptosis). This process may be triggered by iron deficiency. To determine the involvement of eryptosis in mk/mk RBC clearance, RBC were exposed to different stress conditions in vitro. A significantly increased number of Annexin V-positive RBC was detected for mk/mk RBC when compared to wt RBC after 5 and 7 hour exposure to hyperosmotic shock and glucose depletion, respectively. These results indicate shortened life span of DMT1-mutant erythrocytes and their reduced ability to cope with the stress. To unravel the possible underlying mechanisms we focus on two processes important for RBC survival; anti-oxidative defense and anaerobic glycolysis. We observed 1.5 to 2-fold higher activity of glutathione peroxidase, catalase and methemoglobin reductase and elevated levels of methemoglobin in mk/mk RBC in comparison to wt RBC, indicating increased oxidative stress in mk/mk RBC. Increased activity of hexokinase (2.5 times) and pyruvatekinase (2.4 times) together with reduced ratio of ATP/ADP in mk/mk mice compared with wt mice (from $2.89 \pm 0.56 \mu\text{mol/L}$ to $1.71 \pm 0.49 \mu\text{mol/L}$) shows enhanced demand for glycolytically

derived ATP to maintain the stability of RBC membrane in mk/mk mice. Our analyzes suggest that DMT1 deficiency negatively affects metabolism and life span of mature erythrocytes; two other aspects of defective erythropoiesis contributing to the pathophysiology of the disease.

Grant support: Czech Grant Agency, grant No. P305/11/1745; Ministry of Health Czech Republic Grant No. NT13587 and Internal Grant of Palacky University Olomouc (LF_2014_011).

P56/2577.**Bifázické koagulační křivky u aPTT v diagnostice různých typů inhibitorů**

Janek D., Slavík L., Úlehlová J., Krčová V., Pospíšilová D., Procházková J., Hluší A.

(Nemocnice, Karviná-Ráj; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Dětská klinika, FN, Olomouc)

Jednou z výhod použití optických koagulometrů je možnost vizualizace průběhu koagulační reakce. Křivky optické propustnosti vzorků zobrazují průběh koagulační reakce, zejména začátek, rychlost a konec tvorby sraženiny. Analýza atypických křivek (waveform analysis) poskytuje další přídavné informace o hemokoagulačním procesu u konkrétního pacienta. Atypický bifázický průběh primární křivky aPTT testu (BPW – biphasic transmittance waveform) se dle literárních zdrojů v minulosti mohl použít jako dobrý prediktor disseminované intravaskulární koagulace. Poslední generace koagulometrů navíc disponuje detekcí vzniku koagula pomocí první a druhé derivace měření optické propustnosti vzorků. V našem kazuistickém sdělení bychom chtěli demonstrovat využití této funkce na atypických křivkách pro detekci inhibitoru u pacientů s hemofilii A, s inhibitory charakteru lupus antikoagulans, pacientů s von Willebrandovou chorobou a pacientů s deficitem f. XII.

Závěr: Nové softwarové možnosti koagulometrů využívající kombinace I. a II. derivace koagulačních křivek mohou při vhodném nastavení přístroje 1) upozornit na atypický průběh detekce 2) umožnit analýzu atypických vzorků na přítomnost defektu 3) zachytit vyšší procento koagulačních poruch.

POUZE K PUBLIKACI**2574.****Eosinofilie u polymorbidního pacienta předcházela klinické projevy alergie o 18 týdnů**

Černá M., Repovský Š., Chrástský C. (Hematologicko-Transfuzní oddělení a Interní oddělení, Středomoravská nemocniční a.s., Nemocnice Přerov o.z.)

Pacient s anamnézou revmatoidní artritidy na Salazopyrinu a ICHS arytmiické formy s ablaci a implantací PM v 2009 prodělal v 3/10 masivní spontánní embolii plicní se zdrojem HŽT v. poplitea l.sin. Byl warfarinizován do 3/12 s převodem na ASA, antikoagulační léčba byla warfarinem muse-la být opakovaně přerušena s převedením na Fraxiparine inj. pro recidivující těžké hematurie při nefrolithiasis, která bohužel není k chirurgickému řešení. V 3/13 byla diagnostikována recidiva embolie plicní a pacient byl léčen terapeutickou dávkou LMWH. Od prvních kontrol KO od 4.4.2013 dochází postupně k progresi eosinofilie s hodnotami až $4,08 \times 10^9/l$ v 8/13. Byl komplexně vyšetřen včetně CT břicha, medistina a plic či vyšetření na parazity s negativními nálezy. Koncem 8/13 se začaly u pacienta objevovat svědivé zarudnutí po aplikacích Fraxiparine inj. Po převedení na Clexane inj. rychle vymizely tyto potíže a došlo také regrese eosinofilie do normálních hodnot.

