

RÁDI VÁS V OLOMOUCI UVIDÍME
I PŘÍŠTÍ ROK



**XXX. Olomoucké hematologické dny
s mezinárodní účastí**

29. – 31. 5. 2016
www.olhemdny.cz



SBORNÍK ABSTRAKT



**XXIX. Olomoucké hematologické dny
s mezinárodní účastí**

**XIX. Konference ošetrovatelství
a zdravotních laborantů**

**8th Symposium on Advances
in Molecular Hematology**

SBORNÍK ABSTRAKT  XXIX. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí



Haimaom
Nabízejí na podporu transplantace kostní dřeně

www.olhemdny.cz



**31. 5. – 2. 6. 2015 / Olomouc
NH Olomouc Congress a OMEGA centrum**

POŘADAJÍ

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



Lékařská fakulta
Univerzity Palackého
v Olomouci

Haimaom
Nadace na podporu transplantace kostní dřeně

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

Gilead Sciences s.r.o. / Novartis s.r.o. / Roche s.r.o.



HLAVNÍ PARTNEŘI

Bristol-Myers Squibb s.r.o. / Janssen-Cilag s.r.o. / Takeda Pharmaceuticals Czech Republic s.r.o.



VÝZNAMNÍ PARTNEŘI

Alexion Pharma Czech s.r.o. / AMGEN s.r.o. / Angelini Pharma ČR s.r.o. / Pfizer Inc.
/ Sysmex CZ s.r.o. / Terumo BCT Europe N.V.



PARTNEŘI

AOP Orphan Pharmaceuticals AG - org.sl. / Astellas Pharma s.r.o. / Baxter Czech s.r.o. / Beckman Coulter Česká republika s.r.o. / BIOHEM s.r.o. / Biomedica ČS s.r.o. / Celgene s.r.o. / CSL BEHRING s.r.o. / DS Soft Olomouc s.r.o. / Exbio Praha a.s. / Farmakoterapie / Fresenius Kabi s.r.o. / GRIFOLS s.r.o. / Hospira Czech Republic s.r.o. / I.T.A.-Intertact s.r.o. / LYMFOM HELP, o.s. / Medesa s.r.o. / Medista s.r.o. / Megabooks CZ s.r.o. / Merck Sharp & Dohme s.r.o. / Octapharma CZ s.r.o. / Olympus Czech Group s.r.o. člen koncernu / Sandoz s.r.o. / Sarstedt s.r.o. / Solen s.r.o. / Teva Pharmaceuticals CR / The Binding Site s.r.o. / Werfen Czech s.r.o.

ZA PODPORY



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

OBSAH

PREZIDENTSKÉ SYMPOZIUM	2
WIEDERMANNNOVA PŘEDNÁŠKA	3
MDS/AA	3
MDS/AA/PNH	3
KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ 1	5
ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY 1	7
KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ 2	10
ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY 2	13
KONFERENCE – ZDRAVOTNÍ LABORANTI 1	17
CLL	19
MONOKLONÁLNÍ GAMAPATIE 1	22
AKUTNÍ LEUKÉMIE	25
KONFERENCE – ZDRAVOTNÍ LABORANTI 2	28
CML/PH- MPN	30
MONOKLONÁLNÍ GAMAPATIE 2	33
MDS	36
MALIGNÍ LYMFOMY 1	41
TRANSPLANTACE 1	43
MALIGNÍ LYMFOMY 2	47
TRANSPLANTACE 2	49

POSTERY

OŠETŘOVATELSTVÍ A ZDRAVOTNÍ LABORANTI	53
ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY	54
CLL	55
CML/PH-MPN	58
MONOKLONÁLNÍ GAMAPATIE	59
AKUTNÍ LEUKEMIE	65
MDS	65
MALIGNÍ LYMFOMY	69
TRANSPLANTACE	73
VARIA	74

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.

PREZIDENTSKÉ SYMPOZIUM

2791.

TTP – urgentní diagnostický a léčebný problém
Indrák K., Hluší A. (HOK, FNOL a LF UP, Olomouc)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2807.

Autoimunitní hemolytické anemie v roce 2015
Čermák J., Písačka M. (UHKT, Praha)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2817.

Moderní diagnostika a léčba ITP
Červinek L. (IHOK, Brno)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2731.

Vyšetření kinetiky trombocytů – využití v klinické praxi, vlastní zkušenosti
Hluší A., Papajik T. (Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc)

Úvod: sledování kinetiky trombocytů u pacientů s trombocytopenií patří mezi méně častá vyšetření, metoda není pro řadu pracovišť běžně dostupná. Existují dva základní přístupy v provedení trombocytárních kinetických studií: využití radioaktivně značených (^{111}In a ^{51}Cr) autologních nebo alogenních trombocytů. V práci analyzujeme výsledky a přínos vyšetření přežívání Tr v souboru pacientů sledovaných na našem pracovišti. Metoda: retrospektivní analýza 66 případů pacientů vyšetřených ve FN Olomouc. K vyšetření trombocytární kinetiky byly použity ^{51}Cr značené alogenní trombocyty získané z buffy-coatu od dvou dárců. Při vlastním vyšetření jsou ex vivo radionuklidem označené Tr reinfundovány pacientovi do oběhu. Následně při subsekventním scintigrafickém skenování je vypočítána doba přežívání Tr a je identifikováno místo jejich destrukce. Charakteristika souboru: vyšetřeno bylo 66 pacientů s trombocytopenií, 32 žen, 34 mužů s mediánem věku 50 let (6-82). Ve 33 případech šlo i primární ITP (akutní 4, perzistentní 7, chronická 22), v 15 případech o sekundární ITP (asociovaná s lymfoproliferací nebo revmatickým onemocněním). U 18 pacientů bylo vyšetření indikováno v rámci dif. diagnostiky nejasné trombocytopenie. Výsledky: Z celkového počtu pacientů bylo zkrácené přežívání krevních destiček prokázáno u 45 (68%), výrazně zkrácené přežívání Tr pod 1 den bylo zjištěno u 31 případů (47%). Analýza výsledků skupiny pacientů s prim. ITP prokázala zkrácené přežívání Tr u všech případů. Typ sekvestrace Tr byl v 67% čistě splenický, v 21% predominantně splenický, v 6% smíšený a v 6% hepatální. Splenektomií podstoupilo 11 pacientů. U 4 pacientů výsledek vyšetření vedl k rozhodnutí o neprovedení SE. Všichni splenektomovaní s čistě splenickým typem sekvestrace dosáhli trvalé CR. V podskupině s ITP bylo přežívání významně zkráceno u 10 pacientů, výsledek vyšetření vedl k indikaci SE u 3 případů. Ve třetí podskupině pacientů s nejasnou trombocytopenií bylo zkrácené přežívání potvrzeno v 6 případech. Závěr: Výsledek vyšetření může pomoci zpřesnit a zefektivnit diagnosticko-terapeutický proces. Dle našich zkušeností je provedení trombocytární kinetické studie přínosné zejména pro dif. dg. nejasné trombocytopenie a jako doplňující instrument pro predikci úspěšnosti SE v případech s čistě nebo predominantně splenickou sekvestrací Tr. Vyšetření přežívání trombocytů nepatří mezi standardní, běžně dostupné metody. Rutinní vyšetřování není dle platných guidelines doporučováno.

WIEDERMANNNOVA PŘEDNÁŠKA

2809.

Current concepts in the treatment of MDS
E. Hellström-Lindberg (Dept. of Hematology, Karolinska University Hospital, Stockholm – Sweden)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

MDS/AA

2806.

Současné poznatky o epidemiologii, incidenci a diagnostice MDS
Čermák J. (UHKT, Praha)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2788.

Cytogenetika a molekulární cytogenetika MDS
Jarošová M. (Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2814.

Novinky v patogenezi MDS - mutační analýza
Stopka T. (1. LF UK a VFN, Praha)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

MDS/AA/PNH

2812.

5q- syndrom
Neuwirtová R. (I. interní klinika, VFN, Praha)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2841.

Recent developments in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
Kulasekararaj A. (King's College Hospital, London – UK)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2786.

Aplastické anémie - současné poznatky
Stary J. (Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2720.

Chronická myelomonocytární leukemie - nové pohledy na patogenezi a cílenou léčbu
Rohoň P. (HOK, FN, Olomouc)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

PONDĚLÍ
1. ČERVNA 2015

KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ 1

2672.

Myelodysplastický syndróm - prehľad diagnostiky a liečby

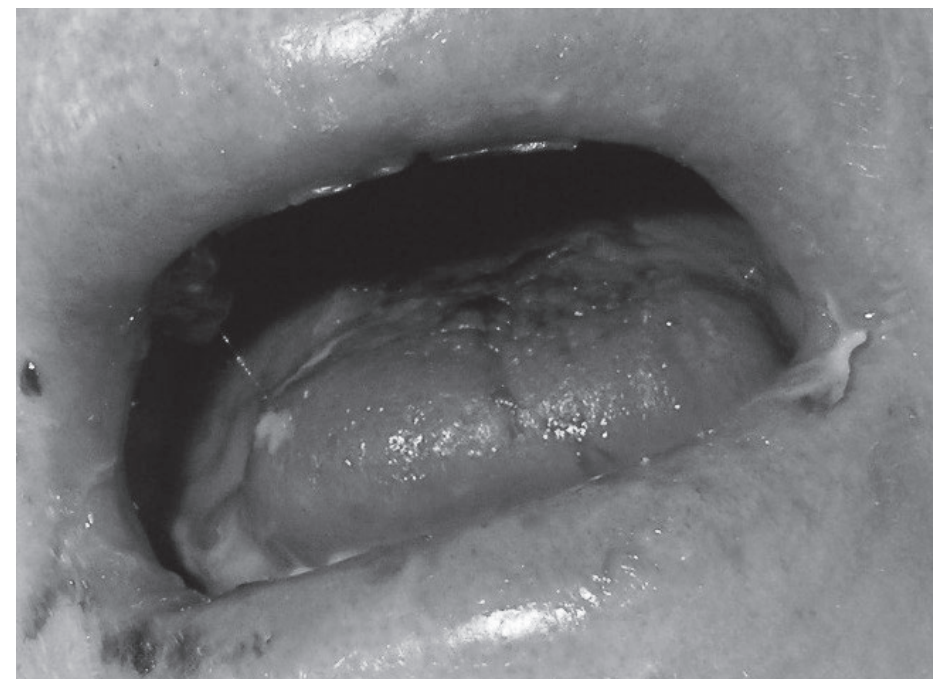
Rohoň P. (Hematoonkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc)

Myelodysplastický syndróm (MDS) zahŕňa skupinu klonálnych ochorení krvotvornej kmeňovej bunky charakterizovaných zvyčajne periférnou (pan)cytopeniou, dysplastickými zmenami prekurzorov v kostnej dreni a zvýšeným rizikom prechodu do akútnej leukémie. Diagnostika MDS je založená predovšetkým na kombinácii laboratórnych vyšetrení (morfológia, cytogenetika, prietoková cytometria, trepanobiopsia, ...). V liečbe MDS boli používané hlavne dve základné modalitty: podporná liečba (prevažná časť pacientov) a alogénna transplantácia krvotvorných kmeňových buniek (mladší pacienti). V súčasnosti sa terapeutické možnosti pre pacientov s MDS rozšírili - používajú sa nové lieky (hypometylačné látky, imunomodulanciá, nové chelátory), ktoré dokážu priaznivo ovplyvniť prirodzený priebeh choroby.

2743.

Péče o dutinu ústní v onkologické léčbě

Vokurka S., Starosta M. (Fakultní nemocnice, Hematologicko-onkologické oddělení, Plzeň; Dialog Jessenius o.p.s., Praha)



Dutina ústní představuje oblast, které je u onkologických a hemato-onkologických pacientů nutno věnovat zvýšenou pozornost. Zásadní je vzájemná spolupráce pacienta a zdravotníků, často napříč spektrem oborů. Postižení dutiny ústní zahrnují poškození způsobené chemoterapií, radioterapií, moderními léky biologické léčby, ale také reakcí štěpu proti hostiteli (GVHD) po alogenní transplantaci krvetvorných buněk, infekce, osteonekrózu čelistí, tumory a jiné. Mukozitida dutiny ústní po chemoterapii nebo radioterapii je zásadním tématem. Postihuje mnohé pacienty a zásadně komplikuje průběh jejich léčby. V možnostech prevence a léčby je vhodné vědět o významu péče stomatologa a/nebo zubního hygienisty, dodržovat opatření, která snižují riziko poškození sliznice stravou,

uplatňovat zásady hygieny chrupu a slizni dutiny ústní s využíváním vhodných přípravků, chladit dutinu ústní při krátké i.v. infuzi alkeranu a fluorouracilu, lokálně aplikovat kortikoidy do místa aftózních defektů obzvláště po léčbě mTOR inhibitory (everolimus), zajistit mírnění bolesti a nutriční příjem. Dialog Jessenius je obecně prospěšná společnost působící od roku 2009 s cílem rozšířit informovanost široké veřejnosti o závažných, především onkologických onemocněních, o možnostech prevence a péče. Projekty jsou zaměřeny na informační kampaně, edukační brožury a semináře pro veřejnost, pacienty, mládež a zdravotníky. Jednou z oblastí zájmu je také problematika péče o dutinu ústní, kde realizace edukačních seminářů a přednášek je doplněna také vydáním skript pro zdravotníky a brožurou pro onkologické pacienty. Skripta jsou určena pro zdravotní sestry, asistentky a ošetřovatelky především v oboru onkologie, hematooonkologie, stomatologie a dentální hygieny. V úvodu seznamují se základy anatomie a mikrobiologie dutiny ústní a s postupem klinického vyšetření. Dominantní částí je problematika postižení dutiny ústní po chemoterapii a radioterapii s uvedením podstaty problému, jeho klinickým obrazem a souvislostmi, s možnostmi prevence, léčby a ošetřování. Uvedena jsou také další významná postižení dutiny ústní, jako jsou infekce, reakce štetu proti hostitelů (GVHD) a osteonekróza čelisti.

2666.

Problematické aspekty při komunikaci sestry - pacient

Hutáková B. (FN, Interní hematologická a onkologická klinika, Brno)

Non-compliance neochota spolupracovat, nevyhovění, nedodržení léčebného režimu. Řadíme sem situace, kdy pacient je neochotný spolupracovat se zdravotnickými pracovníky, neřídí se jejich pokyny, nedodržuje pohybový ani léčebný režim nebo jasně odmítá léčbu. Non-compliance představuje závažný terapeutický problém. Pomocí tří krátkých kazuistik jsme se pokusili objektivizovat míru ošetřovatelské nespokojenosti u pacientů různých věkových skupin a různých diagnóz. První kazuistika se týká mladého muže, který byl hospitalizován jeden měsíc, druhá kazuistika se týká adolescenta, který byl hospitalizován opakovaně a třetí kazuistika se týká muže středního věku, který je hospitalizován doposud bez přestávek a to již 9 měsíců. Tyto kazuistiky potvrzují, že dlouhodobá nespokojenost může vést k psychosomatickým problémům, jak u pacienta, tak u zdravotnického personálu.

2699.

Vliv sociální opory na strach a úzkost ze smrti u seniorů

Vévoda J., Vévodová Š. (Ústav společenských a humanitních věd, Fakulta zdravotnických věd, Univerzita Palackého, Olomouc)

Prodlužování střední délky života je jedním z faktorů ovlivňujících v České republice nepříznivé demografické změny. V příštích několika desetiletích budou narůstat počty seniorů. Rápidní stárnutí populace by mělo být následováno nezbytnými reakcemi zdravotnických a sociálních služeb. Tento stav je jedním z důvodů, proč se u seniorů zabývat sociální oporou a jejím vlivu na míru strachu ze smrti a míru úzkosti. Pro zachování důstojných posledních chvil života je důležité zmapovat a respektovat potřeby, jež pokládají seniori v za důležitější. K pochopení vzájemných vztahů sociální opory, míry úzkosti, míry strachu ze smrti a k identifikaci potřeb umírajících by zvolen kvantitativní výzkum. Použity byly standardizované dotazníky: a) dotazník sociální opory PSSS (Perceived Social Support Scale) J. A. Blumenthala, b) Beckův inventář úzkosti a c) škála Collet-Lester Fear of Death Scale (FODS) zjišťující míru strachu ze smrti. Dále byl použit dotazník vlastní konstrukce zjišťující potřeby na konci života vycházející z potřeb umírajících podle Haškovcové (2007). Zkoumaný soubor tvořilo 106 mužů a 102 žen – seniorů/seniorek, žijících v domácím prostředí na území Olomouckého kraje, ochotných a schopných vyplnit dotazníky. Věkové rozpětí respondentů bylo mezi 65 a 86 lety. Z průměrných hodnot zjištěných dotazníkem FODS (muži 38,4 a ženy 42,2) vyplývá, že větší strach ze smrti mají ženy. U žen byla naopak zjištěna nižší míra úzkosti než u mužů. Tyto rozdíly jsou statisticky významné. Z výsledků dále vyplynulo, že existuje signifikantní negativní korelace mezi mírou sociální opory a mírou úzkosti a mírou strachu ze smrti. Se vzrůstající mírou sociální opory klesá míra úzkosti a strachu ze smrti. Za nejdůležitější potřeby na konci života seniori označili potřebu zemřít v klidu a důstojně, potřebu nezůstat v posledních chvílích sám a potřebu podílet se na rozhodnutích týkajících se jejich péče. Jako nejméně důležitou potřebu z nabízených vnímají

respondenti potřebu hovořit o smyslu života a vyslovit obavy ze smrti, z umírání. Výsledky výzkumu ukázaly, že sociální opora je pro tuto skupinu absolutní nezbytností, což dokresluje jedna ze zjištěných nejdůležitějších potřeb seniorů - nezůstat sám. Zjištění výzkumu, přestože jej nelze vnímat jako plně reprezentativní, spolu se zhoršující se demografickou situací, by měly přimět politické aktéry ke zvýšení pozornosti vztahující se k otázkám podpory sociální opory a jejímu poskytování na laické i profesionální úrovni.

ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY 1

2693.

Signaling downstream of CALR and JAK2V617F - implications for disease development

Kralovics R. (Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, Vienna – Austria)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2714.

Inflammatory response of polycythemia vera hematopoietic progenitors differentiated from patient-specific induced pluripotent stem cells

Stetka J., Luzna P., Lanikova L., Bartek J., Divoky V. (Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry Palacky University, Olomouc – CZ; Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc – CZ; Laboratory of Cell and Developmental Biology, Institute of Molecular Genetics of the ASCR Praha – CZ; Danish Cancer Society Research Center, DK-2100, Copenhagen – Denmark)

Clinical observations recognize chronic inflammation as a component of development and progression of JAK2 V617F mutation-positive polycythemia vera (PV). We used induced pluripotent stem cell (iPSC) clones with distinct JAK2 genotypes derived from PV patient and immunohistochemistry staining (IHC) of patients' bone marrow (BM) to determine the hierarchy of inflammatory signature activation. PV iPSC clones (obtained from JT Prchal, Salt Lake City, UT;) were re-differentiated into CD34+ progenitors, analysed for intrinsic expression of inflammatory cytokines and for their inflammatory response to various genotoxic stimuli. We observed significant up-regulation of IFN γ in JAK2 V617F-positive cells compared to wt cells, where its expression shifted from low level expressed gene to highly expressed gene during differentiation. Although IFN γ is a strong inducer of CXCL10 and CXCL9, we have not seen significant up-regulation of their expression, due to regular media exchange or limited amount of cells in the culture, not allowing to reach sufficient IFN γ threshold concentration. We supplemented IFN γ to a media to turn on the IFN γ -mediated transcription. As our IHC in BM of PV patients indicated that fibrotic tissue produces increased amount of TNF α , we also tested the effect of IFN γ in combination with TNF α on the induction of expression of pro-fibrogenic chemokines. We observed a huge up-regulation of CXCL10 and CXCL9 in JAK2 V617F-positive cells in the presence of IFN γ and TNF α compared to wt cells. Combination of IFN γ and TNF α increased expression of their own genes as well, to a significantly higher extent in JAK2 V617F-positive cells in comparison to wt cells. Our previous studies of pre-leukemia mouse model showed that DNA damage response (DDR) selectively activates inflammatory signature of oncogene-positive pre-leukemia cells. We analysed inflammatory cytokine gene expression of JAK2 V617F progenitors after X-ray irradiation. Our analysis revealed minor up-regulation of studied chemokines suggesting their over-expression does not solely depend on robust DNA damage. On the other hand, inflammatory factors reinforce DDR signalling threshold in JAK2 V617F progenitors. Our data suggest that V617F activates inflammatory signature intrinsically in PV progenitors and upon cooperation with other inflammatory factors released by stroma cells, the progenitors gradually progress from proliferative to pro-fibrotic state. Support: Czech Science Foundation 14-10687P.

2749.

Oxidative Stress and Increased Destruction of Red Blood Cells Contribute to the Pathophysiology of Anemia Caused by DMT1 Deficiency

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

Mutations inactivating divalent metal transporter 1 (DMT1) cause moderate to severe hypochromic microcytic anemia in human patients and two rodent models. We have previously shown that DMT1 deficiency impairs erythroid differentiation, induces apoptosis of erythroid precursors and causes the suppression of colony-forming capacity of erythroid progenitors. In further studies we analyzed metabolic processes and survival of erythrocytes (RBC) in order to address potential involvement of erythrocyte defect in the pathophysiology of the disease. It is known that nutritional iron deficiency and certain types of congenital hypochromic anemia are associated with increased levels of reactive oxygen species (ROS) and shortened life span of RBC that can be partially attributed to a programmed cell death of RBC, so called eryptosis. We observed an accelerated clearance of DMT1-mutant RBC from circulating blood in vivo when compared to wt RBC. In vitro, DMT1-mutant RBC showed significantly increased Annexin V binding after exposure to hyperosmotic shock and glucose depletion. These results confirmed increased phosphatidylserine exposure on the membrane of DMT1-mutant erythrocytes and their enhanced susceptibility to stress. Using flow cytometry we detected significantly elevated intracellular Ca²⁺ content in DMT1-mutant RBC when compared to wt RBC, which is consistent with the assumption that eryptosis is triggered via activation of Ca²⁺ cation channels. In addition, DMT1-mutant RBC had higher levels of ROS than wt RBC despite significantly increased activity of anti-oxidative defense enzymes. This indicates that exaggerated anti-oxidative defense in DMT1-mutant RBC is not sufficient to eliminate ROS effectively. The contributing factor, causing ROS generation that exceeds anti-oxidant capacity of the DMT1-mutant erythrocyte defense system, is likely tissue hypoxia, as documented by increased expression of HIF-targets (hypoxia signature genes) in the DMT1-mutant reticulocytes. Furthermore, accelerated anaerobic glycolysis and reduced ATP/ADP ratio detected in DMT1-mutant RBC indicate enhanced demand for ATP to maintain erythrocyte membrane stability. In conclusion we propose that increased oxidative stress and accelerated destruction of RBC contribute to the pathophysiology of anemia caused by DMT1-deficiency. Grant support: Czech Grant Agency, 15-13732S; Ministry of Health Czech Republic, NT13587; Internal Grant of Palacky University Olomouc, IGA_LF_2015_015.

2758.

Rare forms of congenital anemias in the Czech and Slovak populations: Advances in the diagnosis of red blood cell enzymopathies

Kořalková P., Mojzíkova R., Pospíšilová D., Divoká M., Čermák J., Indrák K., Suková M., Timr P., Striežencová L., Lulušová Z., van Wijk R., Divoký V. (Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry Palacky University, Olomouc – CZ; Department of Pediatrics, University Hospital and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc – CZ; Department of Hemato-Oncology, University Hospital and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc – CZ; Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague – CZ; Department of Pediatric Hematology and Oncology of University Hospital Motol, Prague – CZ; Pediatric Department of Hospital, České Budějovice – CZ; Children's Faculty Hospital with Policlinic, Bratislava – SK; Department of Clinical Chemistry and Hematology, University Medical Center, Utrecht – The Netherlands)

Red blood cell (RBC) enzymopathies are rare genetic disorders associated with chronic nonspherocytic hemolytic anemias (HNSHA). The most common enzyme defects are glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and pyruvate kinase (PK) deficiencies. Both disorders have been found to be the most frequent erythroenzymopathies in the Czech and Slovak populations as well. In general, RBC enzymopathies are not characterized by specific abnormalities in RBC morphology. Affected individuals exhibit only common signs of hemolytic anemia (HA). Thus, routinely used hematology methods are unable to point out a particular enzyme defect and RBC enzymopathies are considered a “diagnosis of exclusion”. In 2010, the direct enzyme activity assays have been established in our laboratory. They allow determination of specific activity of twelve RBC enzymes whose malfunction

or deficiency leads to HNSHA. These standardized spectrophotometric enzyme assays together with conventional Sanger sequencing have become an essential diagnostic tool for laboratory diagnosis of RBC enzymopathies. Identification of a causative mutation of a particular gene enables proper genetic counseling which has an important potential for prenatal diagnosis. The standard diagnostic procedure consists of four enzyme activity assays determining activities of G6PD, PK, glucosephosphate isomerase (GPI) and hexokinase (HK). However, a complete panel of RBC enzyme assays is applied in many cases to exclude other but very rare enzymopathies causing HA. Twenty-two patients of Czech and Slovak origin in a cohort of 70 congenital anemia patients were diagnosed with different types of RBC enzymopathies. Except the most common enzymopathies, G6PD and PK deficiencies (6 and 12 cases), 2 families with GPI and 1 family with rare HK deficiency were identified. Both GPI and HK deficiencies were described for the first time in the Czech/Slovak population. In addition, some mutations in genes coding G6PD (F216Y), PK (D293V, R518fs*12) and GPI (S160P, R472C) are novel, not yet described in literature. Direct enzyme activity assays become a gold standard in current clinical practice. Characterization of RBC enzymopathies by biochemical and molecular analyses contributed to understanding of pathophysiology of this disorder and to the improvement of the patients' diagnosis and therapy. Supported by Ministry of Health of Czech Republic, grant NT/13587 and Internal Grant Agency of Palacký University, grant IGA_LF_2015_015.

2832.

KLF1 transcription factor mutation as a rare cause of Congenital dyserythropoietic anemia
Pospíšilová D., Suková M., Starý J., Iolascon A., Mojzíkova R., Divoký V., Tichý T. (Dětská klinika Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice, Olomouc – CZ; Klinika dětské hematologie a onkologie, II. LF UK a Fakultní nemocnice, Praha-Motol – CZ; University of Napoli, Napoli – Italy; Department of Biology, Faculty of Medicine, Palacky University, Olomouc – CZ; Department of Pathology, Faculty of Medicine, Palacky University, Olomouc – CZ)

Introduction. Congenital dyserythropoietic anemia is a rare hereditary blood disorder characterized by ineffective erythropoiesis and typical morphological abnormalities of erythroblasts in the bone marrow which are the cornerstone of diagnosis. In the last decade, a broad spectrum of causative mutations in genes with different physiological functions has been identified in CDA patients: CDAN1, C150RF41, SEC23B, KIF23, GATA1. In 2010, mutation of the gene coding for Krüppel-like factor 1 (KLF1), which regulates the expression of a wide spectrum of genes essential for erythropoiesis, was found in a patient with a severe form of CDA. Since then, four new patients with KLF gene mutation have been described. Case report. The patient was born with severe anemia, severe hyperbilirubinemia, hepatomegaly, hypertrophic cardiomyopathy, no dysmorphic features. Exchange transfusion was performed. At 3 months of age, analysis of bone marrow smears showed marked hyperplasia of the erythroid lineage (68%), with bi- and multinucleated erythroblasts leading to a diagnosis of CDAll. Electron microscopy examination showed various ultrastructural abnormalities, especially atypical nuclear membrane and atypical cisternae. However, no mutation in the CDAN1, C150RF41, SEC23B genes was found. Surprisingly, KLF 1 gene sequence analysis showed heterozygous missense mutation c.973 G>A, p.E325K. This mutation has already been described as causative for CDA IV in one patient [Arnaud (2010) Am J Hum Genet. 87:721-7]. Additionally, polymorphisms in Exon 2 SNP rs2072597 T/C were found. No KLF mutation was found in both parents, so the patient has a de novo mutation. HbF level is 10.8%, GDF15 levels were extremely high, hepcidin levels were low. Interestingly, high level of erythrocyte-deaminase, a typical diagnostic feature for Diamond-Blackfan anemia, was found. The patient, now 8 years old, is fully dependent on transfusions and chelation therapy due to iron overload. Discussion and conclusions. The patient has more severe anemia than previously described patients with KLF1 mutation. This shows big phenotypic variability even in such a small cohort of patients with various KLF1 mutations. The unique features of KLF gene mutations in CDA patients confirm the key role of KLF1 in erythroid differentiation. The study of this disease-causing mutation in KLF1 provides further insights into the roles of this transcription factor during erythropoiesis in humans.

2695.

EONS - Evropská onkologická společnost sester - Co o ní (ne)víte?

Nohavová I. (Společnost pro léčbu závislosti na tabáku, Praha)

EONS (European Oncology Nursing Society, Evropská onkologická společnost sester): nyní slučuje 29 zemí a zastupuje 22 000 onkologických sester. Onkologická sekce České asociace sester je členem od roku 2000 s aktivní spoluprací. EONS pracuje na modelu CARE strategie (Communication, Advocacy, Research, Education), hlavní práce se odvíjí ve jmenovaných čtyřech pracovních skupinách. Aktivity jsou zaměřeny jak na individuální členy a jejich domovské sesterské organizace, tak na snahu ovlivnit evropskou legislativu. EONS nabízí onkologickým sestřím a akademikům mnoho příležitostí, např. různé granty, vzdělávací kurzy, konference a v neposlední řadě příležitosti k individuálnímu zapojení do pracovních skupin a jejich aktivit. Nezanedbatelným přínosem je také rozsáhlá síť evropských kolegů, která vybízí k vzájemné spolupráci. Je škoda, že české onkologické sestry těchto možností zatím plně nevyužívají. Více na <http://www.cancernurse.eu/>

2799. Transfuzní oddělení včera a dnes

Koukalová A., Válková J., Galuszková D. (FNOL, Transfuzní oddělení, Olomouc)

Úvod: Transfuzní oddělení (TO) v Olomouci zahájila činnost v roce 1949 jako součást Krajské nemocnice v Olomouci. Spektrum poskytovaných služeb bylo v rámci nemocnic Olomouckého a Severomoravského kraje. Na TO se pro odběry krve do 90 let používaly skleněné odběrové lahve a výsledným produktem byla plná krev s expirací 21 dnů. V roce 1968 byly zakoupeny velkoobjemové centrifugy, které umožnily výrobu čerstvé mražené plazmy, nativní plazmy a kryoproteinu. Od roku 1975 byl zaveden de leukotizovaný erytrocytární koncentrát. Od roku 1990 nahradily skleněné odběrové lahve jednorázové plastové krevní vaky s expirací 35 dnů. V té době byl zaveden ve výrobě proces šokového mražení plazmy. V roce 1992 byly zakoupeny separátory na plazmu a na trombocyty od firmy Haemonetics. V roce 2003 vytvořen samostatný odběrový sál s 10 automatickými separátory krevních elementů a zahájen léčebný program. V tomto roce bylo provedeno 83 léčebných cytoredukčních erythrocytaferéz u 24 pacientů a téměř 6000 odběrů na 10 automatických separátorech krevních elementů. Dochází k postupnému rozvoji multikomponentního dárcovství. Dnes máme na oddělení 13 separátorů, provádíme ročně 15153 aferetických odběrů. V tabulce č.1 je uveden počet odběrů (vyjma autotransfuzí) v některých letech. Změny v transfuzní službě se dotýkají i způsobu výroby trombocytů. Od 8/2009 zavedena výroba směsných trombocytů. Závěr: Dynamický rozvoj transfuzní medicíny v posledních čtyřiceti letech je charakterizován nejen nárůstem objemu odebrané krve a jejích složek, ale také významnými změnami ve výrobě transfuzních přípravků. Cílem všech zavedených změn je zvýšení bezpečnosti hemoterapie pro pacienty.

	1997	2000	2001	2007	2014
Běžný odběr	13938	13228	12649	10851	11710
Plazmaferéza	3185	508	1798	6603	13658
Trombocytaferéza	1224	1267	1389	1603	1326
Erythrocytaferéza	0	8	113	80	66
celkem	18347	15011	15949	19137	26760

2798.

Porovnání biosimilar Zarzio s Neupogenem

Šemrová L., Hlinková Z., Kaucká D., Chvojková I., Radová V., Hartl P., Němcová A., Brandejsová R., Kabátová Maxová K., Bystřická E., Jungová A., Vokurka S., Jindra P. (Hematologicko-onkologické oddělení, FN, Plzeň)

Filgrastim je lidský růstový faktor stimulující vyzrávání a produkci granulocytů (G-CSF) a je široce používán v rámci prevence a léčby neutropenie po chemoterapii, při mobilizaci a sklizni periferních krvetvorných buněk a k urychlení reparace leukocytů po transplantacích krvetvorných buněk. Neupogen je původní originální růstový faktor filgrastim a Zarzio je podobná, tzv. biosimilar, filgrastim molekula stejného účinku. Je nutné nadále sledovat účinnost a bezpečnost biosimilar léčiv. Kromě pohledu léčebného účinku je ale vhodné věnovat i pozornost zkušenostem z ošetřovatelské problematiky. Z těchto dvou pohledů jsme se rozhodli zhodnotit rozdíl mezi Neupogen inj a Zarzio inj. Byla zhodnocena délka obnovy hladin leukocytů u 148 pacientů po autologní transplantaci krvetvorných buněk, kterým byl podáván Zarzio inj a u 148 pacientů, kterým byl po transplantaci podáván Neupogen inj. Dávka Zarzio a Neupogen byla standardní 5 ug/kg/den s.c. během neutropenie po transplantaci až do dosažení hodnoty neutrofilů $>1,5 \times 10^9/l$. V obou hodnocených skupinách pacientů došlo k obnově počtu neutrofilů $1,0 \times 10^9/l$ průměrně v den 12 (9-14) po transplantaci. Osm sester naší transplantační jednotky dále hodnotilo Zarzio a Neupogen s ohledem na náročnost podmínek skladování, náročnost manipulace, aplikaci, vedlejší účinky a komplikace. Kvalita byla porovnávána za použití stupnice 1-5 (1 = mnohem lepší, 2 = lepší, 3 = stejný; 4 = horší; 5 = mnohem horší). Všechny sestry hodnotily Zarzio vs. Neupogen jako stejné s ohledem na podmínky skladování, aplikace, vedlejší účinky u pacientů (přibližně 10% kostní bolestivost při reparaci krevního obrazu). Ve vztahu k manipulaci hodnotily 4/8 sester Zarzio jako lepší a 3/8 sester pak za mnohem lepší. Zarzio injekce byly hodnoceny jako lepší, respektive bezpečnější pro manipulaci z důvodu automatického bezpečnostního krytu jehly, který zajišťuje ochranu proti poranění injekční jehlou po aplikaci (viz obrázek). Sestry nezaznamenaly žádné technické komplikace spojené s injekcí Neupogen nebo Zarzio, ani žádné významné komplikace a stížnosti u pacientů.



2705.

Brentuximab vedotin - naše zkušenosti s podáním

Starostová L., Uvízlová E., Labudíková M., Papajík T. (HOK, FN, Olomouc)

Hodgkinův lymfom je maligní onemocnění lymfatické tkáně nejčastěji postihující mladé lidi ve třetí a čtvrté dekádě jejich života. Incidence choroby je 2 – 3/100 000 obyvatel/ rok. Současná moderní kombinovaná chemoterapie a RT významně změnila úspěšnost léčby této choroby, neboť již léčbou první linie dosahujeme u 85-90 % pacientů dlouhodobé remise. V případě recidivy je pak až 50 % pacientů vyléčeno podáním záchranné vysokodávkované chemoterapie s následnou autologní transplantací kmenových buněk. Stále nám ale zůstává skupina nemocných, u nichž léčba selhává a jejichž prognóza se stává nepříznivou. Nové léčivo - konjugát protilátky a léku - brentuximab vedotin se pro tuto část pacientů stává velkou nadějí v jejich boji s nemocí. Adcetris se skládá ze tří částí – monoklonální chimérické 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 monomethylaurustinu E. Ten se pak naváže na tubulin, naruší síť mikrotubulů v buňce, vede k zástavě buněčného cyklu a ke smrti nádorové buňky. Ve světě již proběhla řada studií fáze I/II a dle jejich výsledků se podání brentuximab vedotinu ustálilo na dávce 1,8 mg/kg co 3 týdny, v sérii 8 až maximálně 16 cyklů, a to v závislosti na účinnosti léčby nebo na projevech nežádoucích účinků. Lék je aplikován ambulantně formou 30 minutové i.v. infúze, kdy je substance rekonstituována v 250 ml FR. Podaná premedikace je stejná jako u jiných monoklonálních protilátek. Nežádoucí reakce na infuzi byly pozorovány jen asi 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 tedy jeví terapie brentuximab vedotinem jako bezpečná a pacienti dobře tolerovaná. V našem centru byl v časovém období let 2013 – 2015 Adcetris podán 7 pacientům (3 muži a 4 ženy) s mediánem věku 39 let (23 – 44 let). U všech se jednalo o rekurentní chorobu po několika liniích léčby, včetně autologní transplantace kmenových buněk (v 6 případech) a po alogenní transplantaci kmenových buněk (v 1 případě). Podrobné zkušenosti s podáním tohoto léku, s jeho nežádoucími účinky a s efektem léčby u naší skupiny nemocných, pak budou obsahem druhé části prezentovaného sdělení.

2677.

Plazmaferéza a její význam

Jaklová Z. (III. interní klinika FNOL, Olomouc)

Plazmaferéza (PF) je léčebná metoda nahrazující krevní plazmu pacienta substitučním roztokem. Nejčastěji se používá ČMP či 4-5% albumin. Dále potřebujeme vysoce propustnou membránu a přístroj, provádějící PF. Indikací k PF je celá řada, nejčastěji hematologická, neurologická a autoimunitní onemocnění. Prezentuji případ mladé slečny, s dg. trombotická trombocytopenická purpura (TTP). Jde o onemocnění, s patofyziologickým základem tvorby mikrotombů v cévách. Máme dvě formy TTP, vrozenou a získanou. U naší pacientky se jedná o získanou formu TTP, kdy se v těle tvoří protilátky proti proteolytickému enzymu. V laboratoři se prokáže těžká trombocytopenie, hemolytická anemie a přítomnost vysokého titru protilátek. V kazuistickém sdělení vysvětluji princip PF, (příprava plazmy, prezentace přístroje, průběh a její účinnost). Plazmaferéza je léčebný postup, při němž dojde k odebrání, léčbě a následnému navrácení plazmy do krevního oběhu. U pacientky prezentuji průběh hospitalizace a provedené PF, v celkovém počtu 24 provedených výkonů. Kdy v kombinaci s léčebnou terapií na hematologickém oddělení, vedly k remisi onemocnění. Co se týká počtu a porovnání prováděných PF, tak nejvíce jsou zastoupeny autoimunitní onemocnění, dále neurologické a po nich hematologická onemocnění.

2833.

Novinky v profesní organizace sester ČAS - Onkologická sekce

Hrabánková-Navrátilová D., Kajaba V. (1. interní klinika hematologie, VFN, Praha; HOK, FN, Olomouc)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY 2

2789.

Non-invasive detection of genomic imbalances in lymphoma by sequencing of circulating cell-free DNA

Wlodarska I. (Center for Human Genetics, KU Leuven - University of Leuven, University Hospitals Leuven, Leuven – Belgium)

The recently introduced non-invasive prenatal testing (NIPT) for fetal aneuploidy detection is based on the analysis of circulating cell-free DNA (ccfDNA) in maternal plasma by either targeted sequencing or whole genome methods. Using the latter approach, approximately 4000 NIPT were performed in our center. In three cases, we observed aberrant genome representation profiles which could not be attributed to the maternal nor the fetal genomic constitution. Subsequent clinical and pathologic investigations uncovered asymptomatic maternal cancers, diagnosed as ovarian carcinoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin lymphoma (cHL). Further FISH and/or array CGH studies of biopsy specimens showed that the genomic imbalances detected in ccfDNA match with imbalances present in tumor cells. To further investigate the recurrence of this phenomenon in cHL, known to contain <1% of neoplastic Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) cells in tumor mass, ccfDNA was prospectively collected from nine cHL cases (age 12-65 y), at first diagnosis (n=8) or at relapse (n=1). Massive parallel sequencing of ccfDNA identified genomic imbalances in eight cases. These aberrations have been further extensively validated by FISH analysis of HRS cells in tumor specimens. The combination of FISH with CD30 immunostaining showed the giant cells with abnormal hybridization patterns to be CD30-positive, identifying them unequivocally as HRS cells. The striking overall agreement between the genomic imbalances in ccfDNA and those in HRS cells found by FISH, cogently proves that ccfDNA contains DNA derived from HRS cells. All patients, including the pregnant patient, were treated with ABVD-based chemotherapy and all responded as shown by early clinical and imaging evaluation. This was paralleled by rapid normalization of ccfDNA profiles upon therapy initiation in all cases, underscoring the link between the abnormal ccfDNA profiles and the HRS cell burden. Altogether, non-invasive massive parallel sequencing of ccfDNA allows a pre-symptomatic identification of cancers during NIPT. In addition, the possibility to interrogate the genomic status of HRS cells in ccfDNA opens important new perspectives for the exploration of the biology of cHL as well as for the diagnosis and management of early and advanced cHL. This novel discovery will facilitate the development of biomarkers and the design of clinical trials with novel biological agents, and may advance targeted and precision therapy in cHL.

2675.

Mechanism-based combinations to overcome Ibrutinib Resistance in Mantle Cell Lymphoma

Chiron D. (Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, Nantes – France)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2700.

MicroRNA-150 influences microenvironmental interactions and prognosis of B cell malignancies

Musilova K., Pavlasova G., Didi J., Seda V., Cerna K., Jez M., Brychtova Y., Doubek M., Mayer J., Arigoni M., Riccardo F., Calogero R., Pospisilova S., Kipps T., Janikova A., Mraz M. (Molecular Medicine, CEITEC MU, Brno – CZ; Dept. of Internal Medicine - Hematology and Oncology, University Hospital, Brno – CZ; Dept. of Biotechnology and Health Sciences, University of Torino, Torino – Italy; Moores Cancer Center, University of California, San-Diego, CA – USA)

We and others have shown that deregulation of microRNAs (miRNAs) is associated with the biology of B cell malignancies (Musilova & Mraz, Leukemia, 2015). MicroRNA miR-150 is of particular interest as its expression level has been shown to determine BCR signaling propensity in chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells (Mraz et al., Blood, 2014). The aim of this study was to analyze the role of miR-150 in microenvironmental interactions and the prognosis of follicular lymphoma and other B cell malignancies. First, we analyzed miR-150 expression in 90 follicular lymphoma (FL) samples (fresh frozen and forma-

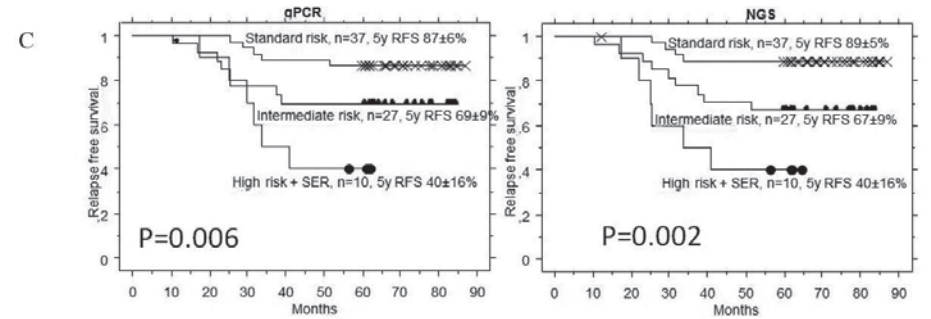
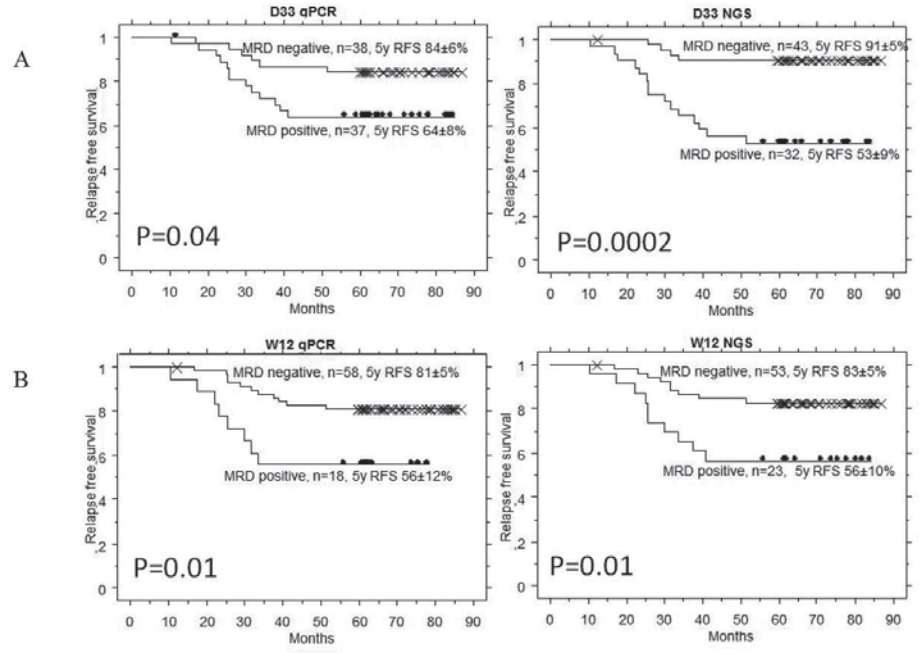
lin-fixed paraffin-embedded tissues [FFPE]). miR-150 expression was significantly lower in patients with high Ki67 positivity (>20%; P=0.003) and a high FLIPI score (3-5; P=0.03). We also observed significantly reduced miR-150 levels in FLs which transformed to diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) compared to the samples before transformation (P=0.01), and miR-150 was significantly less expressed in DLBCL than FL (fold-change 4.1, P<0.001). FL patients with low miR-150 levels (<median) had significantly shorter survival (6.2 years vs. not reached; P=0.007; HR 3.0 [CI: 1.3-6.8]). To determine the potential reason for variable miR-150 levels in B cells, we tested the effect of microenvironmental interactions. In this experiment, a short term (48hrs) co-culture of B cell lymphoma cells with stromal cells (HS-5) led to down-regulation of miR-150 levels (P<0.05). Next we investigated the role of miR-150 in cell migration by silencing a miR-150 target that we have identified, namely GAB1, in lymphoma cell lines. The transfection of siGAB1 resulted in a significant reduction of B cell migration towards stromal cells compared to the control (Transwell assay, Corning; P<0.05), and reduced BCR signaling after anti-IgM treatment (10ug/ml, assessed by calcium influx).

In conclusion, low miR-150 levels associate with a shorter overall survival in FL, which could be used as a reasonable prognostic marker. Interactions with stromal cells and/or the soluble factors that they are producing down-modulates miR-150 levels in B cells, which further supports their migratory potential and BCR signaling propensity.

Supported by: SoMoPro II-no. 4SGA8684; NGS-PTL(306242); EHA Fellowship award; IGA MZ CR NT11218-6/2010; MUNI/A/1180/2014; CZ.1.05/1.1.00/02.0068; G.P. is a city of Ostrava scholarship holder; M.J. is a Brno Ph.D. Talent Scholarship holder. Contact: marek.mraz@email.cz

2777. The Predictive Strength of Next Generation Sequencing (NGS) Minimal Residual Disease (MRD) Detection for Relapse compared with current Methods in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)

Kotrová M., Mužíková K., Mejstříková E., Nováková M., Bakardjieva-Mihaylova V., Fišer K., Stuchlý J., Pott C., Brüggemann M., Starý J., Trka J., Froňková E. (CLIP, Department of Pediatric Hematology/Oncology, 2nd Medical School and University Hospital Motol, Prague – CZ; Second Medical Department, University Hospital Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Kiel – Germany)



MRD monitoring using antigen receptor-based quantitative PCR (qPCR) became a gold standard in the management of ALL, despite being technically and financially demanding. MRD detection based on NGS of antigen receptor genes rearrangements is a simple and cost-effective methodology, which avoids labourious optimization of patient-specific assays. We established the MDR detection by NGS of immunoglobulin heavy chain rearrangements on Ion Torrent sequencers and compared the MRD levels at BFM stratification timepoints with qPCR and flow cytometry (FC). The libraries for sequencing were prepared from 450ng of bone marrow DNA using Biomed-2 FR3 primers (van Dongen, Leukemia 2003). For detection of reads containing the clonal sequence from diagnosis we used our own bioinformatics algorithm. We sequenced 213 samples from 77 patients with childhood ALL treated according to the BFM protocols with the median coverage 719,904 reads per sample. Eighty-four (39.4%) samples were negative by both methods. Sixteen (7.5%) samples were positive by NGS and negative by qPCR, and 16 (7.5%) samples were positive by qPCR and negative by NGS. This caused a shift in risk group stratification in 30% of patients, mainly between standard risk and intermediate risk group patients. The overall correlation of both methods was good (R2=0.71). NGS approach detected significantly higher MRD than qPCR at day 33 in patients who later relapsed (p=0.001). NGS-MRD positivity at day 33 seems to provide a more accurate prediction of relapse (Fig. 1A). At day 78, the predictive value of NGS was comparable to qPCR (Fig. 1B). Combined day 33 and 78 MRD used for defining of risk groups on BFM trials gave similar results as qPCR (Fig. 1C). Similarly to FC, low NGS MRD defined a group with excellent prognosis at day 15. NGS will speed up the process of MRD detection and provide results at early time points, which is currently not possible due to labourious qPCR preparations. The correlation of NGS and qPCR is good with the majority of the differences below the sensitivity of both methods. With 500ng DNA analyzed the sensitivity of both methods is comparable. We showed that day 33 NGS-MRD is significantly higher in patients who subsequently relapsed than qPCR-MRD. The outcome of patients stratified into risk groups using combined d33/d78 MRD was similar for NGS and qPCR. Supported by IGA NT14343, GAUK 394214.

2778. Molecular Background of BCP-ALL Cases with an Early Switch to Monocytic Lineage

Dobiášová A., Fišer K., Slámová L., Starková J., Froňková E., Zaliová M., Polgárová K., Figueroa M., Kalina T., Zuna J., Trka J., Starý J., Hrušák O., Mejstříková E. (Department of Paediatric Haematology and Oncology, CLIP Laboratory Centre, 2nd School of Medicine, Charles University, Prague – CZ; Pathology, University of Michigan, Ann Arbor, MI – USA)

Recently we identified a subtype of BCP-ALL with a switch towards monocytic lineage within the first month of treatment (swALL) (Slámová, Leukemia 2014). During the lineage switch blasts lose CD19 and CD34 and gain CD33 and CD14 expression. The clonal relatedness of diagnostic and switched monocytoid blasts was proved by Ig-TCR rearrangements. swALL cases are not associated with MLL or BCR/ABL1 aberrations and lack any known genetic markers of lineage ambiguity (detected by FISH or MLPA). We analyzed transcriptomes (RNASeq) of swALL samples at diagnosis (n=4) and at d8 (n=4) where the immunophenotypic switching was already apparent as well as control BCP-ALL (n=4). For methylome analysis we used Enhanced Reduced Representation Bisulfite Sequencing (ERRBS)(Akalin, PLoS Genetics 2012). Samples from swALL at diagnosis (n=7) and at

d8 (n=4) and control BCP-ALL (n=4) were processed. Comparison of transcriptomes of B-lineage blasts from diagnosis between swALLs and control BCP-ALLs revealed a number of significantly differentially expressed genes. Among them were genes related to lineage commitment like markers CD34, CD33 and transcription factors like CEBPA, CEBPD, KLF4, NANOG and GATA3. All of them were upregulated in swALLs. Genes downregulated in swALLs were e.g. ANXA5, VPB1 and CD9. Hierarchical clustering separated not only swALL and control BCP-ALL, but also swALL cells before and during the lineage switch. Changes in gene expression during the lineage switch included downregulation of EBF1, CD19, CD34, FLT3, MYB, CD79a, BCR, PAX5, GATA3 and TCF3 genes and upregulation of AIF1, CD14, CD33 and MNDA. Analysis of epigenetic landscape of diagnostic swALL cases in comparison with control BCP-ALLs showed significantly differentially methylated sites in promoters of e.g. CEBPA, ANXA5 and GATA3, but also in other gene parts (e.g. in exon of CEBPE). While the whole DNA methylation picture is still a challenge to draw both whole genome methods could clearly separate swALL cases from control BCP-ALL using principal component analysis. In summary we show that immunophenotypic shift is associated with gene expression changes of surface markers, lineage specific transcription factors and other genes. Some of the genes have altered expression already at diagnosis. Expression of some key lineage genes is differentially regulated on epigenetic level. Supported by: GAUK 914613, UNCE 204012, IGA NT13462-4

2772.