BAČOVSKÝ J.....	30
BALHÁREK T.....	25
BELADA D.....	35
BĚLOHLÁVKOVÁ P.....	20
BLÁHA M.....	79
BOJTÁROVÁ E.....	15
BOKOROVÁ R.....	58
CMUNT E.....	68
CROSS N.C.P.....	9, 18
ČEPELOVÁ M.....	3
ČERMÁK J.....	46
DĚDEČKOVÁ K.....	13
DIVOKÁ M.....	55
DYNTEROVÁ A.....	21
ENGERT A.....	2
FABER E.....	2, 62
FARKAŠOVÁ A.....	37
FLODR P.....	68
FRIDRICHOVÁ H.....	35
FRYČOVÁ M.....	32
GARCIA-SANTOS D.....	3
GROSSOVÁ KLEMENTOVÁ R.....	7
HÁJKOVÁ H.....	9
HANUŠOVSKÁ E.....	60
HAUEROVÁ M.....	34
HEŘMANOVÁ I.....	9

HLINKOVÁ P.....	8, 50
HLUŠÍ A.....	46
HOLZEROVÁ M.....	74
HONČÍKOVÁ M.....	20
HORÁČEK J. M.....	39
HORVÁTHOVÁ D.....	38
HRUBIŠKO M.....	75
CHOUDHURY S.....	79
JANČUŠKOVÁ T.....	41
JANEK D.....	80
JAROŠOVÁ M.....	43
JONÁŠOVÁ A.....	24
JURÁŇOVÁ J.....	34
KALINOVÁ M.....	71
KALMANOVÁ P.....	33
KANDEROVÁ V.....	78
KANTOROVÁ B.....	44
KAPRALOVA K.....	4
KARAS M.....	16
KOŘALKOVÁ P.....	5
KOŘEN J.....	22
KOTROVÁ M.,.....	40
KRÁL Z.....	3
KREJČÍ M.....	29
KRPATOVÁ J.....	7
KRŮZOVÁ L.....	76

KUBA A.....	17, 61
KUBICZKOVÁ L.....	67
KUPSA T.....	77
KYNCLOVÁ E.....	49
LINHARTOVÁ J.....	18
LIPŠIC T.....	45
LOVAŠTIKOVÁ J.....	49
LUKAČKOVÁ R.....	59
MAISNAR V.....	28
MAREČKOVÁ J.....	11
MARKOVÁ J.....	3
MARTIŠOVÁ M.....	77
MASOPUST J.....	47
MIČÁK J.....	71
MIČOVÁ K.....	18
MICHALKA J.....	69
MIKEŠOVÁ M.....	70
MINAŘÍK J.....	30, 65, 66
MISTRÍK M.....	14
MOCIKOVÁ H.....	2, 14
MOHAMMADOVÁ L.....	24
MOTYČKOVÁ M.....	73
MRAZ M.....	11
MRÁZEK F.....	53
NAVRÁTILOVÁ J.....	58
NĚMČANSKÁ I.....	51

NEUWIRTOVÁ R.....	25
NOSÁL M.....	64, 70
NOVÁK M.....	74
NOVÁKOVÁ M.....	57
OBR A.....	36
PALOVÁ M.....	63
PAPAJÍK T.....	2
PIKA T.....	31, 65
PLANK L.....	2
PLICKA L.....	22
POCZATKOVÁ H.....	76
POHLREICH D.....	23
POSPISILOVA D.....	4
PREKOPOVÁ I.....	21
PROCHÁZKA V.....	3
RAIDA L.....	23
ROHOŇ P.....	27
ROZIAKOVÁ L.....	52
SEDLÁK F.....	38
SCHNEIDEROVÁ P.....	44
SKOUMALOVÁ I.....	52, 61
SLÁMOVÁ L.....	10
SMETANA K.....	45
SMOLEJ L.....	42
SNINSKÁ Z.....	62
STAROSTKA D.....	55

STAROSTOVÁ L.....	50
STARÝ J.....	26
STRAUB J.....	28
STRNKOVÁ A.....	57
SÝKOROVÁ Z.....	6
SZOTKOWSKÁ R.....	53
SZOTKOWSKI T.....	39
ŠEMROVÁ L.....	6
ŠIMEČKOVÁ R.....	20
ŠIŠKOVÁ M.....	19
ŠMARDOVÁ L.....	11, 14
ŠTĚPÁNKOVÁ P.....	23
ŠUSTEK P.....	11
TUČKOVÁ G.....	33
TURCSÁNYI P.....	69
URBANOVÁ J.....	49
URBANOVÁ R.....	42
VAŠEKOVA P.....	56
VÉVODA J.....	8
VÍTKOVÁ J.....	12
VOČKOVÁ P.....	36
VODÁREK P.....	73
VODIČKOVÁ M.....	50
VODIČKOVÁ P.....	12
VOKURKA S.....	6, 13
VRANÁ M.....	17

VRBOVÁ J.....	32
VRBOVÁ O.....	22
ZEMANOVÁ Z.....	27
ZIDOVA Z.....	80
ŽÁK P.....	15
ŽEJŠKOVÁ L.....	40
ŽUPKOVÁ M.....	60