Use of BCR/ABL genomic breakpoint for MRD monitoring in childhood ALL and its comparison with other standard methods

Hovorkova L., Zaliova M., Muzikova K., Fronkova E., Linhartova J., Machova Polakova K., Stary J., Trka J., Zuna J. (CLIP Childhood leukaemia Investigation Prague, Department of Paediatric Haematology and Oncology, Charles University Prague, 2nd Faculty of Medicine and UH Motol, Prague – CZ; Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague – CZ)

Background: The precise role of minimal residual disease (MRD) in childhood BCR/ABL+ ALL is unclear. However, MRD is used in HSCT indication according to EsPhALL - the worldwide protocol for the childhood BCR/ABL+ ALL. There are two standard targets used for MRD monitoring - Ig/TCR rearrangements and the fusion transcript; however, as we showed previously, the correlation between these two methods in some patients is unsatisfactory. We demonstrated presence of BCR/ABL within the non-lymphoid (Ig/TCR-negative) population in the non-correlating samples and worse prognosis of such patients (Zaliova, Leukemia 2009). Moreover, mRNA quantification might not always correspond to the number of positive cells. Here, we established MRD monitoring based on the quantification of the patient-specific genomic (intronic) BCR/ABL fusion. Methods: We performed multiplex long distance DNA PCR to find BCR/ABL breakpoint in 24 patients with minor-BCR/ABL fusion. The patient-specific fusion sequence was used for MRD quantification by qPCR. We measured 273 bone marrow (BM) and 129 peripheral blood (PB) samples (21 patients). The results were compared with Ig/TCR and BCR/ABL transcript quantification. For correlation analysis the double negative results were excluded. Results: We found genomic BCR/ABL breakpoint in 22/24 (92%) patients. Analysis of MRD in BM samples confirmed poor correlation between Ig/TCR and BCR/ABL mRNA quantification ($R^2=0.69$; $n=171$). Moreover, we saw similar difference also when comparing the two DNA methods (Ig/TCR vs. BCR/ABL DNA, $R^2=0.63$; $n=184$). The correlation between BCR/ABL mRNA and DNA approach was more satisfactory ($R^2=0.82$; $n=183$). The correlation in PB samples was similar to BM results ($R^2=0.65$, 0.66 and 0.79 , respectively). Summary/Conclusion: The BCR/ABL quantification at genomic level brings the most precise picture of leukaemic burden. Our analysis confirmed that the poor correlation between BCR/ABL and Ig/TCR data is caused by the presence of BCR/ABL in a wider clone than Ig/TCR. Moreover, in some patients (4/21) we observed higher genomic BCR/ABL MRD compared to the transcript levels in consecutive samples suggesting that treatment (possibly by imatinib) might in some patients influence the BCR/ABL expression. The most reliable method for useful and reasonable MRD detection in BCR/ABL+ ALL needs to be discussed within large therapeutic protocol and, importantly, with respect to clinical data. Support: GAUK 554214; MH CZ–DRO UH Motol 00064203

KONFERENCE – ZDRAVOTNÍ LABORANTI 1

2761.

Morfologie a patologie červené řady v nátěru periferní krve

Šimečková R., Mikulenková D., Kalašová J. (ÚHKT, morfologicko-cytochemická laboratoř, Praha; ÚHKT, Praha)

Erytrocyt je nejaderná buňka bikonkávního tvaru, která zodpovídající za oxygenaci organismu. Za fyziologických podmínek se tvoří v kostní dřeni, kde z prekursorové kmenové buňky vzniká proerytroblast, dále bazofilní, polychromatofilní a ortochromní erytroblast. První nejadernou buňkou červené řady je retikulocyt. Je-li erythropoeza poškozená, dochází k defektní či snížené tvorbě erytrocytů (např. v rámci myelodysplastického syndromu, či aplastické anémie), nebo naopak při porušené krvetvorbě v rámci myeloproliferativního onemocnění se červené řady tvoří nadměrné množství (polycytemia vera). Základní měřené hodnoty červeného krevního obrazu na analyzátoru jsou: celkový počet erytrocytů (RBC), střední objem erytrocytu (MCV), střední obsah hemoglobinu v jednom erytrocytu (MCH) a v litru erytrocytů (MCHC), distribuční šíře velikosti erytrocytů (RDW) a hematokrit (Hct). Popis červené řady je základní součástí hodnocení nátěru periferní krve a společně s naměřenými hodnotami krevního obrazu pomáhá v diferenciální diagnostice hematologických a namatologických onemocnění.

2797.

Vzácné hemoglobinové varianty - morfologická a molekulárně genetická diagnostika

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

Laboratoře HOK v Olomouci, které jsou nyní nově centrem pro vyšetřování raritních chorob, se již více než dvacet let zabývají diagnostikou vrozených a familiárních anemií se zaměřením na talasemie a hemoglobinopatie. Mezi základní vstupní vyšetření patří stanovení hodnot krevního obrazu včetně podílu retikulocytů a morfologického zhodnocení erytrocytů. Při podezření na hemoglobinopatii jsou diferenciálně diagnosticky důležité bioanalytické testy, pomocí kterých se stanovují hladiny hemoglobinu A2, hemoglobinu F a dále určení hemoglobinového spektra pomocí polyakrylamidové proteinové elektroforózy. K průkazu přítomnosti abnormální hemoglobinové varianty ve vzorku (resp. k potvrzení nestabilní hemoglobinopatie) je prováděn izopropanolový test (založený na formaci viditelného hemoglobinového precipitátu) a barvení na přítomnost Heinzových tělísek brilant kresylovou modří. Na základě výsledků těchto vyšetření je potom prováděna molekulárně genetická analýza na úrovni DNA (sekvenování, MLPA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). V našem sdělení přinášíme popis tří zajímavých případů průkazu abnormální hemoglobinové varianty: 1. 17letá dívka s HbH onemocněním způsobeným inaktivací tří alfa-globinových genů s pozitivními inkluzemi HbH; 2. rodina s nestabilní hemoglobinovou variantou Köln s pozitivními Heinzovými tělísky a pozitivním izopropanolovým testem; 3. pacient s nosičstvím alely pro hemoglobin E. V naší prezentaci ukážeme postup jednotlivých vyšetření při diagnostice hemoglobinopatií od hodnot krevního obrazu a morfologie až po molekulárně genetickou analýzu. Grantová podpora: IGA_UP_LF_2015_001

2703.

Vztah erytroblastov v periférnej krvi a mortality u kriticky chorých

Macichová M., Grochová M., Firment J., Šimonová J., Trenkler Š., Mitníková M., Raffáč Š., Petrovičová J. (OLM - POKH, Univerzitná nemocnica L. Pasteura, Košice – SK; I. Klinika anesteziológie a intenzívnej medicíny UNLP a LF, Košice – SK; Oddelenie lekárskej štatistiky, UNLP LF, Košice – SK)

ÚVOD: Za fyziologických okolností erytroblasty nie sú prítomné v periférnej krvi dospelých jedincov. V štúdiách autorov Stachon A. a kol., Delson G. a kol. a Otsubo H. a kol. bola potvrdená prítomnosť erytroblastov periférnej krvi ako nezávislý prediktívny faktor mortality u kriticky chorých. V súčasnej dobe sú erytroblasty stanovované pomocou krvinkových analyzátorov, s detekčným limitom, ktorý sa pohybuje okolo 19/μl krvi Ciel práce: 1. vyhodnotiť význam stanovenia erytroblastov u kriticky

chorých na klinikách anesteziologie a intenzivní medicíny. 2. potvrdit nebo vyvrátit tézu, že přítomnost erytroblastů periférní krvi je prediktivní faktor mortality u kriticky chorých. 3. Výsledky skorelovat s dalšími klinickými a laboratorními indikátory rizika jako je SOFA skóre, APACHE II, CRP, laktát a poměr neutrofilů/lymfocyty. **MATERIÁL A METÓDY:** V retrospektivní, neinterventivní studii za období 12 měsíců bylo u 338 pacientů vyhodnoceno výsledky erytroblastů v periférní krvi ve vztahu k mortalitě počas hospitalizace na klinice anesteziologie a intenzivní medicíny. **VÝSLEDKY:** U NRBC pozitivních pacientů jsme zjistili signifikantně vyšší mortalitu 48,9 % (45/92) oproti NRBC negativním pacientům, u kterých byla mortalita 23,5 % (58/246), $p < 0,001$. V skupině pacientů se sepsou byla mortalita 50,6 % (40/79) u NRBC pozitivních oproti 31,0 % (49/158), $p < 0,001$ u NRBC negativních pacientů. Až u pacientů s těžkou sepsou jsme zaznamenali statisticky významný rozdíl v mortalitě u NRBC pozitivních pacientů 56,0 % (28/50) a u NRBC negativních pacientů 34,4 % (31/90), $p < 0,001$. Prekvapivě, u pacientů se septickým šokem byla mortalita u NRBC pozitivních 54,0 % (33/61) a u NRBC negativních pacientů 42,3 % (33/78) podobná, $p = 0,176$. Riziko mortality stoupalo s zvyšujícím se počtem vyplavených erytroblastů do periférní krvi. **ZÁVĚR:** Vyplavení NRBC do periférní krvi sa ukazuje jako prediktivní faktor rizika mortality u kriticky chorých pacientů.

2665.

Význam morfoloického hodnocení erytrocytů při anémii, kazuistika s nečekaným závěrem

Vytisková S., Mottlová V., Kročilová D. (Oddělení klinických laboratoří, Vojenská nemocnice, Brno; Interní klinika, VN, Brno)

Úvod: Naše sdělení je koncipované jako kazuistika pacienta, který se po přibližně 5ti týdenním vyšetřování bolestí v krajině břišní v různých nemocnicích a klinikách v okolí Brna dostává na vyšetření k hematologovi do Vojenské nemocnice v Brně pro došetření anémie, náhodně zjištěné při diagnostice jeho aktuálních břišních potíží. Nejnižší hodnota hemoglobinu, než byl odeslán na hematologii, činila 92 g/l a byla t.č. „léčena“ substitucí železa bez toho, aniž by byla stanovena příčina anémie. Na našem pracovišti následně diagnostikujeme velmi nečekanou základní příčinu anémie. Cíl práce: Poukázání na fakt, že nedošetření příčiny anémie a podcenění morfologie erytrocytů, může vést ke zbytečně dlouhodobému vyšetřování příčin aktuálního zdravotního stavu pacienta. Nemocní a metodiky: Krevní obraz s retikulocyty vyšetřen na hematologickém analyzátoru Abbott CD Ruby a základní biochemická vyšetření provedena na analyzátoru Abbott Architect ci16200. Specifická biochemická vyšetření uroporfiriny, 5-ALA, koproporfiriny a sérové Pb vyšetřeny na Oddělení klinické biochemie FN Brno. Výsledky: Rozšířený krevní obraz bílé řady a trombocytů naprosto v normě, ERY 4.25x10¹²/l, HGB 118 g/l, HCT 0.35, MCV 82.0 fl, MCH 27.8 pg, MCHC 339 g/l, RDW 17.2%, RETI 4.9%, RETI 208.3x10⁹/l, PAT negativní, transferin 2.07 g/l, haptoglobin 0.49 g/l, bilirubin 8.0 umol/l, železo 18.69 umol/l, ferritin 337.7 ug/l, saturace transferinu 36.1%, vitamin B12 514 ng/l a folát 13,2 nmol/l. Morfoloické hodnocení nátěru periférní krve: bazofilní tečkování erytrocytů, stomatocyty, jinak vše norma. Morfoloické hodnocení nátěru kostní dřeně: erytropoeza normoblastová, porucha hemoglobinizace, bazofilní tečkování, mimo rozpočet četné fagocytující makrofágy. Specifické biochemické vyšetření: uroporfiriny 4223 umol/24hod, 5-ALA 834 umol/l, koproporfiriny 3080 umol/24hod, plumbémie 800 ug/l. Závěr: Díky typickému morfoloickému nálezu v periférní krvi a kostní dřeni jsme diagnostikovali velmi závažnou příčinu nejen pacientovy anémie a pacient byl odeslán na specifickou léčbu do Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Nadto díky této diagnostice byla následně zajištěna lékařská péče i pro pacientovu nejbližší rodinu (partnerka a 2 děti předškolního věku). Na rozklíčování diagnózy a ukázky morfologie v periférní krvi a kostní dřeni se můžete těšit v následném sdělení.

CLL

2808.

Postavení alogenní transplantace u CLL v éře nových inhibitorů

Lysák D. (Hematologicko-onkologické oddělení, FN, Plzeň)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2734.

Revoluce v léčebném přístupu ke komorbidním nemocným s chronickou lymfocytární leukémií.

Smolej L. (IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové)

Klinický výzkum chronické lymfocytární leukémie (CLL) se donedávna soustředil na mladší nemocné v dobrém stavu. CLL je nicméně onemocněním převážně starších osob (medián věku při stanovení diagnózy je mezi 65-72 lety) a většina nemocných má již v době diagnózy CLL významně přidružené choroby. Režim FCR (fludarabin, cyklofosamid, rituximab) je standardem léčby u mladší fit CLL populace; u nemocných vyššího věku s významnými komorbiditami jej však nelze použít v důsledku nepřiměřené hematologické a infekční toxicity. V řadě případů, zejména u nemocných ve věku 65-75 let, je rozhodování o volbě konkrétního léčebného režimu obtížné. Ukazatele jako výkonostní stav, vypočtená clearance kreatininu, počet a tíže přidružených onemocnění a individuální posouzení nemocného nám může toto rozhodování usnadnit a stanovit léčebný cíl, na jehož základě je specifický typ léčby zvolen. Dvě velké randomizované studie fáze III prokázaly vyšší účinnost kombinace chlorambucilu (CLB) s monoklonální protilátkou proti CD20 (aCD20, obinutuzumabu či ofatumumabu) vůči monoterapii CLB; kombinace aCD20+CLB vedla k vyššímu počtu kompletních léčebných odpovědí, prodloužení období do progresu a v případě obinutuzumabu také k prodloužení celkového přežití. Dalšími možnostmi léčby komorbidních nemocných s CLL jsou nízkodávkovaný režim FCR či kombinace založené na bendamustinu (bendamustin+ofatumumab, bendamustin+rituximab). Přednáška bude zaměřena na posouzení celkového stavu a přidružených onemocnění a možnostem léčby 1. linie u nemocných s CLL významnými přidruženými chorobami. Podpořeno grantem IGA MZ ČR NT/13412-4, programem PRVOUK P37/08 a RVO MZ ČR (FNHK, 00179906).

2697.

Akumulace mutací v genu SF3B1 u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií vykazujících dysfunkci p53 dráhy

Hložková M., Navrkalová V., Malčíková J., Divišková E., Brychtová Y., Doubek M., Mayer J., Trbušek M. (Středoevropský technologický institut (CEITEC), Brno; Fakultní nemocnice, Brno)

Na patogenezi chronické lymfocytární leukémie (CLL) se významně podílejí geny, jejichž rekurentní mutace byly objeveny v nedávné době díky novým sekvenčním metodám. Jedním z těchto genů je SF3B1 (sestříhový faktor 3 podjednotka 1), který je důležitou komponentou sestříhového aparátu. Mezinárodní studie, na které se podílelo i naše pracoviště (te Raa, Leukemia, 2014) naznačila, že se funkční dopad těchto mutací nejspíše odráží v narušení stěžejní proapoptotické dráhy aktivované proteinem p53. Cílem naší současné studie bylo (a) asociovat mutace v genu SF3B1 s výskytem defektů v genech TP53 a ATM u našich CLL pacientů a (b) stanovit dopad SF3B1 mutací na čas do první terapie (TTFT). Mutace v hot-spot oblastech genu SF3B1 (exony 14-16) byly identifikovány Sangerovým sekvenováním. Mutace v genech TP53 a ATM (celé kódující oblasti a místa sestříhu) byly detekovány pomocí sekvenování nové generace a Sangerova sekvenování. Delece 11q a 17p byly stanoveny pomocí I-FISH. Srovnání mezi biologickými proměnnými bylo provedeno Fisherovým přímým exaktním testem. TTFT byl analyzován pomocí Kaplan-Mayerových křivek přežití. Mutaci v genu SF3B1 jsme identifikovali u 50 z 240 pacientů (21 %). Ve 49 případech se jednalo o zámenovou substituci, u zbývajících pacientů pak o krátkou in-frame deleci. Tyto výstupy ukazují, že v případě mutací v tomto genu se velmi pravděpodobně jedná o selekci směrem k modifikaci proteinu SF3B1, nikoli o jeho úplnou eliminaci. Výskyt dalších sledovaných defektů byl následující: ATM mutace s delecí/bez delece 11q u 46/240 pac. (19 %), samotná 11q- bez ATM mutace u 92/240 pac.

(38 %) a TP53 mutace s delecí/bez delece 17p u 51/240 pac. (21 %). Samotná 17p- se v souboru nevyskytovala. Pozitivní a významné asociace byly pozorovány mezi společným výskytem (a) mutací v genech SF3B1 a ATM ($P=0,042$) a (b) mutací SF3B1 a celkovou inaktivací dráhy ATM→p53 (mutace v ATM a/nebo TP53; $P=0,006$). Jinými slovy, 60 % pacientů s SF3B1 mutací vykazovalo zároveň i inaktivaci stěžejní proapoptotické dráhy. Medián TTFT u pacientů s mutací SF3B1 činil 18 měsíců a byl tak výrazně kratší než u kontrolní skupiny bez jakýchkoli defektů (38 měsíců; $P=0,019$). Zjištěné poznatky podtrhují význam mutací v genu SF3B1 pro patogenezi CLL a prognózu pacientů. Zůstává nejasné, proč je výskyt narušeného proteinu SF3B1 tak silně asociován s inaktivací základní proapoptotické dráhy a jaký je biologický dopad SF3B1 mutací. Práce byla podpořena projekty NT13519-4 a MUNI/A/1180/2014.

2783.

Komplexní karyotyp u pacientů s CLL

Krůzová L., Holzerová M., Mikešová M., Dřimalová H., Urbanová R., Indrák K., Papajík T., Jarošová M. (HOK, FNOL a LF UP, Olomouc)

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je nejčastější leukemií dospělého věku vyznačující se heterogenním průběhem onemocnění. Určení prognózy nemocných je založeno na klinických a laboratorních výsledcích, kde významnou roli hraje cytogenetika. Mezi prognosticky nepříznivé cytogenetické změny patří delece 17p, 11q zahrnující geny TP53, ATM a BIRC3, delece dlouhého ramene chromosomu 6 a také nálezy komplexních změn v karyotypu (KZK). Komplexní změny karyotypu byly definovány jako nálezy 3 a více změn v karyotypu a vyskytují se u 10 – 30 % pacientů s CLL. KZK koreluje s výskytem nemutovaného IGVH a s CD38 pozitivitou patologických B-lymfocytů. Cílem naší analýzy bylo zjistit frekvenci KZK v našem souboru, vyhodnotit a zjistit klinický rozdíl mezi podskupinami pacientů s KZK s delecí TP53 a bez této delece, vyhodnotit typy chromosomových změn a frekvenci chromosomů v komplexním karyotypu. Analyzovaný soubor tvořilo 614 pacientů a KZK byly pozorovány u 66 (11 %) pacientů. Těchto 66 pacientů bylo vyšetřeno metodami konvenční cytogenetiky, FISH, M-FISH a arrayCGH. Soubor tvořilo 50 mužů a 16 žen s mediánem věku při diagnóze 60 let (34 - 87 let), 47 (71 %) pacientů bylo ve stádiu Binet B nebo C. Celkem 43 (65 %) pacientů bylo v době vyšetření již léčeno. Mezi nejčastější rekurentní změny v komplexním karyotypu patřily delece 13q14 (73 %), delece ATM (50 %), delece TP53 (42,4 %) a zmnožení genu MYC (36,4 %). Mezi chromosomy nejčastěji vstupující do translokací, početních změn a dicentrických chromosomů patřily chromosomy 2, 8, 13 a 18. Statistické hodnocení celkového přežívání souboru 28 pacientů s KZK s delecí TP53 a souboru 38 pacientů s KZK bez delece TP53 neprokázalo statisticky významný rozdíl v celkovém přežívání nemocných obou podskupin. Tento rozdíl nebyl prokázán ani při hodnocení výskytu počtu změn (3 změny vs. 4 a více změn). Cytogenetická analýza určila frekvenci výskytu komplexních změn karyotypu u 11 % nemocných. Nemocní byli pokročilejšího stádia B a C, s nemutovaným stavem IGVH, častěji léčeni. Prokázali jsme, že KZK jsou tedy důležitým prognostickým markerem u pacientů s CLL bez ohledu na delecí TP53. Tato práce je podpořena granty IGA MZ ČR NT 13576 a IGA-LF-2015-001.

2770.

Průkaz oligoklonální chronické lymfocytární leukémie u případů s jedinou fenotypově homogenní populací dle průtokové cytometrie – studie na úrovni jednotlivých buněk

Brázdilová K., Plevová K., Skuhrová Francová H., Borský M., Tichý B., Burčková K., Chmelíková M., Kantorová B., Škabrahová H., Brychtová Y., Mayer J., Doubek M., Pospíšilová Š. (Masarykova univerzita, CEITEC - Středoevropský technologický institut, Brno; Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno; Masarykova univerzita, Brno)

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je považována za monoklonální nádorové onemocnění. Leukemický klon je zpravidla charakterizován 1 produktivní přestavbou těžkého řetězce (H) imunoglobulinu (IG) sdílenou všemi buňkami klonu. V 2–5 % případů je ale při rutinní analýze IGHV detekováno více produktivních přestaveb. Při multiparametrickém flowcytometrickém vyšetření je možné u některých z nich prokázat oligoklonalitu na základě rozdílné exprese povrchových znaků (Plevová et al., Haematologica 2014). Avšak v případech vykazujících uniformní imunofenotyp se

za nejpravděpodobnější příčinu doposud považovala porucha alelické exkluze, která vede k expresi dvou různých produktivních IGH v jedné buňce. Naším cílem bylo na úrovni jednotlivých buněk objasnit biologický profil případů CLL s vícečetnými produktivními přestavbami IGH a uniformním imunofenotypem. Z celkového počtu 1634 pacientů s CLL jsme u 63 (3,9 %) identifikovali při analýze IGHV dvě až tři produktivní přestavby IGH. U všech 63 jsme určili přepisované lehké řetězce IGK, resp. IGL. Flowcytometricky jsme vyšetřili rozšířený panel povrchových znaků u 36/63 (57 %) případů: U 14/36 (~40 %) případů jsme prokázali oligoklonalitu, zatímco u 22/36 (~60 %) byla pozorována pouze jedna populace s uniformním imunofenotypem. U 12/22 jsme metodou alelově specifické kvantitativní PCR (ASO-qPCR) určili poměrné zastoupení IGH přestaveb ve vzorku a jeho změny v čase. Na základě těchto vyšetření jsme vybrali 2 testovací vzorky, u kterých byla oligoklonalita prokázána flowcytometricky, a 6 vzorků s uniformním imunofenotypem. Tyto vzorky jsme vyšetřili na úrovni jednotlivých buněk pomocí techniky vyvinuté na našem pracovišti. Touto technikou jsme v každé analyzované buňce detekovali přepisované přestavby IGH, IGK a IGL. V rámci každého vzorku jsme analyzovali 100–500 buněk v závislosti na zastoupení IGH přestaveb, stanoveném pomocí ASO-qPCR. V obou testovacích i šesti vzorcích s homogenním imunofenotypem jsme takto prokázali koexistenci 2–3 klonů. Technika navíc posloužila pro určení dříve nedetekovaných přestaveb a párování řetězců IGH, IGK a IGL v buňce, což jsou cenné informace pro další studium IG receptorů u oligoklonální CLL. Touto prací dokazujeme, že oligoklonalita je nejčastější příčinou exprese vícečetných produktivních přestaveb IGH u CLL, a to i v případech s uniformním imunofenotypem. Projekt je podporován z grantů MUNI/A/1180/2014, IGA MZCR NT13493-4/2012 a MŠMT VaVPI CZ.1.05/1.1.00/02.0068.

2836.

Detekce klonální heterogenity u chronické lymfocytární leukemie pomocí hlubokého sekvenování nové generace

Schneiderová P., Jarošová M., Fillerová R., Dýšková T., Procházková V., Urbanová R., Papajík T., Kriegová E. (Ústav imunologie, LF UP a FN, Olomouc; Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc)

Klinický průběh chronické lymfocytární leukemie (CLL) je velmi heterogenní. Jednou z možných příčin je velká genetická variabilita zahrnující řadu významných cytogenetických aberací (13q-, 11q-, trizomie 12 a 17p-) a také mutace v genech TP53, NOTCH1, ATM, SF3B1, BIRC3, DDX3X podílejících se na patogenezi CLL. Současné výzkumy naznačují, že kromě genetické variability má na průběh onemocnění vliv také klonální heterogenita a její vývoj v průběhu nemoci. Metody pro určení klonální heterogenity představuje u CLL metoda FISH a v poslední době především sekvenování nové generace. Cílem naší práce bylo využít hlubokého sekvenování nové generace k detekci klonální heterogenity u pacientů s relabující formou CLL. Do studie jsme zařadili 42 pacientů s progredující/relabující formou CLL. Vyšetřovali jsme párové vzorky DNA pacientů získané v době diagnózy a následně v době progresu/relapsu onemocnění z periferní krve, kostní dřeně nebo lymfatické uzliny. K vyšetření kódující sekvence genu TP53 (exony 2-11) a dalších genů asociovaných s CLL jsme použili technologii cíleného sekvenování nové generace (Illumina, MiSeq) s průměrnou hloubkou čtení 10000x. U pacientů s progredující formou onemocnění jsme detekovali klonální evoluci během vývoje onemocnění. Tento trend je asociován se špatnou prognózou a rezistencí k chemoterapii. Metoda hlubokého sekvenování nové generace umožňuje detekovat a sledovat vývoj klonální heterogenity u pacientů s CLL. Identifikace minoritních subklonů umožní identifikovat rizikové jedince a současné nové léčebné možnosti umožní nasadit cílenou terapii u těchto vysoce rizikových pacientů. Grantová podpora: IGA MZ ČR NT13576, IGA LF_UP_2015_009.

MONOKLONÁLNÍ GAMAPATIE 1

2805.

Multiple myeloma treatment - state of the art, controversies and future perspectives

Gimsing P. (Department of Haematology, Rigshospitalet, Copenhagen – Denmark)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2816.

Aktuální stav registru monoklonálních gamapatií

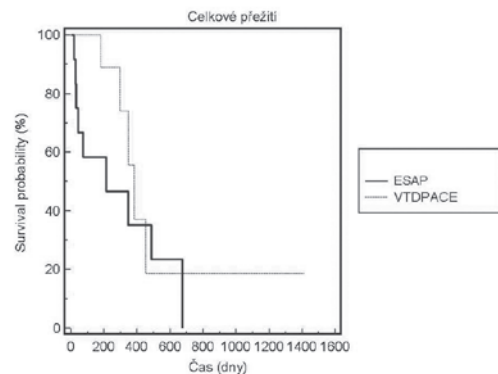
Maisnar V., Klimeš D., Pelcová J., Hájek R. (4. interní hematologická klinika, FN a LF UK, Hradec Králové; Institut biostatistiky a analýz, MU, Brno; Česká myelomová skupina; Klinika hematologické onkologie, FN, Ostrava)

Registru monoklonálních gamapatií (RMG) České myelomové skupiny je unikátním projektem, jehož cílem je sledování problematiky diagnostiky a léčby monoklonálních gamapatií (MG) zatím především v České republice. Svým rozsahem, který v současnosti čítá data celkově více než 6000 nemocných s MG, z čehož téměř 4000 tvoří nemocní s mnohočetným myelomem, patří RMG mezi 5 největších registrů s obdobnou tematikou v Evropě. Od 1.5.2007 do současné doby zadává data do registru již celkem 22 center spolupracujících v rámci CMG, dnes se již jedná opravdu o mezinárodní databázi, protože kromě 17 center z České republiky jsou aktivní i 4 centra ze Slovenské republiky a plánuje se možnost případného připojení dalších po vyřešení smluvních vztahů s CMG. Aktuální stav lze nalézt na webové stránce CMG www.myeloma.cz (líšta RMG). Dnes jsou do RMG zadávána diagnostická a klinická data nejen od nemocných s mnohočetným myelomem a MGUS, jak tomu bylo v době vzniku registru, ale nově již i od nemocných s AL amyloidózou a Waldenströmovou makroglobulinémií. Každé referenční centrum má v současné době svého datamanážera, který je zodpovědný za zadávání dat v daném centru. Každé centrum má přímý přístup pouze k vlastním datům, které jsou majetkem centra resp. příslušného zdravotnického zařízení. Přístup k datům jiného centra při společné analýze musí projít písemným formálním schvalovacím procesem všech zúčastněných. Velkým pozitivem RMG je průběžně probíhající monitoring zadávaných dat organizovaný CMG. Nemalé prostředky, které udržení chodu RMG vyžaduje, se nám dnes již zcela jistě vyplatí. To je zřejmě s ohledem na výstupy, které je nám tento registr schopen v současné době poskytnout (demografická data, monitoring diagnostiky a léčby, sledování spotřeby drahých léků atd.) a která jsou v současnosti využívány nejen k publikačním účelům, ale také jako kvalitní podklad pro jednání se zdravotními pojišťovnami resp. důležitý základ pro přípravu guidelines diagnostiky a léčby nemocných s MG, rovněž i výukových materiálů využitelných jak v rámci pre-, tak i postgraduálního vzdělávání. Cílem našeho sdělení bude seznámení posluchačů s aktuálními výstupy z RMG, které byly CMG realizovány v posledních 2 letech.

2671.

Využití platinových režimů v léčbě mnohočetného myelomu

Radocha J., Kateroglou S., Maisnar V. (IV. interní hematologická klinika, LFUK a FN, Hradec Králové)



Úvod: Chemoterapie obsahující platinu byly v minulosti součástí léčby mnohočetného myelomu. Konvenční režimy (ESAP) byly prakticky úplně nahrazeny léčbou moderními léky. V současné době jsou polychemoterapie obsahující platinu využívány v rámci protokolů na platformě Total Therapy 3 vyvinuté Arkansaskou skupinou. Cíl: Analýza účinnosti režimu ESAP a VTD-PACE u pacientů s relabovaným a refrakterním mnohočetným myelomem. Pacienti a metody: Celkem bylo analyzováno 12 pacientů léčených protokolem ESAP a 12 pacientů protokolem VTD-PACE od roku 2008 do roku 2014. Byly

analyzovány počty léčebných odpovědí, délka léčebné odpovědi, doba do progresu onemocnění. Výsledky: V souboru pacientů léčených režimem ESAP bylo 8 mužů a 4 ženy (medián věku 62 let, 48-74 let). Medián počtu léčebných linií byl 4 (2-11). Pouze 1 pacient (8 %) dosáhl parciální remise onemocnění. Medián celkového přežití byl 215 dnů, medián doby do progresu nehodnotitelný. V souboru pacientů léčených režimem VTD-PACE bylo 9 žen a 3 muži (medián věku 62 let, 40-69 let). Medián počtu léčebných linií byl 2 (1-3). 1 pacient (8 %) dosáhl CR, 2 pacienti VGPR, 4 pacienti PR a 2 pacienti MR. 3 pacienti následně podstoupili transplantaci (2 autologní a 1 alogenní). Medián celkového přežití byl 381 dnů, medián doby do progresu 191 dnů. Závěr: Použití platinových režimů bez nových léků nepřináší klinický benefit pro pacienty s pokročilým mnohočetným myelomem. Režim VTD-PACE jeví vyšší účinnost při časnějším použití u této vysoce rizikové skupiny pacientů, je vhodné v této indikaci vzhledem ke krátké době do progresu navázat dalším léčebným krokem (autologní či alogenní transplantací).

2820.

Myelom a teralite dialýza

Lachmanová J., Straub J., Pohlreich D., Špička I. (Klinika nefrologie, VFN, Praha; I. interní klinika - klinika hematologie, VFN, Praha)

Renální insuficience patří mezi časté projevy myelomu. Až 11% pacientů s nově diagnostikovaným myelomem s renální insuficiencí vyžaduje akutní hemodialýzu. Příčina renální insuficience u myelomu je dána nadprodukcí volných lehkých řetězců (FLC) maligními plazmatickými buňkami. Při vysoké hladině FLC v séru tyto precipitují v ledvinových tubulech. Následná obstrukce tubulů válcí způsobuje přímé poškození tubulárních buněk s následnou zánětlivou infiltrací a nakonec fibrózou ledviny. Riziko vzniku myelomové ledviny stoupá s koncentrací FLC v krvi a moči. V případě myelomové ledviny hraje klíčovou roli v léčbě co nejrychlejší snížení množství FLC v séru redukcí plazmocyty. Současně je nutné přímo odstranit co největší množství FLC z krve. Toho lze dosáhnout hemodialýzou se speciální teralite membránou vyrobenou speciální technologií. Tato membrána ze směsi PEAS/PVP (polyarylethersulfonu+ polyvinylpyrrolidonu) se odlišuje od běžných dialyzačních kapslí speciální prostupností, která díky „velkým pórům“ zaručuje možnost odstranění FLC, ale nepropouští látky nad 60kDa např. srážecí faktory a imunoglobuliny. Ve VFN Praha jsme touto metodou léčili 11 pacientů - 8 mužů a 3 ženy ve věku 37 – 75 let. První dialýzu s teralite membránou jsme provedli 13.4. 2012. Frekvence dialýz byla zpočátku 1x denně a dále dle odpovědi ob den. Průměrné množství FCL před zahájením dialýzy bylo 12197 mg/l (5747 – 44125), po poslední dialýze 2852 (54 – 13574), bylo odstraněno 38 – 99% FLC. Průměrný počet hemodialýz s teralite membránou na 1 pacienta byl 9 (5-19). Výsledky: u 5 pacientů došlo ke zlepšení renálních funkcí, bez nutnosti další dialýzy, 6 pacientů se nadále dialyzuje. Všichni pacienti měli současně cytoredukční režim na bázi bortezomibu. 5 pacientů bylo léčeno vysokodávkovanou chemoterapií s následnou autologní transplantací periferních kmenových buněk (ASCT). Závěr: Hemodialýza s teralite membránou spolu s chemoterapií na bázi bortezomibu u nově diagnostikovaných pacientů s mnohočetným myelomem s renálním selháním vedla u 45 % nemocných k obnově renální funkce. Základní podmínkou je možnost zajištění této dialýzy co nejdříve s co největší eliminací FLC.

2748.

Cirkulující sérová miR-130a jako marker extramedulárního relapsu mnohočetného myelomu

Ševčíková S., Bešše L., Sedlaříková L., Kubacková V., Almáši M., Stanková M., Radová L., Penka M., Adam Z., Pour L., Krejčí M., Hájek R. (Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, LF MU, Brno; Oddělení klinické hematologie, FN, Brno; Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; Ústav klinické hematologie, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava)

Mnohočetný myelom (MM) je krevní nádorové onemocnění především pacientů starších 65 let. S příchodem nových léků, jako jsou inhibitory proteazomu a imunomodulační léky, došlo k výrazné změně v přežití pacientů. Na druhou stranu se však zásadně zvyšuje výskyt extramedulárního relapsu (EM) těchto pacientů, který má velmi špatnou prognózu. EM relaps je způsoben mutacemi v myelomových buňkách, které umožňují přežití buněk mimo kostní dřeň. mikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující jednonetězcové molekuly RNA, které jsou velice stabilní a snadno detekovatelné.

Nacházejí se i v tělních tekutinách, jako např. v séru, plazmě, moči aj. Cíl Zjistit, zda cirkulující sérové miRNA mohou sloužit jako marker EM u pacientů s MM. Materiál a metody Analýza 667 miRNA byla provedena na 5 EM vzorcích, 5 nově diagnostikovaných MM vzorcích a 6 vzorcích séra zdravých dárců na platformě TaqMan Low Density Arrays (TLDA) od Life Technologies. Následná analýza sérových vzorků proběhla pomocí metody qPCR a miRNA specifických primerů a sond na 144 vzorcích ve dvou nezávislých kohortách (testovací kohorta: 35 nově diagnostikovaných MM, 35 EM, a 30 zdravých dárců; validační kohorta: 14 nově diagnostikovaných MM, 10 MM v relapsu, 20 EM). Ve validační kohortě byli všichni MM pacienti vyšetřeni pomocí PET/CT k vyloučení přítomnosti EM. Pro normalizaci byla vybrána miR-106b, jakožto nejvíce stabilní miRNA ověřena pomocí GenEx softwaru. Hladina $p < 0,05$ byla považována za signifikantní. Výsledky TLDA analýza ukázala 14 deregulovaných miRNA mezi MM a EM vzorky a 20 deregulovaných miRNA mezi EM a HD vzorky. miR-130a byla vybrána pro další validaci, protože byla deregulována mezi všemi skupinami. qPCR potvrdila TLDA data, a to statisticky významně sníženou hladinu miR-130a v MM a EM vzorcích oproti HD vzorkům v testovací kohortě ($p < 0,05$) a navíc statisticky významně sníženou hladinu miR-130a v EM vzorcích oproti MM ve validační kohortě ($p < 0,05$). miR-130a v ROC analýze dokázala odlišit EM od MM s AUC = 0,598, specificitou 94,3 % a sensitivitou 25,7 % v testovací kohortě a s AUC = 0,723, specificitou 87,0 % a sensitivitou 50,0 % ve validační kohortě. U EM pacientů miR-130a negativně korelovala s infiltrací kostní dřeně plazmatickými buňkami ($p < 0,05$). Závěr Tato práce ukázala, že miR-130a má potenciál stát se snadno dostupným, minimálně invazivním markerem EM relapsu u MM pacientů a přispět tak k rychlejší detekci této formy onemocnění. Tato práce byla podpořena grantem NT14575.

2793.

Detekce minimální residuální choroby ze séra pacientů s mnohočetným myelomem

Sedlářková L., Bešše L., Kubáčková V., Almáši M., Penka M., Adam Z., Pour L., Krejčí M., Hájek R., Ševčíková S. (Babáková myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno; Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice, Brno; Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice, Brno; Interní hematooonkologická klinika, Fakultní nemocnice, Brno; Ústav klinické hematologie, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava)

Úvod: Detekce minimální residuální choroby (MRD) je u mnohočetného myelomu (MM) možná pomocí alelově specifické (ASO) real-time kvantitativní PCR (qPCR) či droplet-digitální PCR (dd-PCR) založené na detekci specifické přestavby genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (IGH) u klonálních plazmatických buněk (PB). Tento přístup je pro pacienty zatěžující, jelikož vyžaduje pravidelné odběry kostní dřeně (KD). Bylo prokázáno, že nádorově odvozená volně cirkulující DNA (cfDNA) ze séra periferní krve (PK) může být použita pro monitorování nádorové zátěže a odpovědi na léčbu u pacientů s malignitami. CfDNA tak mají potenciál stát se neinvazivním markerem i pro MM. Cíl: Cílem studie bylo zaměřit se na možné využití cfDNA pro sledování MRD u pacientů s MM. Metody: CfDNA byla extrahována z 1 ml vzorku séra pacientů s MM za použití Circulating Nucleic Acids Isolation Kit (Qiagen). Dále byla kvantifikována pomocí Qubit dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies) a délka fragmentů byla hodnocena pomocí High Sensitivity dsDNA čipů (Agilent). IGH přestavba specifická pro pacienty byla identifikována z genomové DNA z KD a CD138+ buněk z doby diagnózy, jak bylo popsáno (Ladetto et al., 2000). Pro každého pacienta byla stanovena hladina MRD z KD i PK pomocí dd-PCR (Biorad) a qPCR (Applied Biosystems) s použitím ASO primerů a sond. Výsledky byly vyjádřeny jako počet kopií na 1 µg celkové cfDNA a byly interpretovány v souladu s pokyny EuroMRD. Výsledky: Výtěžek cfDNA byl v průměru 57,07 ng (12,5–132,5) a nejvíce zastoupené frakce 180-220 bp, 350-400 bp a 700-10 000 bp. Hladina specifické cfDNA byla detekována pomocí qPCR celkově u 7 vzorků z doby dg. a následných odběrů. Pouze 3/7 vzorků bylo kvantifikovatelných, 4/7 vzorků bylo pozitivních, mimo kvantifikovatelný rozsah (PNQ). Pomocí dd-PCR bylo vyhodnoceno 3/7 jako kvantifikovatelných a 1/7 jako PNQ. V současné době probíhá identifikace IGH přestavby a analýza cfDNA u dalších 10 pacientů s MM. Závěr: Naše data ukazují na potenciál využití nádorově specifické cfDNA pro monitorování MM pacientů. Avšak použití většího množství séra je nezbytné k překonání omezené citlivosti tohoto přístupu. Potenciální výhody a prediktivní hodnotu cfDNA je nutné ověřit na větším souboru pacientů. Podpořeno grantem IGA NT14575. Reference: Ladetto M et al. Real-Time polymerase chain reaction of immunoglobulin rearrangements for quantitative evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2000;6(3):241-53.

AKUTNÍ LEUKÉMIE

2785.

Léčba akutní lymfoblastické leukémie v dětském věku

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

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2792.

Pokroky v diagnostice a léčbě akutní lymfoblastické leukemie dospělých

Doubek M., Folber F., Horáček J., Hrabovský Š., Šálek C. (Interní hematologická a onkologická klinika, LF MU a FN, Brno; IV. interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2735.

Sérový profil cytokinů a adhezních molekul se liší u pacientů s nově diagnostikovanou akutní myeloidní a lymfoblastickou leukémií

Horáček J. M., Kupsa T., Karešová I., Jebavý L., Žák P. (Katedra vojenského vnitřního lékařství a vojenské hygieny, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové; Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice, Hradec Králové; 4. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové)

Úvod: Cytokiny a adhezní molekuly jsou studovány jako markery aktivace imunitního systému u různých chorob včetně hematologických malignit. Poznatky získané z těchto studií by mohly umožnit zlepšení diagnostiky a léčby těchto onemocnění. Cílem studie bylo porovnání sérových koncentrací 17 cytokinů a 5 adhezních molekul u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML), akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) a u zdravých jedinců. Metodika: Do studie bylo zařazeno 15 pacientů s nově dg. AML, 15 pacientů s nově dg. ALL a 15 zdravých jedinců (dárci krve). Hodnotili jsme sérové koncentrace 17 cytokinů a 5 adhezních molekul: interleukiny (IL-1 alpha, IL-1 beta, 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-alpha (TNF-alpha), interferon-gamma (IFN-gamma), epidermal growth factor (EGF), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), E-selectin, L-selectin, P-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Všechny analyty byly měřeny biočipovou technologií na analyzátoru Evidence Investigator (Randox). Hodnoty $p < 0,01$ byly považovány za statisticky významné. Výsledky: U pacientů s nově dg. AML jsme ve srovnání se zdravými jedinci zjistili statisticky významné zvýšení sérové koncentrace VCAM-1, ICAM-1, E-selectinu a L-selectinu. U pacientů s nově dg. ALL jsme ve srovnání se zdravými jedinci zjistili statisticky významné zvýšení sérové koncentrace IL-8, L-selectinu, VCAM-1, ICAM-1 a MCP-1. Dále jsme u pacientů s ALL zjistili statisticky významné snížení sérové koncentrace IL-3 a IL-4. Při srovnání pacientů s AML a ALL jsme zjistili statisticky významné rozdíly u IL-2, IL-4 a VCAM-1 (u AML byly vyšší koncentrace IL-2, IL-4 a nižší koncentrace VCAM-1). Rozdíly v sérových koncentracích ostatních cytokinů a adhezních molekul nebyly statisticky významné. Závěr: Naše výsledky ukazují, že sérové koncentrace některých cytokinů a adhezních molekul jsou významně odlišné u pacientů s nově dg. akutní leukémií ve srovnání se zdravými jedinci a mají vztah k aktivitě onemocnění. Sérový profil cytokinů a adhezních molekul se liší u pacientů s nově dg. AML a ALL. Není jasné, zda tyto změny mohou sloužit jako prognostický marker u akutních leukémií. Další studie na větším počtu pacientů a srovnání se zavedenými prognostickými faktory budou nezbytné. Práce byla podpořena z projektu RO 1011 (FVZ).

2737.

Indukční chemoterapie akutní myeloidní leukemie (AML) založená na vysokých dávkách cytosinarabosidu – hodnocení výsledků léčby s dlouhodobým odstupem

Szotkowski T., Hubáček J., Sičová K., Vrbková J., Šulavíková Z., Minařík J., Indrák K. (Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc; Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP, Olomouc)

Indukční chemoterapie má základní roli v léčbě AML. Kromě nemocných s promyelocytární leukémií je již více než čtyři desítky let zlatým standardem léčby AML chemoterapie založená na kombinaci cytosinarabinosidu (AraC) a antracyklinů. Jednotlivé léčebné protokoly se liší dávkováním těchto léků a v některých případech i přidáním třetího cytostatika. AraC je dnes v indukci obvykle podáván v kontinuální infúzi v dávkách 100-200 mg/m² tělesného povrchu. Existují i protokoly s vysokými, tj. gramovými dávkami tohoto cytostatika (HDARA). Od této léčby se ale v posledních letech ustupuje a v léčbě je nyní akcentován význam vyšších dávek daunorubicinu. Cílem této práce je hodnocení účinnosti a časné toxicity indukční léčby AML založené na HDARA a jejich porovnání s výsledky léčby jinými indukčními chemoterapeutickými režimy u nemocných léčených na Hemato-onkologické klinice FN Olomouc. Účinnost byla hodnocena počtem dosažených kompletních remisí, časná toxicita měřena délkou hospitalizace od zahájení chemoterapie, počtem febrilních dnů, délkou ATB terapie, počtem podaných transfúzních přípravků a počtem úmrtí nesouvisejících s progresí AML. Indukční léčba obsahující HDARA byla na našem pracovišti podávána v letech 2002-2007, především mladším nemocným a pacientům bez komorbidit, u kterých bylo možné předpokládat lepší toleranci tohoto potenciálně toxičtějšího režimu. Celkově bylo takto léčeno 30 ze 128 (23,4%) nemocných s AML (mimo M3). Medián věku skupiny nemocných léčených HDARA byl 45 let. Kompletní remise dosáhlo celkem 28 (93,3%) nemocných, 22 (73,3%) již po první indukční léčbě, 4 nemocní po záchranné chemoterapii podle protokolu FLAG a dva nemocní až po alogenní transplantaci krvetvorných buněk (ATKB). V neselektovaném souboru všech 82 nemocných léčených v následném období (2008-2012) protokolem 7+3 se standardními dávkami antracyklinů a AraC byl medián věku 56 let. Kompletní remise bylo dosaženo celkem u 56 (68,3%) nemocných; u 40 (48,8%) po prvním cyklu indukce, u 11 (13,4%) po druhém cyklu indukce resp. po záchranné chemoterapii FLAG a u 5 nemocných (6,1%) až po ATKB. Podrobné údaje budou prezentovány. Indukční režim léčby akutní myeloidní leukémie založený na HDARA je ve shodě s literárními údaji významně účinnější než režim se standardními dávkami cytostatik. Vyšší toxicita tohoto režimu nebyla potvrzena. Závěry je však nutné hodnotit s vědomím výrazné selekce souboru takto léčených nemocných. Práce byla podpořena grantem IGA_LF_2015_001

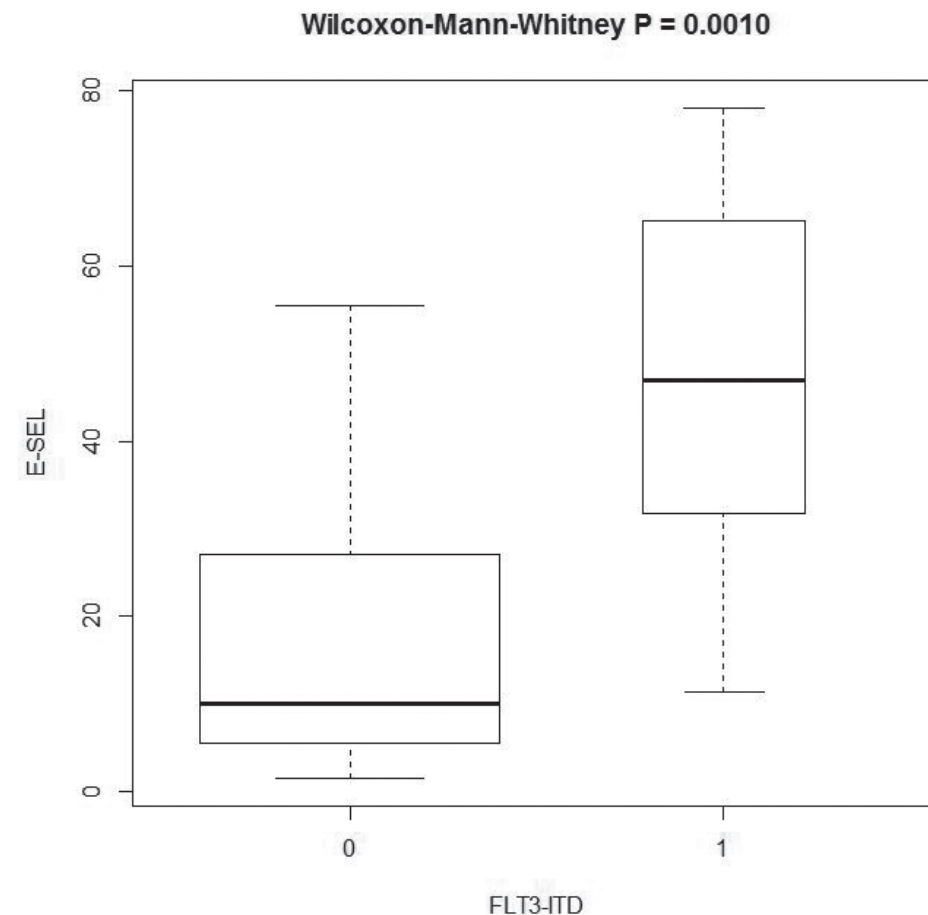
2684.

Sérové hladiny vybraných cytokinů a solubilních adhezních molekul korelují u pacientů s nově diagnostikovanou akutní myeloidní leukémií: Vliv TNF-ALFA a FLT3-ITD

Kupsa T., Vaněk J., Vašatová M., Karešová I., Jebavý L., Žák P., Horáček J. M. (Katedra vojenského vnitřního lékařství a vojenské hygieny, Fakulta vojenského zdravotnictví, Hradec Králové; Ústav informatiky a kvantitativních metod, Univerzita Hradec Králové; Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice, Hradec Králové; IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové a Univerzita Karlova, Lékařská fakulta, Hradec Králové)

Úvod: Rezistence akutní myeloidní leukémie (AML) k terapii je prognosticky nepříznivá. Předpokládaným molekulárním mechanismem je mimo jiné interakce prozánětlivých cytokinů jako je tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α) s buňkami endotelu a následná zvýšená exprese adhezních molekul. Cíl: Ověřit hypotézu, že hladiny cytokinů a solubilních adhezních molekul korelují u nemocných s AML. Metodika: Byl studován soubor 53 pacientů s nově zjištěnou AML (20 mužů, 33 žen, věk 53,1 \pm 13,4 let, medián 56,4 let). Dle standardní prognostické stratifikace byla AML u 11 nemocných nízkého, u 22 středního a 20 vysokého rizika. Sekundární AML mělo 21 nemocných, FLT3-ITD mutaci mělo 12 pacientů. Hodnotili jsme sérové hladiny 17 cytokinů a 5 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), TNF- α , vascular endothelial growth factor, interferon-gama (IFN- γ), epidermal growth factor, monocyte chemoattractant 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 pomocí biochip array technologie na analyzátoru Evidence Investigator (Randox). Statistická analýza byla provedena v R 3.1.2. Do analýzy jsme dále zahrnuli počet leukocytů, věk, sekundární původ nemoci, FLT3-ITD, CRP a dosažení remise indukční terapií. Odchytky s $p < 0.05$ byly považovány za signifikantní. Výsledky: VCAM-1 koreloval s ICAM-1 ($p < 0.0001$), E-selektinem ($p < 0.0001$), počtem leukocytů ($p = 0.0005$) a TNF- α ($p = 0.0035$). E-selektin dále koreloval s počtem leukocytů ($p < 0.0001$), P-selektinem ($p = 0.0032$) a MCP-1 ($p = 0.0119$). CRP korelovalo s IL-6 ($p < 0.0001$). Počet leukocytů negativně koreloval

s IL-7 ($p = 0.0318$). FLT3-ITD byla spojena s vyšším E-selektinem ($p = 0.0010$) a nižším IL-7 ($p = 0.0252$). Nemocní se sekundární AML byli starší ($p = 0.0008$). Selhání indukční léčby bylo spojeno s nesignifikantním zvýšením CRP a snížením P-selektinu. Hlavní komponenta byla ovlivněna počtem leukocytů ($p < 0.0001$), FLT3-ITD ($p = 0.0017$) a sekundárním původem AML ($p = 0.0439$). Závěr: Hladiny některých cytokinů, adhezních molekul a počet leukocytů významně korelovaly u nemocných s nově zjištěnou AML. Porozumění těmto molekulárním mechanismům se může stát základem nových léčebných přístupů v hematologii. Práce byla podpořena z Projektu specifického výzkumu „Analýza vybraných prognostických markerů u nemocných s AML“ a z projektu RO 1011 (FVZ).



KONFERENCE – ZDRAVOTNÍ LABORANTI 2

2694.

Cytologie lymfoproliferativních onemocnění

Starostka D., Koláček D., Mikula P. (Oddělení klinické hematologie, Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., Havířov)

Cytologické vyšetření je spolu s histologií/imunohistochemií, průtokovou cytometrií a genetickými analýzami nedílnou součástí komplexní diferenciální diagnostiky lymfoproliferativních onemocnění. Velkou výhodou cytologického vyšetření je snadnost a rychlost analýzy, stejně jako u ostatních diagnostických modalit hraje u této metody důležitou roli zkušenost laboratorních pracovníků. U cytologie jsou vyšetřovaným materiálem nátěry periferní krve a kostní dřeně, otiskové preparáty lymfatických uzlin nebo preparáty tělesných tekutin (punkrát či mozkomíšni mok) zpracované cytocentrifugací, které jsou následně barveny panoptickým barvením podle Pappenheima (barviva May-Grünwald, Giemsa-Romanowski) a vyšetřovány ve světelném mikroskopu. Stanovuje se početní zastoupení patologických lymfocytů; hodnocené morfologické prvky při 1000-násobném zvětšení zahrnují: velikost buněk, poměr cytoplazmy a jádra, tvar a lokalizace jádra, charakter jaderného chromatinu, přítomnost nukleolů, barvitelnost cytoplazmy, přítomnost intracytoplazmatických vakuol, granulí nebo inkluzí. Prezentace dále podrobně shrnuje a obrazově dokumentuje cytologické rysy vybraných zralých lymfoidních neoplázií.

2795.

Diagnostika CLL - kazuistika

Zadražilová V., Kropáčková J., Novosadová A., Dřimalová H., Novák M., Jarošová M. (Hematologická klinika, FN, Olomouc)

Chronická lymfocytární leukemie (CLL) je nejčastější leukémií dospělých na západní polokouli a představuje 25 – 30 % ze všech leukémií. Současné poznatky o patogenезi CLL potvrzují, že se jedná o velmi heterogenní onemocnění, kdy někteří nemocní umírají během několika roků od diagnózy a jiní žijí desítky let bez potřeby léčby. Komplexní laboratorní diagnostika je nezbytná nejen k potvrzení diagnózy, ale i k určení prognózy nemocných a na základě prognózy k volbě správného, na míru nemocného šitého (personalizace léčby), léčebného přístupu. Cílem sdělení je na příkladu kazuistiky nemocného s CLL ukázat význam a roli laboratorních metod v diagnostice a určení prognózy CLL nemocných. Diagnostika CLL je laboratorně spojena s analýzou krevního obrazu popřípadě kostní dřeně a výsledkem imunofenotypizačního vyšetření. Při rutinním vyšetření periferní krve se často setkáváme s náhodným zjištěním leukocytózy tvořené lymfocyty (>5x10⁹/l), v krevním nátěru pozorujeme uniformní „zralé“ lymfocyty a Gumprechtovy stíny. Klonalitu lymfocytů potvrdí průtoková cytometrie na základě typického imunofenotypu CD5+, CD19+ a CD23+. Významnou roli v určení prognózy hraje cytogenetika a molekulární genetika. Kromě klasické cytogenetiky vyžadující k analýze dostatek mitóz, má pro určení prognózy CLL, tedy onemocnění s malou buněčnou proliferací a řadou buněk v G0 fázi, význam metody FISH a arrayCGH, které nevyžadují k analýze mitózy. Metody molekulární genetiky založené na sekvenování určují mutační stav IGVH. Kombinace výsledků cytogenetiky a molekulární genetiky, která umožňuje uplatnit moderní prognostickou stratifikaci, dovoluje zpřesnit prognózu nemocných a i individualizaci léčebného přístupu. Práce je podporována grantem IGA NT 13576 a grantem LF UP IGA 2015-001.

2794.

Akutní monoblastická a monocytární leukémie - prezentace dvou kazuistik

Dynterová A., Pánková L., Fátorová I., Jurenková A., Smolej L. (Interní a hematologická klinika FN, Hradec Králové)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2730.

Stanovení cytotoxické aktivity NK buněk na průtokovém cytometru

Vrbová J., Holubová M., Miklíková M., Lysák D., Jindra P. (Hematologicko-onkologické oddělení, FN, Plzeň; Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta UK, Plzeň; Český národní registr dárců kostní dřeně, Plzeň)

Imunoterapie je léčebný proces využívající široké spektrum složek imunitního systému od nespecifických mechanismů až po vysoce specifické monoklonální protilátky. Toto odvětví moderní medicíny se stává součástí běžné klinické praxe a je předmětem mnoha klinických hodnocení. NK buňky jsou součástí nespecifické imunitní odpovědi a mají převážně protivirovou a protinádorovou aktivitu. V protinádorové imunoterapii mají významné zastoupení a jejich využití je příslibem pro mnoho onkologických pacientů. Cílem práce je prokázat cytotoxický potenciál NK buněk a optimalizovat testování jejich účinnosti pro připravované klinické hodnocení. Na testování cytotoxické aktivity NK buněk byla použita průtoková cytometrie a stanovení podílu mrtvých nádorových buněk (buněčná leukemická linie K562). Pro rozlišení mrtvých a živých buněk byl použit marker 7AAD (Exbio, ČR) a na detekci cílových nádorových buněk fluorescenční próba CFSE (Life Technologies, USA). Nejprve byla určena optimální koncentrace CFSE. Buňky (20x10⁶) byly označeny 0,625 resp. 1 resp. 2 μM CFSE a druhý den zamrazeny v koncentraci 2x10⁶ bb/ml v FBS (Gibco, USA) s 10% DMSO (Wak-Chemie, USA). Před použitím byly buňky po rozmrazení přes noc re-kultivovány v RPMI +10%FBS (oba Gibco). Ko-kultivace s efektorovými NK buňkami probíhala v testovacích poměrech (K562:NK) 1:0,25; 1:0,5; 1:1; 1:5; 1:10 a 1:20 v SCGM médiu (CellGenix, USA) s 5% FBS a 1000IU IL-2 (Novartis, ČR) po dobu 4h, 6h a 8h. Podíl mrtvých nádorových buněk byl stanoven jako rozdíl dvojitě pozitivních (7AAD+CFSE+) buněk v ko-kultuře a v kontrole (značené K562 bez NK buněk). Zamrazení CFSE značených buněk nezpůsobilo snížení viability buněk. Intenzita CFSE po rozmrazení a re-kultivaci klesala, proto byla optimální koncentrací CFSE zvolena 2 μM. Cytotoxická aktivita buněk byla závislá na množství NK buněk. U poměrů nad 1:5 (včetně) se množství mrtvých K562 pohybovalo nad 50%. U nižších poměrů byl vidět pokles na 40% pro 1:1, 30% pro 1:0,5 a 20% u 1:0,25. Rozdíly mezi jednotlivými poměry se při delší době ko-kultivace zmenšovaly. Byl optimalizován postup testování cytotoxické aktivity NK buněk, který bude použit v rámci testování kvality léčivého přípravku. Práce byla podpořena grantem ČNRDD a MZ ČR - RVO (Fakultní nemocnice Plzeň - FNPI, 00669806).

2773.

Zajištění hemoterapie pro pacienty po transplantaci kostní dřeně/periferních kmenových buněk (TKD/TKB)

Vodičková M., Kalmanová P., Holusková I., Galuszková D. (Transfuzní oddělení, FN, Olomouc)

Úvod: Na našem transfuzním oddělení provádíme rutinně vyšetření pacientů po transplantaci kostní dřeně/periferních kmenových buněk (TKD/TKB) od roku 2000. Vyšetření provádíme v rámci předtransfuzního vyšetření, kompletního imunohematologického vyšetření a jako samostatné vyšetření krevní skupiny na žádost žadatele. Cílem je zajištění adekvátní a co nejúčinnější hemoterapie a minimalizace erytrocytární aloimunizace pro transplantované pacienty. Materiál: krevní vzorek pacienta odebraný do K3EDTA Metodika: První informaci o plánované TKD/TKB dostává vedoucí imunohematologických laboratoří prostřednictvím zprávy od lékařů Hematoonkologické kliniky. Na podkladě těchto informací vypracuje kartu pacienta po TKD/TKB včetně doporučené hemoterapie. Substituční hemoterapie vychází z toho, jedná-li se o velkou či malou event. smíšenou inkompatibilitu. Vyšetření transplantovaného pacienta zahrnuje vyšetření krevní skupiny v AB0 systému a vyšetření RhD antigenu. Vyšetření provádíme dle možností na analyzátoře Techno TwinStation nebo Swing TwinSampler firmy BioRad nebo manuálně. Rovněž u všech nových hematoonkologických pacientů potenciálně vhodných k transplantaci vyšetřujeme Rh a Kell fenotyp na kartách sloupcové aglutinace firmy Grifols. V případě, jedná-li se o příbuzenskou TKD/TKB, bývá na našem transfuzním oddělení vyšetřena i krevní skupina dárce. Výsledky: Od roku 2000 bylo u nás přešetřeno celkem 314 pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně/periferních kmenových buněk. Ve 130 případech se jednalo o příbuzenskou transplantaci a ve 184 případech byla provedena transplantace od nepříbuzenského dárce. Stejnospupinově bylo transplantováno 110 pacientů, nestejnospupinově 204 pacientů. U 149 pacientů jsme opakovaně přešetřovali krevní skupinu v AB0 a RhD, bylo provedeno celkem 846 těchto vyšetření. Závěr: Zajištění hemoterapie pro transplantované pacienty se řídí doporučením transfuziologa a vychází z typu inkompatibility mezi dárcem a příjemcem. Problémy nastávají v případě aloimunizace příjemce, kdy je nutno toto doporučení revidovat a zohlednit aktuální imunohematologický nález (nově vytvořená aloprotilátka). Vzhledem k požadavku ozáření, nutno vybírat erytrocytární transfuzní přípravky do 14.dne od odběru, de leukotizované.

2811.

Jak bezpečná je léčba CML tyrosin kinázovými inhibitory?

Mayer J., Ráčil Z., Žáčková D. (Interní hematologická klinika, FN, Brno)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2766.

Bude digitální PCR technologií příští generace pro přesnou a citlivou kvantifikaci BCR-ABL1 a monitorování hluboké molekulární odpovědi u CML?

Žižková H., Zemanová K., Klamová H., Zach J., Motlová E., Saussele S., Mahon F., Machová Poláková K. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; III. Med. Klinik, Universitätsmedizin Mannheim, der Universität Heidelberg, Mannheim – Germany; Hôpital Haut Lévêque, Centre Hospitalier Universitaire, Bordeaux – France)

Citlivé a standardizované monitorování hluboké molekulární odpovědi (MR) založené na měření hladiny transkriptu BCR-ABL1 je zásadní pro léčbu pacientů s CML. Současná metodika měření je založena na RT-qPCR. Stále více laboratoří však testuje novou metodu absolutní kvantifikace - digitální PCR (ddPCR), která může zvýšit přesnost a citlivost měření. Cílem práce je porovnat citlivost a přesnost metod ddPCR a RT-qPCR při kvantitativním stanovení hladin transkriptů BCR-ABL1, a porovnat hladiny BCR-ABL1 na úrovni mRNA a DNA metodou ddPCR. Metoda RT-qPCR používaná v naší EUTOS MR4.5 laboratoři je standardizovaná a přepočtový koeficient pro vyjadřování výsledků v mezinárodním měřítku (IS) s použitím kontrolních genů ABL1 nebo GUSB je pravidelně validován. Pro metodu ddPCR byl použit systém QX-200 (Biorad). Pro porovnání přesnosti kvantifikace metod byly hodnoceny poměry počtu kopií genů (BCR-ABL1/ABL1 a BCR-ABL1/GUSB) detekované u 6 WHO standardů ERM-AD623. Singleplex RT-qPCR poskytovala poměry v rozmezí 0,63 - 1,11 (Me=0,85), singleplex ddPCR 0,92 - 1,29 (Me=1,02) a multiplex ddPCR 0,93 - 1,0 (Me=0,99). Metody RT-qPCR a ddPCR byly porovnány měřením vzorků pacientů s CML léčených TKI s hladinami BCR-ABL1 mRNA v rozmezí 0,01 - 10% IS. K porovnání výsledků byla použita Bland-Altmanova statistická metoda – výsledná charakteristika antilog bias byla 0,54 pro 31 párových měření. Pro porovnání citlivosti detekce BCR-ABL1 bylo testováno 66 vzorků 7 pacientů zařazených do studie EURO-SKI (Europe Stops TKI in CML) od okamžiku potvrzení MR4.0 a dále po vysazení léčby TKI. Srovnáním 37 párových výsledků z měření RT-qPCR a ddPCR u vzorků s hladinou BCR-ABL1 mRNA <0,01% IS byla zjištěna výsledná hodnota antilog bias 0,23. Metodou RT-qPCR bylo detekováno 26/66 BCR-ABL1 negativních vzorků, metodou ddPCR pouze 6/66. Hladina DNA BCR-ABL1 byla analyzována u 26 vzorků 4 pacientů ve studii EURO-SKI pomocí pacient-specifických testů. Hladiny BCR-ABL1 na úrovni mRNA a DNA spolu významně korelovaly ($r=0,9038$, $p<0,0001$). Obě metody poskytovaly srovnatelné výsledky při kvantifikaci hladiny BCR-ABL1 mRNA v rozmezí 0,01 - 10% IS. U vzorků MR4.0-MR5.0 detekovala ddPCR přibližně o 1 řád vyšší hladiny BCR-ABL1 mRNA ve srovnání s RT-qPCR. Citlivější měření ddPCR s přesnější kvantifikací může přinést zásadní informaci při rozhodování o přerušení léčby TKI. Podporováno: MZČR pro koncepční rozvoj VO (00023736) a EURO-SKI Research Consortium

2721.

Plasma and leukocyte metabolomics of patients with chronic myeloid leukaemia

Friedecký D., Karlíková R., Mičová K., Hrdá M., Šíroková J., Vrobel I., Gardlo A., Najdekr L., Faber E., Adam T. (Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc; Department of Hemato-Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University in Olomouc, University Hospital, Olomouc; Department of Clinical Chemistry, University Hospital, Olomouc)

Metabolomics refers to the interpretation of information-rich data with the aim to understand metabolic processes and to find changes in metabolite levels as a potential biomarkers of the disease. The aim of this work was to examine the influence of tyrosine kinase inhibitors and hydroxyurea on the leukocyte and plasma metabolite profiles from patients with CML compared with healthy controls. Leukocytes and

plasma samples 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 prepared 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 quantified using MultiQuant 3.0 software and statistically evaluated in R programme language with statistics packages. For metabolisation study plasma samples were taken from patients on treatment by imatinib (24h after dose of 400mg). Results: Total 170 metabolites were identified on the basis of its transition and retention time in all leukocyte and plasma 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. In this study metabolome of human leukocytes and plasma was defined and changes of metabolite levels were observed in all groups of patients compared to healthy controls. It has diagnostic potential for individualized treatment of patients with adverse effects or resistance on treatment. Support: IGA MZCR NT12218-4/2011, MSMT CZ.1.05/2.1.00/01.0030 and MSMT CZ.1.07/2.3.00/30.0004.

2687.

Significance of anemia in patients with CML at diagnosis and during the treatment with imatinib outside the clinical trials: CAMELIA Registry experience

Faber E., Mužík J., Janoušová E., Dufková T., Jindra P., Crunt E., Sninská Z., Demitrovičová L., Mikušková E., Chudej J., Markuljak I., Palášthy S., Štecová N., Tóthová E., Dušek L., Indrák K. (Department of Hemato-Oncology, Faculty Hospital Olomouc, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc; Institute of Biostatistics and Analyses, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno; Department of Hemato-Oncology, University Hospital, Pilsen; Ist Internal Department, University Hospital, Prague; Institute of Hematology and Blood Transfusion, University Hospital, Bratislava – SK; Department of Hemato-Oncology, National Cancer Institute, Bratislava – SK; Department of Clinical Hematology, University Hospital, Martin – SK; Department of Clinical Hematology, University Hospital, Department of Clinical Hematology, University Hospital, Banská Bystrica – SK; Department of Clinical Hematology, University Hospital, Prešov – SK; Department of Clinical Hematology, University Hospital, Košice – SK; HEMKO Ltd., Košice – SK)

Attention of physicians caring for CML patients is seldom focused on anemia as it was not shown to be an independent prognostic factor and it may have different causes during the course of disease. We retrospectively evaluated prognostic and clinical importance of anemia in CML patients treated with imatinib in CAMELIA Registry. Anemia was defined by hemoglobin level lower than 120g/l. Single center survey of quality of life in 32 CML patients with and 31 without anemia was performed. For statistical testing Mann-Whitney test and Fisher exact test, for survival analysis Kaplan-Meier method with log-rank test were used. Anemia was identified at diagnosis in 211 (45%) from 469 patients in first chronic phase of CML treated with imatinib. Anemia had strong correlation with higher risk scores in all prognostic systems (Sokal, Hasford, EUTOS; $p<0,001$). Patients with anemia had significantly higher numbers of WBC (median=175.6 vs 48.0 $p<0,001$) and more frequent splenomegaly ($p<0,001$). Response to the treatment was similar: major molecular response was achieved in 72.5% and 68.7% of patients without and with anemia, respectively. However, when assessing overall survival with the end-point death caused by CML, anemia was associated with worse outcome (log-rank test $p=0,013$). There were 23 deaths caused by CML among 31 dead patients with anemia (74.2%) but only 11 out of 28 deaths (39.3%) in the group of patients without anemia ($p=0,009$). During the treatment with imatinib anemia was identified in 91 (19.4%) patients at one or more occasions. There was no correlation with the anemia or risk scores at diagnosis. There was a trend towards association of anemia with age over 60 years (24.4% vs 16.9%; $p=0,063$). Anemia during the treatment was not associated with response to treatment, but has significant impact on quality of life: patients spent more time in bed ($p=0,014$), less time outside the flat or house ($p<0,001$), they suffered more from dyspnea ($p=0,022$) and there were trends for lower Karnofski score ($p=0,057$), unemployment ($p=0,077$) or sport capacity ($p=0,079$). Anemia at diagnosis in CML patients from CAMELIA Registry was frequent and was associated with the high-risk features. A significant association of anemia at diagnosis was found with CML-related death rate. During the treatment, anemia was found in 20% of patients, affected more frequently elderly patients and had negative impact on quality of life.

2732.

Individualizovaná terapie IFN a omezení selekčního tlaku tyrosin kinázových inhibitorů (TKI) vede k dosažení MMR a eliminaci mutovaného BCR-ABL transkriptu u vysoce rizikových pacientů s CML

Polívková V., Rohoň P., Čuřík N., Klamová H., Černá O., Divoká M., Zach J., Novák M., Marinov I., Soverini S., Faber E., Machová Poláková K. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha – CZ; Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Olomouc – CZ; Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha – CZ; Institute of Hematology “L. e A. Seràgnoli”, University of Bologna, Bologna – Italy)

Pacienti s CML, u kterých z důvodu rozvoje multi-rezistentní mutace T315I v kinázové doměně (KD) BCR-ABL není efektivní terapie TKI, je možné léčit ponatinibem nebo provést transplantaci kostní dřeně. V některých případech však tyto léčebné postupy nelze použít. Alternativou je pak léčba IFN-alfa samostatně nebo v kombinaci s TKI. Při užití imunomodulačního léku s účinkem nezávislým na BCR-ABL předpokládáme represí rezistentního mutovaného klonu. Sledovali jsme vliv ukončení terapie TKI a nasazení IFN-alfa u pacientů s multirezistentními mutacemi v KD BCR-ABL. Terapeutický efekt byl hodnocen na základě sledování dynamiky mutovaného BCR-ABL mRNA, změn v imunitní odpovědi indukované terapií a celkové léčebné odpovědi. Dynamika mutovaného transkriptu byla sledována u 6 pacientů. Bylo provedeno 54 sekvenčních analýz cDNA KD BCR-ABL (medián 6 vzorků/pacienta). Výchozím materiálem pro měření byly celkové leukocyty z periferní krve, sekvenace byla prováděna ultrahlubokým sekvenováním nové generace (GS Junior, Roche). Základní analýzy imunoprofilů měřené pomocí průtokové cytometrie sledovaly populace CD4+, CD8+, regulačních T-lymfocytů a NK buněk a byly provedeny u 5/6 pacientů v průběhu změn terapie. U 3/6 pacientů došlo po přerušení terapie TKI a použití IFN-alfa k poklesu hladiny mutovaného transkriptu BCR-ABL pod hranici detekce a k dosažení velké molekulární odpovědi. U 1/6 pacientů byla terapie IFN-alfa ukončena po vymizení BCR-ABL transkriptu T315I a pacient v kompletní cytogenetické odpovědi byl dále léčen nilotinibem bez detekce mutace T315I v dalších 18 měsících. U jednoho pacienta v MMR byl pozorován pokles CD3+ T-lymfocytů a zvýšená hladina NK buněk. U dalších byla pozorována zvýšená hladina NK buněk pravděpodobně v souvislosti s aktivací imunitního systému předchozí terapií dasatinibem, která byla posílena použitím kombinace IFN-alfa a TKI. U 2/6 pacientů nevedlo přerušení TKI terapie a nasazení IFN-alfa k poklesu mutovaných BCR-ABL transkriptů ani dosažení léčebné odpovědi. Pacienti s vysoce rezistentními mutacemi k léčbě TKI mohou dosáhnout CCgR a MMR na základě individualizované terapie IFN-alfa. U pacientů, kteří reagovali na změnu léčby vymizením mutovaného BCR-ABL klonu, bylo léčebné odpovědi dosaženo aktivací antileukemické imunitní odpovědi. Vysoce citlivá detekce mutovaného BCR-ABL transkriptu pomáhá optimalizovat individualizovanou terapii. Podporováno: MZČR pro koncepční rozvoj VO (00023736), IGA NT1389 MZČR a IGA LF UP 01-2015.

2828.

Mutace genu pro calreticulinu u dětských pacientů s esenciální trombocytémií

Pospíšilová D., Divoká M. (Dětská klinika, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice, Olomouc; Hemato-onkologická klinika, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice, Olomouc)

Úvod: Esenciální trombocytémie (ET) patří mezi Ph-negativní chronické myeloproliferace (MPN), které jsou v dětském věku extrémně vzácné (incidence 1:10 000 000). Genové mutace JAK2 V617F a MPL W515, typické pro MPN, jsou u dětí s ET přítomny významně méně často než u dospělých: JAK2mut pouze u 15-40% případů, MPLmut v 10% případů. V r. 2013 byly identifikovány mutace v exonu 9 genu pro calreticulinu (CALR), které byly prokázány u 70-80% JAK2 a MPL negat. dospělých pacientů s ET. Data o výskytu této mutace u dětí jsou zatím ojedinělá, dosud bylo publikováno pouze 6 případů dětí a mladých dospělých s ET s mutací genu pro CALR. Pacienti a metody: U 16 pacientů s ET diagnostikovanou ve věku 6-17 let (medián 14 let, 7 chlapců a 9 dívek), u kterých nebyla prokázána mutace genu pro JAK2 ani MPL byly vyšetřeny mutace genu pro CALR pomocí screeningu mutace a následně ověřeny Sangerovým? sekvenováním exonu 9. Bylo provedeno srovnání klinických a laboratorních nálezů u pacientů s pozitivním a negativním nálezem mutace. Výsledky: mutace genu CALR byla prokázána u 5/16 (35%) vyšetřených pacientů, Diagnóza u všech pacientů s pozitivním nálezem mutace byla zjištěna náhodně, žádný z pacientů neměl při

diagnóze klinické příznaky mikrovaskulární obstrukce nebo trombotické komplikace. Mezi pacienty s pozitivním a negativním nálezem nebyl rozdíl ve věku nebo počtu trombocytů při diagnóze, nálezu hypersenzitivity na EPO ani EECs. Nápadným nálezem však je výskyt retikulinové fibrózy 2-3. stupně. u dvou pacientů a přechod do myelofibrózy u dalších dvou pacientek s pozitivním nálezem mutace s odstupem -27let od stanovení diagnózy. Diskuze: vzhledem k dosud malému počtu dětských pacientů s ET s pozitivním nálezem mutace genu pro CALR zatím nelze stanovit jednoznačně závěry. Pozornost rozhodně zasluhuje častá asociace mutací CALR s výskytem retikulinové fibrózy a progresí do myelofibrózy při sledování pacientů, které je v kontrastu s dosud publikovanými údaji v souborech dospělých pacientů. Naše data potvrzují hypotézu o nižší incidenci somatických mutací u ET v dětském věku a o nutnosti dlouhodobého klinického sledování i při nenápadném klinickém nález. Zvýšenou tendenci vývoje myelofibrózy u dětských pacientů s mutací CALR může potvrdit pouze studie s dostatečně reprezentativním počtem pacientů.

MONOKLONÁLNÍ GAMAPATIE 2

2779.

Nemoci způsobené protilátkovou aktivitou monoklonálního imunoglobulinu – zkušenosti s jejich léčbou

Adam Z., Krejčí M., Pour L., Micháková E., Sandecká V. (Interní hematologická a onkologická klinika, LF MU a FN, Brno)

Monoklonální imunoglobulin představuje ve většině případů jen marker masy klonálních plazmocytů či lymfoplazmocytů, nevyvolávající autoimunitní projevy. U malé části osob s monoklonálním imunoglobulinem se můžeme setkat s vazbou této protilátky na některé tělu vlastní antigeny a klinickými projevy autoimunity, zprostředkovanými právě touto monoklonální protilátkou. Monoklonální imunoglobuliny typu IgM způsobují autoimunitní projevy častěji, než monoklonální imunoglobuliny typu IgG nebo typu IgA. V souboru našich pacientů s monoklonálními gamapatiemi jsme od roku 2000 pozorovali 1 případ pemphigu, který způsoboval monoklonální imunoglobulin typu IgA, 4 případy kožních mucinóz (skléredému a skleromyxedému) provázené přítomností monoklonálního imunoglobulinu, 3 případy nemoci chladových aglutininů, 1 případ myopatie, 4 případy kryoglobulinémie, z toho dva případy smíšené kryoglobulinémie, 2 případy Schnitzlerova syndromu. Nejasná souvislost je mezi monoklonálním imunoglobulinem a některými projevy histologicky řazenými do skupiny juvenilního xantogranulomu. Monoklonální gamapatii a nějakou z forem juvenilního xantogranulomu jsme pozorovali u 4 osob. Cílem sdělení je poukázat na tyto velmi vzácné nemoci a prezentovat vlastní zkušenosti s jejich léčbou a podat přehled současných znalostí.

2744.

Laboratorní a klinické aspekty proteinové analýzy u nemocných s nově diagnostikovanou Waldenströmovou makroglobulinémií

Pika T., Lochman P., Heřmanová Z., Juráňová J., Minařík J., Ščudla V. (Hematoonkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc; Oddělení klinické biochemie, FN, Olomouc; Ústav imunologie, LF UP a FN, Olomouc)

Úvod: Waldenströmova makroglobulinémie (WM) je vzácné onemocnění, které je charakterizované infiltrací kostní dřeně nádorovými buňkami lymfoplazmocytárního lymfomu a produkcí monoklonálního imunoglobulinu (MIg) IgM izotypu. Cíl: Cílem studie je detailní analýza hladin MIg u nemocných s nově diagnostikovanou WM s využitím konvenční elektroforézy, nefelometrických a turbidimetrických technik, a analýza vztahu k vybraným laboratorním parametrům onemocnění (viskozita, kryoprecipitace). Metody: Vyšetřeny jsou soubor zahrnuje 15 vzorků séra u nemocných s WM s izotypem IgM kappa. Stanovení MIg gelovou elektroforézou (SPE) bylo provedeno systémem Sebia Hydrasys s pomocí souprav Sebia Hydragel 30 Protein(e). Pro imunofixační analýzy byly využity soupravy Hydragel 4 IF. Pro turbidimetrickou analýzu hladin těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu (HLC) bylo užito souprav HevyLiteTM Human IgMk, s využitím turbidimetru SPAplus. Pro nefelometrickou analýzu HLC párů bylo užito nefelometru BN II a souprav HevyLiteTM IgMk. Výsledky: Medián koncentrace celkové bílkoviny (CB) séra činil 95,3 (73,4 – 131,6 g/l). Při srovnání hladin IgM MIg stanovených SPE (5 – 60 g/l) a hladin IgMk stanovených systémem SPAplus (9 – 155 g/l) resp. BN

II (9,3 – 262 g/l) byly zjištěny pozitivní korelace ($r = 0,928$, $p < 0,0001$) resp. ($r = 0,803$; $p < 0,001$), avšak s mediánem diferencí 144% resp. 156% (ICC 0,213). Při srovnání hladin Mlg detekovaných SPE a turbidimetricky stanovených hladin celkového IgM (7,8 – 105,7 g/l) byly zjištěny pozitivní korelace ($r = 0,942$, $p < 0,0001$) s mediánem diferencí 87%. Identicky, v případě srovnání SPE a nefelometricky stanovených koncentrací IgM (8 – 102 g/l) byly zjištěny pozitivní korelace ($r = 0,946$, $p < 0,0001$) s mediánem diferencí 72%. Suprese hladin polyklonálních imunoglobulinů byla zjištěna u 7 nemocných s aktivní formou onemocnění, ve 4 případech byly zjištěny kryoprecipitační vlastnosti Mlg. Medián viskozity séra byl 2,36 mPa.s (1,8 – 5,63), hodnoty viskozity korelovaly s hladinami Mlg ($r = 0,764$, $p = 0,001$) i hladinami CB séra ($r = 0,786$, $p = 0,001$). Závěr: Detekce a kvantifikace Mlg patří mezi stěžejní aspekty v diagnostice a sledování léčebné odpovědi u nemocných s WM. Výsledky provedené analýzy potvrzují, že stanovení vysokých koncentrací IgM Mlg pomocí analýzy HLC párů či stanovením celkového IgM je spojeno s výrazným nadhodnocením koncentrací. Standardní metodou analýzy Mlg tedy nadále zůstává SPE. S podporou grantu IGA ČR NT 12451/5, NT 14400.

2803.

Fenotypový profil Waldenströmovy makroglobulinémie

Říhová L., Všianská P., Bezděková R., Suská R., Stejskalová M., Pour L., Adam Z., Penka M., Hájek R. (Oddělení klinické hematologie, FN, Brno; Babákova myelomová skupina při Ústavu patologické fyziologie, LF MU, Brno; Interní hematologická a onkologická klinika, FN a LF MU, Brno; Klinika hematologie, FN a LF OU, Ostrava)

Úvod: Waldenströмова makroglobulinémie (WM) je relativně méně často se vyskytující lymfoproliferace z B lymfocytů, která je charakterizována přítomností monoklonální gamapatie typu IgM a infiltrací kostní dřeni lymfoplazmocytárním lymfomem. Klonální lymfocyty tvoří heterogenní skupinu skládající se z B lymfocytů, lymfoplazmocytoidních buněk a plazmocytů (PC). Vzhledem k tomu, že pro potvrzení diagnózy WM je imunofenotypizace nezbytná, vyšetření pomocí průtokové cytometrie by mělo být provedeno u každého pacienta s IgM monoklonální gamapatií. Cíl: Flow cytometrická analýza asymptomatických i symptomatických WM zaměřená na stanovení fenotypu klonálních B lymfocytů a charakterizaci PC. Pacienti a metody: Celkově bylo analyzováno 29 neléčených pacientů s potvrzenou WM (29x kostní dřeň, 25x periferní krev); medián věku 71 let (rozsah 34-82). Pomocí polychromatické průtokové cytometrie na přístroji BD FACS Canto II s reanalýzou softwarem Infinicyt byl zhodnocen fenotypový profil CD19+CD138- lymfocytů a CD38+/-CD138+/- leukocytů. Výsledky: Medián relativního počtu B lymfocytů v periferní krvi byl nízký oproti kostní dřeni [4,5 % (rozsah 0,0-53,2) vs. 30,2 % (4,3-63,3)], kdy kostní dřeň zpravidla dominují zralé klonální B lymfocyty typu kappa. Jako nejvýznamnější znaky, umožňující detekci WM klonu na pozadí normálních B lymfocytů, se jeví snížená exprese CD22 a slabá pozitivita CD25, exprese CD27 byla v rozporu s literárními údaji nízká. Poněkud problematické je stanovení tzv. lymfoplazmocytoidních buněk [0,1 % (0,0-1,6)], které v rámci průtokové cytometrie nejsou jednoznačně identifikovány a prolínají se s populací PC. PC jsou nalézány v poměrně nízkém zastoupení [0,3% (0,0-4,3)], ale přestože vykazují normální CD19+ fenotyp, jsou u většiny pacientů klonální. U 16% (4/25) pacientů byly nalezeny pouze polyklonální PC, a tedy zřejmě nedošlo k plazmocelulární diferenciaci WM klonu. Shrnutí: V rámci WM jsou identifikovány různé klonální subpopulace zahrnující B lymfocyty a jejich diferencované formy. Průtoková cytometrie umožňuje odlišení těchto subpopulací na základě fenotypového profilu povrchových znaků se současným stanovením cytoplazmatické klonality, což je užitečné nejen pro jednoznačné stanovení diagnózy, ale také pro případné stanovení rizika progresu WM.

2834.

Castlemanova choroba – multicentrický typ

Adam Z., Szturcz P., Pour L., Krejčí M. (Interní hematologická a onkologická klinika, LF MU a FN, Brno)

Multicentrická Castlemanova choroba je indolentní onemocnění zatím neobjasněné příčiny, typická je lymfadenopatie postihující uzliny ale také slezinu a výjimečně i játra. Nemoc způsobuje pravidelně B-symptomy: noční pocení, neinfekční subfebrilie až febrilie, úbytek hmotnosti. K častým příznakům patří také patologická únava (fatigue) a také příznaky závažné anémie. U osob s Castlemanovou chorobou mohou být projevy narušené imunity, například vaskulitida ale i další nádory. K vyšetření

na specializované pracoviště přivede tyto pacienty nález zvýšené koncentrace celkové bílkoviny, často přesahující 100 g/l a zmnožení imunoglobulinů. Na rozdíl od mnohočetného myelomu jsou imunoglobuliny ale polyklonální. K pravidelným laboratorním znakům multicentrické formy Castlemanovy nemoci patří anémie, zvýšená hodnota markerů zánětu (sedimentace, CRP). V našem sdělení popisujeme celkem 6 nemocných s multicentrickým typem Castlemanovy choroby. Čtyři pacienti mají ukončenou léčbu a dostali se do kompletní remise nemoci, dva z nich po kombinované léčbě obsahující thalidomid, 1 pacient po léčbě obsahující lenalidomid, 1 pacient po léčbě mabtherou. U šestého pacienta zatím není léčba ukončena. Cílem sdělení je upozornit na problémy s diagnostikou i s léčbou této velmi vzácné hematologické choroby, velmi často provázené polyklonálním zmnožením imunoglobulinů.

2745.

Klinické, laboratorní a diferenciálně diagnostické aspekty amyloidózy

Píka T., Látalová P., Ščudla V. (Hematoonkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc; Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP a FN Olomouc)

Amyloidózy představují heterogenní skupinu onemocnění, jejichž společným rysem je depozice insolubilních fibril patologického či fyzikálně/chemicky pozměněného fyziologického proteinu ve formě amyloidových depozit, zaujímajících strukturu beta – skládaného listu. Doposud bylo identifikováno přibližně 30 amyloidogenních proteinů. Rozlišujeme amyloidózy na získané (AL, AA, wtTTR) a dědičné, vázané na mutace genů kódujících daný protein (mTTR, AFib). Dle charakteru postižení pak na lokalizované a systémové. Nejčastější je AL amyloidóza (light chain amyloidosis) patřící do skupiny monoklonálních gamapatií. Jedná se o vzácné onemocnění, incidence představuje přibližně 5-12 nemocných na milion obyvatel/rok. U části nemocných (10-20%) bývá onemocnění asociováno s mnohočetným myelomem nebo Waldenströmovou makroglobulinémií. AL je charakterizovaná extracelulární depozicí amyloidových mas tvořených fragmenty nebo kompletními molekulami monoklonálních lehkých řetězců imunoglobulinů produkovaných klonálními plazmocytami. Imbibice tkání amyloidem vede k úbytku buněčných elementů, tkáňové dezorganizaci a následně poruše funkce postižených orgánů – nejčastěji ledvin, srdce, jater a periferního nervového systému. Detailní typizace amyloidových mas, identifikace plazmocytárního klonu, posouzení funkce postižených orgánů a stanovení monoklonálního imunoglobulinu patří mezi stěžejní aspekty v diagnostice nemocných. Senilní amyloidóza (wtTTR) je systémová amyloidóza způsobená depozicí molekul nativního transthyretinu (TTR, prealbumin) manifestující se převážně srdečním postižením charakteru restriktivní kardiomyopatie s klinickým obrazem chronického srdečního selhání. Diagnostika a diferenciální diagnostika spočívá v důsledné typizaci typu amyloidu v biotickém materiálu, vyloučení AL typu amyloidózy, případně i hereditárních forem amyloidóz. Léčba je symptomatická, specifická terapie je zatím využívána v rámci klinických studií. AA amyloidóza představuje získanou formu amyloidózy v důsledku depozice molekul sérového amyloidu A (SAA), přičemž nadprodukce tohoto proteinu je vázána na získané chronické (revmat. artritida, endokarditida) či hereditární zánětlivé stavy (FMF, TRAPS syndrom). Léčba spočívá v důsledné kontrole zánětlivého stavu. Hereditární amyloidózy spojené s depozicí mutovaného transthyretinu (mTTR) či fibrinogenu (AFib) představují vzácné typy amyloidóz s nutností specifického diagnostického a léčebného přístupu. S podporou grantu IGA ČR NT 12451/5, NT 14400.

2787.

Rodinný výskyt mnohočetného myelomu, náhoda nebo genetická dispozice?

Bačovský J., Minařík J., Píka T., Ščudla V., Divoká M., Jarošová M. (Hemato-onkologická klinika, Olomouc)

Cíl: Incidence rodinného myelomu je velmi vzácná. Existují přímé i nepřímé důkazy o vrozených predispozicích vedoucích ke vzniku MGUS a MM. Při vzniku a manifestaci familiárního MM se mohou uplatňovat faktory zevního prostředí, vrozené znaky metabolismu a reparačních procesů, změny na úrovni genomu, genetická dispozice. U studovaných sourozenců s MM jsme zkoumali, co mají společného, zda se mohly uplatnit rizikové faktory zevního prostředí, zda mohou hrát roli změny vrozené. Analyzovali jsme změny cytogenetické a shromáždili materiál z kostní dřeni a periferní krve pro SNPs array sekvenování lokusů 3p22, 7p15.3, 2p23.3. Pacienti a metody: V uplynulých letech

jsme diagnostikovali a léčili tři rodiny s výskytem MM u sourozenců. Byly to u 1.rodiny 2 sestry , u 2. rodiny 2 bratři a jejich 1 sestřence a u 3.rodiny 1 sestra a 1 bratr. Věk při stanovení diagnózy MM byl: u dvou sester 57 let,u dvou bratrů : 70 a 67 let ,u sestry a bratra : 55 a 57 let . Shromáždili jsme vzorky DNA a RNA z kostní dřeně nemocných s MM a z periferní krve jejich potomků pro genetické analýzy. Perspektivní se jeví vyšetření molekulárně biologické: SNPs array sekvenování lokusů 3p22, 7p15.3, 2p23.3. Významnou roli hrají rovněž vrozené znaky metabolismu jako je autosomálně dědičná hyperphosphorylace proteinů ,Paratag-7 (paraprotein target 7), protein , ktrerý se váže na paraproteiny detekované u MGUS, MM a WM. Výsledky: U tří rodin s výskytem MM u několika členů bylo provedeno cytogenetické vyšetření a byly zaznamenány abnormální karyotypy.U žádného nemocného s MM nebylo zjištěno rizikové prostředí, nebo styk s toxickými látkami s výjimkou kouření. U vyšetřených potomků nemocných nebyl prokázán paraprotein v séru, rovněž vyšetření volných lehkých řetězců bylo normální. Shromáždili jsme vzorky DNA a RNA z kostní dřeně nemocných s MM a z periferní krve jejich potomků pro genetické analýzy Závěr: Incidence rodinného myelomu je velmi vzácná. Zachytili jsme tři rodiny s výskytem MM u několika členů. Studium rodinného MM umožňuje hledat nové zatím neznámé patogenetické mechanismy a stanovit cíle k jejich terapeutickému ovlivnění. Můžeme nabídnout možnost vyšetření rodinných příslušníků rodin s výskytem MM k vyloučení monoklonální gamapatie a zároveň získat jejich vzorky DNA k dalšímu podrobnějšímu vyšetření . Za podpory grantu IGA –UP-LF 2015-001

MDS

2784.

Význam biopsie kostnej drene u pacientov s MDS

Vašeková P., Plank L. (Ústav patologickej anatómie, Jesseniova lekárska fakulta, Martin – SK)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2810.

Validované postupy pro diagnostiku myelodysplastického syndromu průtokovou cytometrií

Marinov I. (UHKT, Praha)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2685.

Klonální heterogenita u nemocných s myelodysplastickými syndromy (MDS) a komplexními karyotypy.

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

V době stanovení diagnózy MDS můžeme u některých pacientů pozorovat současně různé cytogenetické subklony odvozené od jednoho základního klonu. Heterogenní klony mohou být detekovány u všech subtypů MDS, nejvyšší výskyt je však u nemocných s komplexními karyotypy. Prognostický význam cytogenetických subklonů u neléčených pacientů s MDS není známý a ani mechanismy vzniku komplexních aberací u MDS nejsou dostatečně prostudované. Cílem bylo sledovat klonální heterogenitu u nově diagnostikovaných pacientů s MDS a komplexními karyotypy, studovat mechanismy vzniku komplexních aberací a posoudit frekvenci a klinický význam příbuzných a nepříbuzných cytogenetických klonů. Provedli jsme celogenomovou analýzu buněk kostní dřeně u 182 nemocných s komplexními karyotypy (≥ 3 aberace) nalezenými při diagnóze MDS (93 mužů, 89 žen; medián věku 67 let). Komplexní aberace jsme studovali metodou FISH (Abbott) a mFISH/mBAND (MetaSystems). Nebalancované genomové změny jsme určili pomocí čipů CytoChip Cancer SNP 180K (BlueGnome) a/nebo Human CytoSNP-12 arrays (Illumina). Klonální heterogenitu jsme pozorovali u 143/182 pacientů (78,6%). U většiny z nich (97,3%) jsme detekovali příbuzné subklony obsahující delecí 5q a další aberace. Pět nemocných (2,7%) mělo kombinaci příbuzných klonů

s del(5q) a s dalšími změnami a nepříbuzných klonů bez del(5q). U 65,3% pacientů jsme pozorovali fragmentované a chaoticky přestavěné chromosomy (chromothripsis), a to buď v základním klonu nebo v jednom či více subklonech. Nemocní s chromothripsis měli statisticky horší celkové přežití (medián 3 měsíce; $p=0,042$). U 44% pacientů byl komplexní karyotyp spojen se ztrátou heterozygosity (LOH) 17p (gen TP53). Pozorovali jsme vyšší frekvenci LOH17p u nemocných s chromothripsis ($p=0,05$). Rozdíl ve frekvenci LOH17p ve skupině s a bez klonální heterogenity jsme v tomto souboru nepozorovali ($p=0,782$). Výsledky studie potvrdily, že klonální heterogenita je častým nálezem u nemocných s MDS a komplexními karyotypy. Na vzniku komplexních aberací se pravděpodobně podílejí dva mechanismy, tj. klonální vývoj a/nebo chromothripsis. Znaky chromothripsis můžeme pozorovat jak v základním klonu tak i v jednotlivých subklonech a je často asociována s vyšší frekvencí LOH17p a špatným OS. Přítomnost geneticky heterogenních subklonů je pravděpodobně jednou z příčin rezistence na léčbu a velmi špatné prognózy nemocných s MDS a komplexními karyotypy. Podpořeno RVO-VFN64165, GAČR P302/12/G157, PRVOUK-P27/LF1/1, MZČR00023736

2708.

Molekulárně cytogenetická analýza přestaveb genu ASXL1 u nemocných s delecí 20q

Březinová J., Šárová I., Lhotská H., Ransdorfová Š., Izáková S., Svobodová K., Marková J., Zemanová Z., Čermák J., Jonášová A., Podskalská L., Michalová K. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, VFN a 1.LF UK, Praha; I. Interní klinika VFN a 1.LF UK v Praze)

Gen ASXL1 je jedním z nejčastěji mutovaných genů u myelodysplastického syndromu (MDS), myeloproliferativních neoplázií (MPN) a akutní myeloidní leukémie (AML). K mutacím může docházet kdekoli, nejčastěji je postihován 12. exon a to formou mutací zkracujících proteinový produkt. Alterace genu ASXL1 jsou spojovány s agresivnějším průběhem onemocnění a špatnou prognózou. V roce 2014 jsme u nemocného s MDS prokázali isodicentrický deletovaný chromosom 20, u něhož došlo v důsledku delecce dlouhých ramen ke vzniku fúzního genu ASXL1/TSHZ2. Cílem této studie bylo pomocí molekulárně cytogenetických metod určit zlomová místa a rozsah delecce genu ASXL1 v kostní dřeni pacientů s delecí 20q [del(20q)]. Ve skupině 26 nemocných (20 x MDS, 2 x MPN, 2 x myelofibróza, 2 x trombocytopenie; 20 mužů, 6 žen, medián věku při diagnóze 69 let) s potvrzenou del(20q) jsme mapovali zlomová místa metodou FISH s využitím sedmi BAC (bacterial artificial chromosome) sond (BlueGnome), pokrývajících oblast 20q11.21 až 20q13.2. Delece 20q byla sámostatnou aberací u 19 nemocných, u dvou nemocných byl potvrzen isodicentrický deletovaný chromosom 20q, další jiné chromosomové aberace jsme potvrdili u pěti pacientů. Proximální zlom del(20q) v genu ASXL1 (lokalizace 30.95-31.03 Mb od telomery krátkých ramen, v pruhu 20q11.21) jsme identifikovali u osmi nemocných a to jako jeden větší a jeden malý signál BAC sondy RP11-358N2 (30.93-31.12 Mb). U dalších osmi (31 %) byl přítomen pouze jeden signál, prokazující ztrátu celé alely genu ASXL1, u jiných deseti pacientů zůstal gen na deletovaném chromosomu 20 zachován. Metodou array CGH (Cytochip Cancer 180K, BlueGnome) jsme identifikovali zlomové místo/delecí genu ASXL1 u 13 nemocných v DNA získané z buněk kostní dřeně. Nejčastější zlomové místo se nacházelo ve/za 4. exonem (čtyři nemocní), exon 12 byl deletovaný u všech vyšetřených se zlomem v genu ASXL1. Ve skupině nemocných s částečně či úplně deletovaným genem ASXL1 zemřelo šest, ve skupině se zachovaným genem dva nemocní a tím se podpořil předpoklad horší prognózy při alteraci tohoto genu. V souboru jsme kombinací molekulárně cytogenetických a molekulárně genetických metod prokázali značnou heterogenitu zlomových míst s častým proximálním zlomem v genu ASXL1. Parciálně či úplně deletovaný byl tento gen u 62 % nemocných. Klinický a prognostický význam přestaveb a ztrát genu ASXL1 pro pacienty s delecí 20q dále vyšetřujeme. Podpořeno granty MZČR 00023736, RVO-VFN64165, GAČR P302/12/G157.

2726.

Vysoká hladina mRNA pro cereblon o plné délce je důležitá pro účinnost lenalidomidu u pacientů s myelodysplastickým syndromem typu del(5q) nebo s del(5q) a zároveň trizomií chromozomu 8 v samostatných buněčných kloncích

Fuchs O., Polák J., Vostrý M., Bokorová R., Kostečka A., Hájková H., Neuvirtová R., Šišková M., Čermák J., Šponerová D., Lauermannová M., Šálek C., Soukupová J., Mikulenková D., Červínek L., Březinová J., Michalová K., Jonášová A. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; 1.interní klinika-klinika hematologie, VFN, 1. lékařská fakulta UK, Praha; Leukemická skupina, FN, Brno; Centrum Onkocytogenetiky, VFN Praha, 1. lékařská fakulta UK, Praha)

Cereblon (CRBN) je receptorem pro substrát v komplexu kulin 4-E3 RING ubikvitin ligázy. CRBN obsahuje v C-koncové části odpovídající části exonu 10 a exonu 11 vazebné místo pro imunomodulační látky (IMiD, /thalidomid, lenalidomid a pomalidomid/). Snížení exprese CRBN je spojeno s rezistencí na lenalidomid a kratším přežitím u pacientů s mnohočetným myelomem. Důležitost exprese CRBN u pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS) a její vliv na terapii lenalidomidem není zatím objasněna. V této práci jsme pokračovali v našem předchozím studiu (výsledky publikovány v Eur J Hematol). Rozšířili jsme počet studovaných pacientů a navíc studovali i několik pacientů MDS o nízkém riziku bez del(5q), označených non-5q- a pacientů MDS s del(5q) a trizomií chromozomu 8, kteří byli na terapii lenalidomidem. Vyhodnotili jsme expresi CRBN v mononukleárních buňkách izolovaných z periferní krve [44 nízkokorizikových pacientů MDS s izolovanou delecí 5q (5q-), 53 non-5q- s normálním karyotypem, 14 pacientů MDS s del(5q) a zároveň trizomií chromozomu 8 v samostatných buněčných kloncích /del(5q)+8/, 11 pacientů MDS s trizomií chromozomu 8 /+8/ a 35 zdravých kontrol] a z kostní dřevě [27 pacientů s 5q-, 25 non-5q-, 10 del(5q)+8, 13 pacientů MDS +8 a 39 zdravých kontrol]. Pacienti s 5q- mají ve srovnání s non-5q- a zdravými kontrolami nejvyšší hladinu CRBN mRNA v mononukleárních buňkách a 90,4% jich odpovídá na terapii lenalidomidem. Naproti tomu nikdo z pěti pacientů non-5q- léčených v rámci studie MDS-005 nereagoval na terapii lenalidomidem a všichni měli nižší hladinu CRBN mRNA odpovídající mediánu u této skupiny. Hladina CRBN mRNA byla stanovena pomocí kvantitativní "best coverage TaqMan PCR assay" za použití celkové cDNA a primerů navržených v exonu 9 a 10 CRBN a sondy na sekvenci v exonu 9. Tento systém umožnil detekci transkriptu CRBN mRNA o plné délce a naopak nestanovil variantu CRBN mRNA postrádající exon 10 (kódující pro vazebné místo lenalidomidu a IMiD obecně) vzniklou alternativním sestříhem CRBN pre-mRNA. Ukázali jsme, že vysoká hladina CRBN mRNA o plné délce v mononukleárních buňkách kostní dřevě i periferní krve nízkokorizikových pacientů MDS s izolovanou delecí 5q a také v del(5q)+8 odpovídá vysoké účinnosti lenalidomidu u těchto pacientů. Navíc jsme zjistili, že pacienti, kteří přestali odpovídat na lenalidomid a progrezovali do RAEB formy MDS a AML vykazovali prudké snížení hladiny CRBN mRNA. Práce byla podpořena grantem NT/13836-4/2012 od IGA, MZ ČR.

2802.

První zkušenosti v České republice s lenalidomidem v terapii anemických nemocných s myelodysplastickým syndromem s delecí dlouhého ramene 5. chromozomu

Jonášová A., Červínek L., Bělohávková P., Čermák J., Rohoň P., Černá O., Hočová I., Kačmářová K., Janoušová E. (1.interní klinika, hematologie 1. LF UK a VFN, Praha; Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; IV. interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové; UHKT, Praha; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; Hematologická klinika, 3. lékařské fakulty UK a FN Královské Vinohrady, Praha; Oddělení klinické hematologie FN Motol, 2. lékařská fakulta UK, Praha; Česká MDS skupina; Institut biostatistiky a analýz Masarykova Univerzita, Brno)

Myelodysplastický syndrom (MDS) je jedno z nejčastějších hematologických onemocnění ve věku nad 60 let. Přes intenzivní výzkum je však terapie této heterogenní krevní choroby velmi komplikovaná. V posledních letech se objevily dva nové terapeutické přístupy a to imunomodulační léčba a demetylační terapie. Zvláště imunomodulační léčba, reprezentovaná preparátem lenalidomidem, znamená velký pokrok v léčbě anemických nemocných specificky s 5q- aberací. Odpověď, především dosažení transfuzní nezávislosti, se pohybuje v původních studiích kolem 60-80%. U nás byla tato terapie zahájena v roce 2008. Presentujeme analýzu nemocných, jejichž data jsou ukládá-

na do lenalidomidové listy Českého MDS registru. Jde o nemocné chronicky transfundované s dg MDS s nižším rizikem a 5q- aberací. Léčeno bylo 34 nemocných z toho 31 žen a 3 muži s mediánem věku 69 (46-80 let). Dvacet sedm (79,4%) nemocných mělo diagnosu 5q- syndromu, 5 RCMD (refrakterní anemie s multilineární dysplasií), 1 refrakterní anemie s excesem blastů (RAEB 1) a 1 myelodysplastický syndrom/myeloproliferativní syndrom (MDS/MPS). V cytogenetickém vyšetření izolovanou delecí 5q mělo 82,4%, kombinaci s další 1 aberací mělo 14,6% a více než jedna další aberace byla přítomna pouze u 1 nemocného (2,9%). Medián doby od diagnózy do zahájení terapie lenalidomidem byl 15 měsíců s rozmezím 1-199. Šestnáct nemocných bylo primárně léčeno erytropoetiny (EPO) a pouze jeden z těchto nemocných měl na EPO přechodně trvající odpověď ve smyslu navýšení hemoglobinu a přechodně transfuzní nezávislosti. Lenalidomid jako terapie první linie byl použit u 47% nemocných. Medián trvání terapie lenalidomidem byl 10 měsíců (rozmezí 1-54). V našem souboru jsme zaznamenali odpověď na terapii reprezentovanou dosažením kompletní transfuzní nezávislosti u 90,4% nemocných. Lenalidomid byl u většiny nemocných velmi dobře tolerován. Na tomto, byť zatím malém souboru prezentujeme vysokou efektivitu tohoto preparátu a základní principy a problematiku terapie lenalidomidem.

2752.

Vliv chelatační léčby deferasiroxem na hematologické zlepšení u MDS

Bělohávková P., Kupsa T., Voglová J., Žák P. (IV. interní hematologická klinika, LF UK a FN, Hradec Králové)

Úvod: Chelatační léčba je již několik let součástí podpůrné léčby pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS) nízkého rizika při známkách sekundárního přetížení železem. V několika studiích byl popsán současně efekt léčby deferasiroxem na hematologické zlepšení parametrů. Nejvýraznější byl tento efekt pozorován na zlepšení parametrů červené řady (6 – 45% případů zlepšení), ale bylo popsáno i zlepšení hodnot leukocytů - neutrofilů a trombocytů. Přesný mechanismus tohoto jevu není přesně znám a pravděpodobně se jedná o komplexní pochody. U deferasiroxu byl popsán přímý vliv na neoplastický klon, deferasirox má dále vliv na snížení oxidativních radikálů ve dřevě a uvolnění zásob železa ze dřevě a rovněž inhibuje transkripční faktor NK- B, který se podílí na celé řadě buněčných pochodů. Soubor: Od června 2008 do září 2013 zahájilo na našem pracovišti chelatační léčbu deferasiroxem 19 pacientů s MDS nízkého rizika, 8 pacientů nadále v léčbě pokračuje. Skupinu tvoří 11 mužů a 8 žen s mediánem věku při zahájení léčby 72 let (rozpětí 57 – 83 let) a mediánem IPSS 0 (rozpětí IPSS 0 -1). Medián počtu transfuzí při zahájení léčby byl 28 TU ery mas (rozpětí 24 – 150 TU) a medián vstupní hodnoty feritinu byl 2370 µg/l (rozpětí 1738 – 4888 µg/l). Výraznější pokles feritinu byl zaznamenán až po 1 roce léčby, kdy medián hodnoty feritinu byl 1537 µg/l (rozpětí 512 – 4 358 µg/l). Toxicita chelatace byla přítomna u 11 pacientů (58%) a nejčastěji se jednalo o mírné zhoršení renálních funkcí (6 případů). Ve 3 případech byla přítomna GIT toxicita a ve 2 případech kožní projevy (svědění, exantem). U žádného pacienta nebyla poléková toxicita důvodem ukončení léčby, avšak měla vliv na dávkování deferasiroxu, respektive nemožnost navýšení dávky deferasiroxu. Závěr: V naší skupině pacientů léčených deferasiroxem jsme u 3 (16%) pacientů pozorovali také hematologické zlepšení, protože došlo ke zdvojnásobení intervalu podávání transfuzí. U žádného pacienta jsme ale nepozorovali zlepšení parametrů leukocytů a trombocytů.

ÚTERÝ 2. ČERVNA 2015

MALIGNÍ LYMFOMY 1

2690.

Léčba relabovaného a refrakterního Hodgkinova lymfomu

Móčíková H. (Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3.Lékařská fakulta UK, Praha)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2751.

Prognostické faktory Hodgkinova lymfomu v éře intenzifikované terapie

Lukášová M., Procházka V., Raida L., Sičová K., Papajík T. (Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc)

Úvod: Terapie Hodgkinova lymfomu, klasické varianty (cHL) je v ČR v současnosti vedena logikou riziku uzpůsobené intenzifikované terapie. Léčba je stratifikována na základě kritérií Německé skupiny pro studium HL (DHSG). Výpovědní hodnota klasických prognostických schémata (IPS) je v této populaci omezena. Cíl: Analýza prognostického přínosu klinických a laboratorních parametrů v populaci nemocných s cHL léčených v éře intenzifikované terapie. Metoda a výsledky: Analyzovali jsme neselektovanou kohortu 322 nemocných s dg. cHL léčených mezi léty 1997-2012 na HOK FNOL v Olomouci. Populaci tvořilo 159 mužů, 163 žen s mediánem věku při dg. 32,3 roku (16,7-74,8 roku). Histologický subtyp byl stanoven u 318 (99 %) nemocných: nodulární sklerosa v 199 (63 %), smíšená buněčnost v 107 (34 %), cHL bohatý na lymfocyty v 8 (2,5 %) a lymfocytární deplece ve 4 případech (1 %). Dle DHSG kritérií bylo 26 (8 %) nemocných identifikováno jako časné, 107 (33 %) jako střední a 189 (59 %) jako pokročilé stádium lymfomu. Chemoterapie byla podána u 320 (99 %) nemocných a to: BEACOPP u 192 (60 %), Stanford-V v 84 (26 %), ABVD v 28 (9 %) a COPP v 16 (5 %) případech. Léčebná odpověď byla hodnotitelná ve 303 (94 %) případech, z toho 270 (89 %) nemocných dosáhlo CR, 25 (8 %) PR, 5 (2 %) SD a tři nemocní na léčbě progredovali. Při mediánu sledování žijících nemocných 92,9 měsíců došlo k progresi / relapsu lymfomu u 76 (23,6 %) a úmrtí u 49 (15,2 %) nemocných. Interval do progresu choroby (PFS) dosáhl v 10-letech 71,0 % (95% CI 0,65-0,77) a celkové přežití (OS) v 10-letech pak 79,9 % (95% CI 0,74-0,86). Univariační analýza kategorizovaných proměnných sdružených v IPS (věk > 45 let, klinické stádium IV, mužské pohlaví, lymfopenie < 0,6 * 10⁹ na l, albumin < 40 g/l, Hb < 105 g/l, leukocytóza > 15 * 10⁹ na l) a v DHSG (FW ≥ 30 resp. ≥ 50 mm/h, bulk, počet uzlinových lokalit ≥ 3) potvrdila pouze klinické stádium IV (HR 2,68; p = 0,002), albumin (HR = 2,49; p = 0,009), lymfopenii (HR 2,96; p = 0,004) a FW (HR 3,22; p = 0,001) jako prediktory OS. Multivariační analýza identifikovala klinické stádium (HR 4,16; p = 0,022) a lymfopenii (HR 7,47; p < 0,001) jako nezávislé prediktory OS. Závěr: Analýza klinických a laboratorních parametrů v populaci nemocných léčených podle kritérií DHSG identifikovala dva nezávislé prediktory celkového přežití. Revalidace konvenčních prognostických faktorů je prvním krokem k individualizované péči o nemocné s cHL. Dedikace: IGA-LF UP-2015-001

2768.

Imunohistochemická expresia CD30 antigénu v difúznom veľkobunkovom B-lymfóme a jeho variantoch: analýza 205 CD30 pozitívnych prípadov

Plank L., Szépe P., Balhárek T., Mičák J., Farkašová A. (Konzultačné centrum bioprotektivej diagnostiky malígnych lymfómov v SR - Ústav patologickéj anatómie, JLF UK a UN, Martin – SK)

Úvod: Dôkaz pozitivity CD30 („CD30⁺“) je diagnostickou črtou klasického Hodgkinovho lymfómu (cHL) a v poslednom období sa stal aj nádejným cieľom anti-CD30 liečby u pacientov s refraktérnou a relabujúcou chorobou typu cHL. Možno očakávať, že dôkaz CD30 antigénu sa stane prediktívne dôležitým aj v T- a B-lymfómoch. Incidencia CD30⁺ v difúznom veľkobunkovom B-lymfóme (DLBCL) dnes nie je presne známa. Materiál a metodika: Z registra konzultačného centra sme vybrali 205 konzekutívnych prípadov DLBCL a jeho variantov, v ktorých v rámci panelu fenotypovej diagnostikovej analýzy bola verifikovaná pozitívita CD30⁺. Prípady boli rozdelené do typov a variantov podľa klasifikácie SZO a podľa expresie CD30⁺ do skupiny A) s pozitivitou menej ako 5%, B) 5-50% a C) viac ako 50% nádorových buniek. Výsledky: CD30⁺ bola najčastejšie bola zistená v anaplastickom

variante DLBCL /36% všetkých/, viac v non-GCB podtype /81% z nich/, pričom vo viac ako 2/3 anaplastického variantu bola pozitivita antigénu CD30 vo viac ako 50% buniek. Po 24% všetkých CD30+ prípadov bolo zo spektra PMBL /s približne rovnakou frekvenciou pozitivitu v skupinách A)-C)/ a zo spektra DLBCL, centro-, imunoblastový a neklasifikovateľný variant, pričom aj tu bola zistená približne rovnaká frekvencia CD30+ v skupinách A)-C) a to aj vnútri fenotypov GCB verzus non-GCB. V zriedkavých ML „šedej zóny medzi CHL a DLBCL“ prevládala CD30+ vo viac ako 50% nádorových buniek. Okrem toho ojedinelé DLBCL prípady s najvyšším stupňom CD30+ vykázali fenotyp CD20-, resp. CD20+/CD5+. V prípadoch s opakovanou biopsiou sme len v 1 prípade pozorovali stratu CD30 pozitivitu v biopsii z recidívy, inak bola konštantná. V prípadoch koincidencie DLBCL s FLG3a typu bola CD30+ prítomná len v bunkách DLBCL. Diskusia a závery: Implementácia dôkazu CD30 do „rutinného“ panelu bioptickej analýzy DLBCL vedie k zisteniu pomerne vysokej incidencie profilu CD30+, a to nielen v anaplastickom /síce najčastejšie/, ale aj v iných variantoch /menej často/ DLBCL. Štatisticky najčastejšia je expresia CD30+ v anaplastickom variante DLBCL s non-GCB fenotypom, kde býva prítomná obyčajne vo viac ako 50% buniek nádoru. Expresia CD30+ v raz pozitívnom prípade DLBCL sa zdá byť „stabilná“, len zriedkavo sa v priebehu ochorenia „stráca“. Zistené výsledky môžu v budúcnosti prispieť k rozšíreniu terapeutických modalít refraktérnych DLBCL. Podporené grantom Centra excelencie CEPV II (ITMS kód 26220120036), ktorý je spolufinancovaný z prostriedkov EÚ.

2796.

Automatická analýza obrazu ukazuje vysokou variabilitu v denzite CD30+ HRS buniek u nodulárnej sklerózy klasického Hodgkinova lymfomu

Prouzová Z., Procházka V., Čapková Z., Dýšková T., Kriegová E., Cenklová V. (Ústav klinické a molekulárnej patológie, LF UP a FN, Olomouc; Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc; Výzkumné centrum Olgen, Ústav imunologie, LF UP a FN, Olomouc; Ústav lékařské biofyziky, LF UP, Olomouc)

Klasický Hodgkinův lymfom (CHL) je histologicky charakterizovaný predomínujúcim benigným pozadím tvoreným elementy mikroprostredia, na ktorom jsou nepravidelne roztroušeny veľké maligní buňky HRS morfológie (Hodgkinovy, Reed-Sternbergovy buňky. Jejich množstiev činí 0,1 – 10 % celej buněčnej populácie. Vzťah medzi HRS buňkami a buňkami mikroprostredia má bezprostrednú vliv na existenciu a proliferáciu nádoru. Studiemi bylo prokázáno, že vysoká hustota LAM (lymphoma-associated macrophages) v době diagnózy představuje negativní prognostický faktor. Denzita HRS buniek a vzťah medzi buňkami HRS a LAM dosud nebyly studovány. Analyzovány byly vzorky z doby diagnózy od 14 pacientů s CHL, subtypem nodulární sklerózy (CHL-NS). U šesti pacientů došlo během sledování k relapsu CHL, nebo byli refrakterní na úvodní terapii (RR kohorta), 8 pacientů bylo vybráno jako „relapse-free“ kontroly (RF). Hodnoceny byly řezy se základním barvením – hematoxylin-eozin (HE), dále skla s imunohistochemickým barvením pomocí CD30 (HRS), CD68 (LAM). Tyto byly naskenovány přístrojem TissueFAXS (TissueGnostics, Vienna, Austria) a získaná data dále zpracována TissueQuest softwarem. Po naskenování vzorku byla manuálně odlišena (gatována) nádorová tkáň (TTS – total tumor sample). Fibrózní, nekrotická či znehodnocená tkáň nebyla k další analýze použita. TTS ve vzorcích zaujímala 17,7±11,9 mm² s buněčnou populací čítající 457257±397599 elementů, přičemž TTS u RR kohorty (19,2 mm²) a RF kohorty (17,9 mm²) se nelišily (p=0,86). Celková buněčná denzita u RF případů byl vyšší než u RR (27679 vs 20861 buněk na mm², p=0,09). Denzita CD30+ HRS byla 2,4x vyšší u pacientů RF než RR (429 vs 180 buněk na mm², p=0,055). Ačkoliv byla denzita CD68 pozitivních makrofágů u kohorty RF a RR srovnatelná (2372 a 2716 buněk na mm², p=0,66), poměr CD30+/CD68+ buněk byl vyšší u RF skupiny (0,31) než u RR pacientů (0,07, p=0,044). Množství LAM na jednu HRS buňku bylo 33,1 u RR skupiny, zatímco u RF skupiny jen 12,1 (p=0,1). Distribuce buněk u CHL je velmi variabilní a automatizovaná analýza velké plochy vzorku přináší přesnější hodnocení množství a hustoty jednotlivých buněk. V naší práci prokazujeme významné rozdíly v celkové buněčné denzite, hustotě CD30+ HRS buněk a poměru HRS:LAM v diagnostických biopsiích. Vyšší poměr HRS:LAM u RR CHL poukazuje na možnost rozdílných interakcí mezi HRS a buňkami v nádorovém mikroprostredia, které mohou mít prognostický význam. Podpořeno: IGA-LF-2015-001

2799.

Užití PET-CT po 2 cyklech indukce k individualizaci léčby mladších pacientů s vysoce rizikovým DLBCL: studie PET-RIMCEB české Kooperativní lymfomové skupiny

Pytlík R., Belada D., Šálek D., Mociková H., Kubáčková K., Papajík T., Matuška M., Janíková A., Sýkorová A., Kubinyi J., Kubíková I., Bělohávek O., Trnková M., Trněný M. (1. interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice, Praha; IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice, Hradec Králové; Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno Bohunice; Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha; Onkologická klinika, 2. LF UK a Fakultní nemocnice Motol, Praha; Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Olomouc; Klinika hematoonkologie, Fakultní nemocnice, Ostrava-Poruba; Ústav nukleární medicíny, Všeobecná fakultní nemocnice, Praha; Oddělení nukleární medicíny a PET centrum, Nemocnice Na Homolce, Praha)

Úvod. PET-CT po dvou až čtyřech cyklech léčby zlepšuje odhad prognózy pacientů s difúzním velkobuněčným B-lymfomem (DLBCL). Ve studii PET-RIMCEB jsme studovali, zda výsledek tohoto vyšetření může být použit k individualizaci léčby mladších rizikových pacientů. Metodika. Pacienti s DLBCL ve věku 18-60 let, aaiPI 2-3 byli léčeni dvěma cykly R-MegaCHOP dle dříve publikovaného schématu. Po dvou cyklech bylo provedeno PET-CT (PET2). PET pozitivita byla definována jako reziduální akumulace radiofarmaka vyšší než akumulace jater. Všichni pacienti dostali 3. cyklus R-MegaCHOP. PET2 pozitivní pacienti byli dále léčeni záchrannou léčbou (R-ESHAP, R-DHAP či R-ICE) a konzolidováni režimem BEAM + ASCT. PET2 negativní pacienti byli randomizováni do ramene A (3x R-CHOP) nebo ramene B (3x R-CHOP + BEAM + ASCT). Pacienti s úvodně masívním postižením (tumor >10 cm) či reziduální PET pozitivitou na konci léčby byli dále konzolidováni radioterapií. Nábor probíhal od května 2010 do srpna 2012 a byl předčasně ukončen pro malé množství pacientů. Primární enpoint bylo přežití bez progresu (PFS) ve 2 letech. Výsledky. Zahrnuto bylo 46 pacientů, 21 mužů (46%) a 25 žen, věkový medián byl 46,5 roku (20-60 let). 44 pacientů mělo PET-CT po 2 cyklech, z toho 19 (43%) bylo PET2 negativních. Z nich bylo 11 randomizováno do ramene A (R-CHOP) a 8 do ramene B (R-CHOP + ASCT). Celkem 7 pacientů zařazených do ramene B bylo transplantováno, jeden zemřel na toxicitu před transplantací. Zbýlých 25 (57%) pacientů bylo PET2 pozitivních a byli léčeni záchrannou léčbou. Dva z těchto pacientů zemřeli na toxicitu. PFS pro všechny zařazené pacienty bylo 67% a celkové přežití (OS) 80%. Celkem u 10 pacientů došlo k primární progresi či relapsu: 6/11 progresí bylo v rameni A, 1/8 v rameni B a 3/25 u PET2 pozitivních pacientů. PFS i OS bylo stejné pro PET2 pozitivní i PET2 negativní pacienty (p = 0,83 a p = 0,13). PET2 negativní pacienti zařazení do ramene B s transplantací měli nesignifikantně lepší 2-letý PFS než PET2 negativní pacienti v rameni A bez transplantace (87,5% v. 45%, p = 0,096) a významně lepší 2-leté přežití bez relapsu lymfomu (100% v. 45%, p = 0,02), bez vlivu na celkové přežití (p = 0,17). Závěr. Autologní transplantace v první kompletní remisi zlepšuje přežití bez relapsu lymfomu u PET2 negativních pacientů, bez signifikantního vlivu na PFS a OS. Výsledky jsou ovlivněny malým počtem zařazených pacientů. EudraCT 2009-016136-12 Podpora grantů IGA MZ ČR NT 12193/5, 13072/4 a PRVOUK-27/LF1.

TRANSPLANTACE 1

2815.

Postavení alogenní TKB v léčbě myelodysplastického syndromu

Žák P., Zavřelová A., Bělohávková P., Radocha J., Víšek B. (IV. interní hematologická klinika, FN a LF, Hradec Králové)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2706.

Transplantace kmenových buněk krvetvorby u dětí pro nepříznivé formy myelodysplastického syndromu v ČR – dlouhodobé výsledky

Keslová P., Sedláček P., Suková M., Formánková R., Říha P., Smešková P., Šrámková L., Janečková D., Slámová L., Mejstříková E., Michalová K., Zemanová Z., Starý J. (Klinika dětské hematologie a onkologie, 2.LF UK a FN v Motole, Praha; Centrum nádorové cytogenetiky, ÚLBLD, VFN, Praha)

Myelodysplastický syndrom (MDS) je heterogenní, v dětském věku vzácné onemocnění krvetvorby, představující pouze 4% hematologických malignit. U nepříznivých forem MDS (pokročilý MDS, MDS s nepříznivou cytogenetikou či sekundární MDS) je kurativní metodou léčby transplantace kmenových buněk krvetvorby. Česká republika je zapojena do mezinárodní skupiny EWOG MDS. V rámci sledování počínaje studií EWOG MDS 98 v průběhu let 1999 - 2014 bylo v ČR provedeno 36 transplantací u 29 pacientů s dg. primární pokročilý MDS nebo RCC s nepříznivou cytogenetikou (RCC s cytogenetickou změnou n=8, RAEB n=14, RAEBt n=5, MDR-AML n=2). Nejčastějším cytogenetickým nálezem byla monozomie 7. chromozomu u 12 pacientů (41,4%), u 3 pacientů byla zjištěna GATA2 mutace. Pro sekundární MDS bylo transplantováno 9 pacientů. Průměrný věk při transplantaci pro primární MDS byl 10,1 roku (1,0 – 19,9), u sekundárního MDS 12,9 roku (4,8-19,9). U primárního MDS bylo 8 transplantací od shodného sourozeneckého dárce, 19 (65,5%) od nepříbuzného dárce a 2 od haploidentických dárců, u sekundárních MDS bylo 8 dárců nepříbuzných, 1x byl použit haploidentický otec. Průměrná doba od diagnózy do transplantace byla 0,6 roku. Při době sledování v průměru 6,2 roku (0,1 – 15,3) je celkové přežití (OS) skupiny primárních MDS 72,4%, EFS 58,6%. 7 pacientů podstoupilo 2. (1x3.) transplantaci pro relaps (5 pacientů) či nepřijetí štěpu. Přípravný režim při 1. transplantaci byl ve všech případech myeloablativní (24x s busulfanem, 1x s použitím celotělového záření, 4x s treosulfanem). Celková TRM (transplant related mortality) je 24,1%, časná D+100 6,9%. Akutní GVHD gr.IV byla dokumentována u 72,4% pacientů, chronická GVHD u 52% pacientů. U skupiny pacientů se sekundárním MDS je EFS i OS 44,4% při době sledování 0,1 – 9,1 roku. Dětské pacienty s primárně nepříznivým typem MDS mají vysokou šanci na vyléčení transplantací kmenových buněk krvetvorby, relaps onemocnění po transplantaci může být léčen retransplantací s nadějí na úspěch (v našem souboru žijí 4/5 pacientů). Dokumentujeme vyšší výskyt akutní i chronické GVHD. Pacienti se sekundárním myelodysplastickým syndromem zejména po solidních nádorech mají výrazně horší prognózu. Vzhledem k malému počtu dětských pacientů je mezinárodní spolupráce a zapojení do studie EWOG MDS důležitá s cílem dále zlepšovat výsledky těchto pacientů. Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN MOTOL)

2725.

Cyklofosamid následovaný busulfanem jako přípravný myeloablativní režim před alogenní transplantací krvetvorných buněk u 20 pacientů s akutní myeloidní leukémií: toxicita a efektivita

Krejčí M., Hadravová M., Ráčil Z., Semerád L., Weinbergerová B., Tomiška M., Mayer J. (Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno)

Úvod: Busulfan následovaný cyklofosamidem (BU/CY) je efektivní myeloablativní přípravný režim před alogenní transplantací krvetvorných buněk (SCT). Limitací toho režimu však zůstává hematologická i nehematologická toxicita s možným rozvojem venookluzivní nemoci (VOD), což může vést k závažným komplikacím v časném potransplantačním průběhu. Podle některých zahraničních autorů (Cantoni et al, BMT,2011:344-348; Rezvani et al., BBMT,2013;1033-1039) obrácené pořadí cytostatik, tedy podání cyklofosamidů následované busulfanem (CY/BU) může vést ke snížení jaterní toxicity a lepšími léčebnými výsledky. Následně jsou prezentovány naše zkušenosti s režimem CY/BU ve skupině 20 nemocných s akutní myeloidní leukémií (AML). Metody: Bylo analyzováno 20 pacientů (pac.) s AML, jako přípravný režim byl použit CY/BU, cyklofosamid v dávce 60mg/kg/den intravenózně po 2 dny a následně perorální busulfan se vstupní dávkou 4 mg/kg/den po dobu 4 dnů, bylo prováděno monitorování hladin busulfanu s cílem dosažení ustálené koncentrace v rozmezí 800-900 ng/ml. Medián věku pac. byl 31 let, typy dárců a použité štěpy byly následující: HLA identický sourozenec, n=5; nepříbuzenský dárce, n=15; periferní krvetvorné buňky, n=20. Výsledky: Nejčastější nehematologické toxicity dle CTC kritérií byly infekce stupně III/IV u všech 20 pac. a gastrointestinální toxicita (stupeň III u 11 z 20 pac.). Nebyl pozorován žádný případ výskytu VOD, byla přítomna pouze mírná hepatotoxicita (st. I-II) u 30% pac. Medián doby přijetí štěpu (neutrofilie nad 0,5x10E9/l) byl 17 dní, všichni pac. dosáhli přijetí. Kompletní remise bylo dosaženo u 18 z 20 pac. (90%), progresse AML byla u 2 nemocných (10%). Kumulativní mortalita bez souvislosti s relapsem (NRM) po 100 dnech, 1 roce a 2 letech od SCT byla 0%, 10% a 15%. Při mediánu sledování 27 měsíců od provedení SCT žije 70% nemocných (14/20), z toho je 13 v remisi, 1 s relapsem AML: Celkem 6 pac. zemřelo (3 úmrtí na NRM, 3 úmrtí na progresi/relaps AML). Medián doby do progresse

(PFS) byl 25,9 měsíce; PFS v 1 roce a ve 3 letech od SCT je 64% a 44%. Medián celkového přežití (OS) nebyl dosažen, OS v 1 roce a ve 3 letech od SCT je 79% a 55%. Závěr: Přípravný režim CY/BU má akceptovatelnou nehematologickou toxicitu, v našem souboru nemocných nebyl pozorován výskyt VOD, mortalita bez souvislosti s relapsem ke dni +100 byla 0%. Efektivita režimu je vysoká, bylo dosaženo 90% kompletních remisí, ve 3 letech od provedení alogenní transplantace je celkové přežití 55%.

2712.

Reduced-intensity transplantation as a part of standard treatment strategy in patients aged 60 to 70 years with acute myeloid leukemia – single centre experience.

Karas M., Steinerová K., Lysák D., Vokurka S., Hrabětová M., Jungová A., Jindra P. (Hematologicko-onkologické odd., FN, Plzeň)

Background: outcome of patients (pts) over 60 years of age with AML treated only with intensive chemotherapy is poor. To improve treatment results reduced-intensity transplantation (RIT) was established as a part of treatment strategy for pts aged 60 to 70 years with AML in our centre. With the aim to evaluate transplant feasibility and the role of RIT in the treatment of pts aged 60 to 70 years with AML we analysed outcome of such pts in our centre from 2003. Patients and methods: from 1/2003 to 11/2014 AML was diagnosed in 188 pts aged 60 to 70 years. 120 pts were intensively treated and 61 pts with median of age 63 years (range, 60-68 years) with AML in 1st CR (35 pts), in 2nd CR (5pts), with resistant AML (9 pts) and with AML beyond CR (12 pts) underwent RIT (30% HLA identical related, 41% HLA matched unrelated, 26% HLA mismatched unrelated, 3% haploidentical related). Source of stem cells was in 85% peripheral blood and in 15% bone marrow. The conditioning regimen was fludarabine and melphalan, (14 pts with ATG). CsA and MTX were used as GVHD prophylaxis except haploidentical RIT where posttransplant CPA and combination of CsA and MMF was used. Results: the main reasons of impossibility to implement RIT in treatment of older pts with AML were death during remission induction treatment (39%), resistant AML (24%), non-availability of donor (16%), severe comorbidities (12%) and refusal of RIT (9%). However 51% of intensively treated pts eventually underwent RIT. All pts engrafted and achieved complete remission (CR). 37 pts (60%) developed aGVHD and among 50 evaluable pts 22 (44%) of them developed chGVHD. With median follow-up 46 months (range, 4-123 months) 27 pts (44%) are alive (26 pts in CR). 14 pts (23%) relapsed and 13 of them died. 21 pts (34%) died due to NRM, 2 (3%) of them till day 100 after RIT and 11 (18%) of them till day 365 after RIT. The estimated probabilities of 3-years EFS and OS are 44% and 47%. 3-years OS for all intensively treated elderly pts was 38%. Conclusion: our data show that half of intensively treated pts aged 60 to 70 years with AML were able to undergo RIT and that RIT even in case of unrelated or HLA mismatched donor is associated with acceptable NRM and encouraging disease control of unfavourable AML. The relatively high percentage of transplanted pts undoubtedly influenced the overall results of the group of intensively treated elderly patients with AML with a median survival of 15 months and estimated 3-year OS of 38%.

2709.

Outcome of karyotypic normal FLT3-ITD mutated AML patients treated intentionally with upfront alloHCT - single center experience

Jindra P., Karas M., Lysák D., Vokurka S., Jungová A., Steinerová K., Mohammadová L., Hrabětová M. (HOO, FN, Plzeň)

Patients with karyotypic normal (CN) FLT3-ITD mutated AML have dismal prognosis and the only curative option seems to be alloHCT. However, the timing of alloHCT is still matter of debate and some advocates HCT only beyond 1st CR. The consistent policy since 2003 in our centre is to refer all FLT3-ITD+ AML pts to upfront alloHCT in CR1 (either related or unrelated). PATIENTS: With the aim to evaluate the outcomes of this strategy we have retrospectively analysed 50 consecutive adults with FLT3-ITD+ CN-AML allografted in our centre from 2003-2014 either with matched sibling (MSD, n=17) or unrelated donors (UD, n=33). Conditioning regimen was either RIC (Flu-MEL, n=36) or myeloablative (BU-Cy, n=14). The median age of cohort was 53 years (23-68). The original aim of our policy was to perform HCT in CR1 (n=39), however in some patients due to various reasons (donor availability, disease resistance or patient preference), HCT was performed in more advanced

stage (n=11, 2xCR2, 2xPIF, 7xREL). Median interval from dg. to HCT was 5 months. RESULTS: With median follow up of 46 months (range 5-129) altogether 24 pts (48%) has died mainly of relapse (n=15, 63%). The probabilities of OS and LFS at 3 years were 50% and 48%. Cumulative incidences of relapse (RI) and TRM at 3 years were 32% and 16%, respectively. All patients transplanted outside CR1 has died mainly of relapse (8/11), the median survival for transplanted in CR was not reached whereas for transplanted beyond CR1 was 4 months. The analysis has revealed that HCT at CR1 was the main factor significantly correlating with better OS (RR 0.3, p=0.0253), LFS (RR 0.359, p= 0.001) and lower RI (RR 0.251, p= 0.0001). The type of donor (related versus UD) as well as type of conditioning has no influence on OS and LFS, higher TRM associated with UD and BuCy was offset by lower relapse incidence. The presence of cGVHD was associated with improved OS and LFS (RR 0.2, p=0.0172 and RR 0.3, p=0.0253) due to the lower RI. CONCLUSION: Despite the limitations of a retrospective single center based study, our data suggests alloHCT is a valuable therapeutic option for FLT3-ITD mutated CN-AML patients and is able to provide durable remission. The benefit is most pronounced in patients allografted in CR1. Until prospective studies are completed, our study strongly supports to prioritize the allografting in CR1 regardless of donor type in this subset of AML patients.

2713.

Pre-transplant quantitative monitoring of NPM1 mutations significantly predicts outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in normal karyotype AML in complete remission

Karas M., Steinerová K., Lysák D., Vokurka S., Hrabětová M., Jindra P. (Hematologicko-onkologické oddělení FN, Plzeň)

Background: the level of minimal residual disease (MRD) affects prognosis of AML patients (pts) treated with intensive chemotherapy alone. But impact of MRD in the setting of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT) especially in pts with normal karyotype AML (NK-AML) in complete remission (CR) is less clear. With the aim to evaluate the potential role of pre-transplant MRD we studied impact of pre-transplant MRD level on outcome of alloHSCT in 60 pts with NK-AML harboring NPM1 mutation in CR. MRD level was determined using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) for detection of NPM1 mutation. Patients and methods: from 2/2005 to 9/2014 60 consecutive pts with median of age 54 years (range, 30-66 years) with NK-AML harboring NPM1 mutations (53% FLT3/ITD positivity) in 1st CR (45 pts) and 2nd CR (15pts) underwent myeloablative (16 pts) or reduced-intensity (44 pts) alloHSCT (27% HLA identical related, 50% HLA matched unrelated, 23% HLA mismatched unrelated). Source of stem cells was in 80% peripheral blood and in 20% bone marrow. MRD level was determined using qPCR for detection of NPM1 mutations before start of conditioning regimen from bone marrow. Pre-transplant prognostic factors (age, type of donor, donor recipient sex combination, CMV status, type of conditioning regimen, source of stem cells, number of CR, FLT3/ITD status, MRD level) were included in the univariate and multivariate statistical analysis. Results: all pts engrafted with ongoing CR after alloHSCT. 36 pts (60%) developed aGVHD and 24 pts (40%) developed chGVHD. With median follow-up 52 months (range, 4-101 months) 35 pts (58%) are alive. 16 pts (27%) relapsed and 13 of them died. 12 pts (20%) died due to NRM. The estimated probabilities of 3-years EFS and OS are 54% and 59%. Statistical analysis showed that only age over 63 years and MRD level affected alloHSCT outcome in multivariate analysis. Pre-transplant MRD level 10 NPM1mut/10000 ABL copies had the strongest statistical significance. The estimated probabilities of 3-years relapse incidence, EFS and OS were for pts with low MRD level (≤ 10 NPM1mut copies) 6%, 72% and 75% and for pts with high MRD level (> 10 NPM1mut copies) 31%, 35% and 40%. Conclusion: our data show that pre-transplant quantitative assessment of NPM1 mutation in pts with NK-AML harboring NPM1 mutation in CR provides important prognostic information, which as an independent prognostic factor predicts transplant results.

MALIGNÍ LYMFOMY 2

2674.

State of the art léčby lymfomu plášťové zóny

Procházka V. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2753.

Současné možnosti transplantační léčby u lymfomu plášťové zóny

Válková V. (Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2750.

Kompletní metabolická odpověď po terapii jako nezávislý prediktor prognózy u pacientů s MCL

Obr A., Procházka V., Henzlová L., Buriánková E., Papajík T., Kapitáňová Z. (Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc; Klinika nukleární medicíny, LF UP a FN, Olomouc)

Introduction: Data analyzing prognostic value of the metabolic response after therapy using positron emission tomography (fPET) in MCL patients are controversial. A role of total metabolic tumor volume measured at time of diagnosis (TMTVO) has not been evaluated yet. Methods: We analyzed 46 consecutive MCL patients (pts.) treated in a single center from 4/2006 to 4/2014. The median age at diagnosis was 65.4 (40.9-81.7) years; male-to-female ratio 2.1:1. Ann Arbor stages I through IV were observed in 2, 4, 3 and 37 pts., respectively. MIPI scores: low 2 (4%), intermediate 18 (39%) and high in 26 pts. (57%), respectively. 27 pts. (59%) were treated with R-CHOP-21 regimen, 18 pts. (39%) received an intensive sequential protocol (MTX, AraC containing). 5 pts. (11%) were treated with R-AraC/R-CHOP-21 regimen, 2 (4%) with FCR therapy. 16 pts. (35%) were consolidated with high-dose therapy and ASCT. PET-CT were done before chemotherapy and after treatment completion (fPET). In 1 patient was not fPET assessable (death during induction). The PET results were expressed as positive/negative and using a 5-point Deauville scale (D1-5). Results: Treatment responses were as follows: CR, PR and SD in 26 (57%), 14 (30%) and 2 (4%) patients, respectively. 4 pts. (9%) progressed on therapy. After a median follow-up of 33.5 months, 22 pts. (48%) relapsed or progressed and 16 (35%) of them died. 5-y OS reached 68.0% (95% CI 0.53-0.83), 5-y PFS was 38.9% (95% CI 0.22-0.56). Using visual criteria, fPET was negative in 27/45 (60%) cases. With Deauville criteria fPET scores were: D1-2 in 23 (50%), D3 in 8 (17%) and D4-5 in 14 (30%). Low Deauville score (D1-2) was associated with superior 5-y PFS (65.0%) compared to D3-4 (22.2%, p=0.007). Visually negative fPET led to superior 5-y PFS (18.3% vs 64.3%, p=0.005). There was a trend to superior OS in D1-2 and visually negative groups (p=0.10 and p=0.086, respectively). NPV and PPV of fPET for PFS were: 74.1% (vis) and 79.3% (D), 77.8% (vis) and 68.2% (D), respectively. Cox regression analysis identified fPET as predictor for lymphoma relapse/progression independent on the MIPI score (HR 0.49, p=0.018). Mean TMTVO was 810.8±871.7 cm³, we found any difference in PFS in low vs high tumor burden patients (p=0.50). Conclusions: Complete metabolic response after therapy is associated with superior PFS in MCL patients. TMTVO seems not to be important for a prognostic assessment. Supp. by grants LF-2015-001 and IGA-MZ NT/13072

2727.

Cytomorfologie a imunofenotyp 16 případů lymfomu z plášťových buněk

Starostka D., Koláček D., Mikula P. (Oddělení klinické hematologie, Nemocnice s poliklinikou Havířov, p.o., Havířov)

Úvod: Lymfom z plášťových buněk (MCL) je zralá B-lymfoidní neoplázie charakteristická overexpresí cyklinu D1 a většinou spojená s translokací t(11;14). Má klasickou centrocytární morfoloii nebo se vyskytuje v některé ze 4 morfoloických variant (varianta klasická, pleomorfní, malobuněčná, podobná lymfomu z marginální zóny a blastoidní). Většina případů je pan-B+, SmlgM+IgD+, lambda+, CD5+,

FMC7+, CD43+, bcl-2+, cyklin D1+, SOX-11+, CD23-, CD10-, CD200-. Charakteristika souboru: 16 případů nově diagnostikovaného histologicky verifikovaného lymfomu z plášťových buněk (muži 11, ženy 5), vzorky periferní krve, kostní dřevě, lymfatické uzliny a cerebrospinálního likvoru. Metodika vyšetření: Cytologické hodnocení po klasickém panoptickém barvení. Flowcytometrická imunofenotypizace (přístroj FACS Canto II výrobce Becton-Dickinson) po přípravných procedurách v režimu lyse-wash. Multiparametrová analýza povrchové exprese diagnostických markerů (pozitivita a semikvantitativní intenzita exprese - kategorie nízká, střední, vysoká) na nádorových lymfocytech ve zkumavkách: CD45 PerCp-Cy5.5/CD3-FITC/CD4-PE-Cy7/CD8-APC-Cy7/CD16+56-PE/CD19-APC, CD19-PerCp-Cy5.5+kappa-FITC+lambd-PE/CD200-PE-Cy7/CD95-APC, CD19-PerCp-Cy5.5+CD23-PE+FMC7-FITC/CD79b-APC/CD5-PE-Cy7, CD20-APC-Cy7/CD10-PE/CD43-APC/CD35-FITC/CD38-PE-Cy7, CD20-PerCp-Cy5.5+CD22-PE+CD103-FITC/CD25-PE-Cy7/CD11c-APC (protilátky výrobce Becton-Dickinson). Výsledky (výskyt v počtu 16 případů): Cytomorfologie: varianta klasická a pleomorfní 7/16, malobuněčná 6/16, blastoidní 2/16, marginal-zone like 1/16. Imunofenotyp (převažující intenzita exprese jednotlivých znaků): CD19 – střední 15/16, CD20 - vysoká 16/16, CD22 – vysoká a střední 15/16, CD79b – vysoká a střední 15/16, kappa – vysoká a střední 8/8, lambda – vysoká a střední 7/8, CD5 – vysoká a střední 13/16, CD23 – negativní 16/16, FMC – 7 - vysoká a střední 8/15, CD43 – negativní 14/16, CD35 – vysoká a střední 11/16, CD38 – vysoká a střední 14/18, CD10 – negativní 15/16, CD25 – negativní 9/16, CD11c – negativní 16/16, CD103 – negativní 16/16, CD200 – negativní 14/16. Závěr: Použitý imunofenotypizační panel je vhodný pro diagnostiku drtivé většiny případů MCL. Klíčovými diferenciálně diagnostickými prvky při odlišení MCL od jiných B-lymfoproliferací jsou: cytomorfologie, povrchová exprese (pozitivita/negativita) CD5, CD23, CD79b, CD43, CD38, CD10, CD200; intenzita povrchové exprese CD19, CD20, CD22, CD79b, a lehkých řetězců Ig.

2771.

Ibritumomab-tiuxetan v léčbě folikulárního lymfomu: analýza dat Kooperativní lymfomové skupiny

Procházková V., Benešová K., Pytlík R., Papajík T., Janíková A., Belada D., Trněný M. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; I. interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice, Praha; Interní Hemato-onkologická klinika, FN, Brno; IV. interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové)

Úvod: Radioimunitarie (RIT) ibritumomab-tiuxetanem představuje atraktivní koncept cílené terapie namířené proti CD20 antigenu (ibritumomab), který je potencionálně účinným beta-zářením na protilátku konjugovaným izotopem (⁹⁰Y, tiuxetan). Optimální načasování RIT a výběr vhodné populace nemocných s folikulárním lymfomem (FL) je stále diskutován. Cíl: Analýza výsledků terapie ibritumomab-tiuxetanem na neselektované kohortě nemocných s FL z registru Kooperativní lymfomové skupiny ČR. Metoda a výsledky: Byla analyzována data nemocných s dg. FL, kteří byli léčeni pomocí RIT v primoterapii nebo následném relapsu. Soubor tvořilo 64 nemocných (37 žen a 27 mužů) s FL grade I (31), II (20), IIIA (7), u 6 (10 %) nebyl grade určen. Klinické stádium při dg. bylo pokročilé (III/IV dle Ann Arbor) u 60 (94 %) případů. Medián věku při dg. dosáhl 58 let (33-79 let), medián věku při aplikaci RIT 60,8 let. Medián doby od dg. po aplikaci RIT byl 2,9 roku. RIT byl aplikován jako součást 1. linie terapie (R0) u 22 (35 %), v prvním relapsu u 27 (R1, 43 %) a ve druhém, případně dalším relapsu (R2+) u 15 (24 %) nemocných. Léčebná odezva po RIT byla hodnocena u 63 nemocných (99 %): CR dosáhlo 42 (49 %), PR 12 (19 %), SD 3 (5 %) a 6 nemocných na léčbě progredovalo (10 %). Procento celkové léčebné odpovědi (ORR) dosáhlo 68 %. Procento CR bylo vyšší u R0 (78 %) než u v R1 (70 %) a v R2+ (48 %, p=0,15). Medián doby sledování žijících pacientů dosáhl 5,2 roku, doba do 1. progresse/relapsu od diagnózy (PFSdg) dosáhla 3,3 roku (95% CI 2,6-3,9 roku), doba celkového přežití od dg. (OSdg) 9,9 roku (95% CI 7,5-11,1 roku). Po aplikaci RIT zrelabovalo celkem 58 % nemocných. Medián doby do progresse po IT dosáhl 3,1 roku, medián PFS po RIT (PFS-RIT) 2,7 roku. Doba do progresse po RIT byla signifikantně delší u nemocných léčených v primoterapii (R0) než v relapsu (R1, R2+). Medián PFS-RIT u R0 nebyl dosažen, u nemocných v R1 dosáhl 1,3 roku a v R2+ 1,6 roku (p<0,001). Celkové přežití (OS-RIT) bylo delší u nemocných léčených v R0 (medián nedosažen) než v následných relapsech (R1 4,4 roku, R2+ 6,1 roku, p=0,023). Dosažení CR po RIT mělo významný vliv na přežití do progresse (medián PFS-RIT 0,9 vs 3,7 roku, p=0,007), byl zde trend i k delšímu celkovému přežití (medián OS-RIT 4,4 vs 6,5 roku, p=0,09). Závěr: Radioimunitarie je efektivní léčebný postup i u relabovaných nemocných s FL. Z terapie profitují více pacienti v časných fázích nemoci. Dedikace: MZČR IGA NT 12193 a IGA-LF UP-2015-001.

TRANSPLANTACE 2

2716.

Nové poznatky v transplantacní léčbě aplastických anemií

Rusinakova Z. (HOK, FN, Olomouc)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2741.

Alogénná transplatacia krvotvorných buniek v liečbe PNH

Bojtárová E. (Klinika hematologie a transfuziologie, LF UK, SZU a UN, Bratislava – SK)

Edukační sdělení – abstrakt nepožadován

2790.

Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the NF-κB1 Gene Are Associated with Acute Graft-versus-Host Disease (aGvHD) in Allografted Patients

Kuba A., Raida L., Mrázek F., Schneiderová P., Kriegová E., Fürst T., Fürstová J., Faber E., Ambrúsová Z., Papajík T. (Department of Hemato-Oncology, University Hospital and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc; Department of Immunology, University Hospital and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc; Department of Mathematical Analysis and Applications of Mathematics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc)

Introduction SNPs of the key cytokines and chemokines involved in the pathogenesis of aGvHD have become an object of major interest recently. The transcription factor NF-κB has been implicated in the regulation of cellular stress and inflammatory signals. Therefore we focused on candidate NF-κB1 gene SNPs (rs3774937 C/T and rs3774959 A/G) in association with aGvHD. Patients and methods In our single-center study we analyzed 70 patients allografted for the following hematological malignancies: AML (37%), ALL (14%), CLL (13%), MDS (13%), CML (6%), NHL (6%), IMF (3%), CMML (4%), and other hematological disorders (4%) between 2009-2014. The median age of the study group was 51 (21-62) years. Patients were allografted after myeloablative (11%), non-myeloablative (14%) and reduced (intensity/toxicity) conditioning (74%). GvHD prophylaxis was done by solo cyclosporine-A (80%), cyclosporine-A with mycophenolate mofetil (19%) and cyclosporine-A with short-methotrexate (1%). "In vivo" T-depletion with thymoglobuline was used in 64% of recipients. Patients were allografted from HLA identical donors (related 46%) with median age 37 (18-63) years. Genotyping of NF-κB1 SNPs was performed with Sequenom MassARRAY platform using allele-specific MALDI-TOF mass spectrometry assay (Sequenom, San Diego, CA, USA). Primers were designed using the Sequenom SNP Assay Design software version 3.0 for iPLEX reactions. Results Out of 70 patients 46 patients (66%) are still alive, 24 patients (34%) died (12 died of transplant-related complications). The median post-transplant follow-up was 1.6 (0.1-4.5) years. AGvHD developed in 21 patients (30%), grade III-IV in 7 of them (10%). Because of strong linkage disequilibrium observed between both NF-κB1 SNPs, the genotypes of all but five patients may be explained by combination of two major NF-κB1 gene haplotypes (NF-κB1-I: rs3774937*C/rs3774959*A, NF-κB1-II: rs3774937*T/rs3774959*G). Importantly, the univariate analysis showed that patients homozygous for NF-κB1-I haplotype (rs3774937*C/rs3774959*A) are more probable to suffer from aGvHD than NF-κB1-II homozygous patients (p = 0.002). Conclusion This is the first report showing the association of NF-κB1 gene SNPs with aGvHD. Our pilot data suggesting that patients homozygous for NF-κB1-I haplotype may be in higher risk for aGvHD should be independently replicated. Supported by IGA MZCR NT12454 and IGA-LFUP-2015-001

2724.

Využití mesenchymálních stromálních buněk k léčbě steroidně refrakterní reakce štěpu proti hostiteli po alogenní transplantaci hemopoetických kmenových buněk

Lysák D., Holubová M., Karas M., Hrabětová M., Steinerová K., Vokurka S., Jungová A., Pachner M., Jindra P. (Hematologicko-onkologické oddělení, FN, Plzeň)

Reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) představuje závažnou komplikaci u pacientů po alogenní transplantaci hemopoetických kmenových buněk. GVHD špatně reagující na imunosupresivní léčbu má vliv na kvalitu života a ovlivňuje i celkový výsledek transplantační léčby. Jednou z moderních metod léčby resistantních forem GVHD je aplikace mesenchymálních stromálních buněk (MSC) a využití jejich imunomodulačních vlastností. V rámci klinického hodnocení (EudraCT 2013-003626-88) jsme MSC aplikovali 10-ti pacientům s GVHD po alogenní transplantaci. Jednalo se o pacienty s AML/MDS (4), ALL (1), CLL (3), MPN (2), kteří podstoupili příbuzeneckou HLA-kompatibilní (7), haploidentickou (1) nebo nepříbuzeneckou transplantaci s HLA neshodou (2). Doba od transplantace do podání MSC byla 7 měs (2-30), indikace pro zařazení do studie byla kortikoresistentní (6 pac, aGVHD) nebo kortikodependentní GVHD (4 pac, cGVHD). MSC byly aplikovány v jednorázové infuzi v dávce 2,4 (0,9-3,8) x10⁶/kg. Odpověď na léčbu byla hodnocena v den 14, 30, 30 a 100 a dále v 6-ti a 12-ti měsících. MSC byly vyrobeny podle zásad správné výrobní praxe. Cílem klinického hodnocení bylo ověřit bezpečnost a účinnost aplikace MSC v dané indikaci. Závažnost GVHD před aplikací odpovídala klinickému stadiu 3 u akutní resp. 2 (1-3) u chronické GVHD s dávkou kortikoidů 0,72 mg/kg/den (0,14-1,0). V den 14 bylo dosaženo PR u nemocných s aGVHD a SD v případě cGVHD. Dávka kortikoidů byla snížena u 6 pac (na 65% původní hodnoty, 21-84%). V den 100 bylo hodnoceno 7 pacientů: 4 PR, 2 SD a 1 CR, dávka kortikoidů snížena u všech nemocných (na 14%, 12-68%). Dva nemocní časně zemřeli (den 17, 22) na infekční komplikaci. Opětná aktivita GVHD byla zaznamenána u 3 nemocných (den 60, měs 12, 20). Při aplikaci MSC ani v dalším sledování nebyly zaznamenány žádné nežádoucí účinky. MSC nesnižovaly rychlost rekonstituce lymfoidních subpopulací. V den 14 byla u části nemocných detekována vyšší hladina TREG a naopak snížení hladiny prozánětlivých Th17 lymfocytů v porovnání se stavem před podáním MSC. První zkušenosti s léčbou GVHD pomocí MSC potvrdily bezpečnost této imunoterapie a minimálně u části pacientů příznivý efekt se snížením závažnosti GVHD a dávky kortikoidů. Autoři se podělí o své zkušenosti s technologií přípravy MSC a prvními výsledky při sledování klinické i laboratorní imunitní odpovědi. Práce byla podpořena grantem MZ ČR-RVO (Fakultní nemocnice Plzeň-FNPL, 00669806) a grantem Nadace pro transplantaci kostní dřeně.

2801.

Vysokodávkovaná imunoablační terapie v léčbě autoimunitních onemocnění, nové indikace

Kozák T., Novák J., Bortlík M., Ďuricová D., Petečuková V., Dobrovolný J., Rahmatová Š., Lukáš M. (Interní hematologická klinika, 3. LF Univerzity Karlovy, Praha; IS CARE, Praha; ÚHKT, Praha)

Systémová sklerodermie a roztroušená skleróza jsou obtížně zvladatelná autoimunitní onemocnění (AID), navozující těžkou invaliditu a v případě systémové sklerózy i krátkou dobou přežití při konvenční terapii. U jinak nezvladatelných forem těchto onemocnění je individuálně indikovaná vysokodávkovaná imunoablační terapie s podporou autologních krvetvorných buněk. Efekt imunoablační terapie je založen především na konceptu tzv. resetu vlastního imunitního systému, který v mnoha případech navodí klinickou remisi onemocnění a nebo obnoví responsivitu ke konvenční nebo biologické léčbě. V mezinárodním registru transplantovaných AID dominují tyto dvě diagnózy, méně jsou indikovány systémový lupus erythematoses a jiná autoimunitní onemocnění. Crohnova choroba se dostala mezi indikace vysokodávkované terapie v posledních 5 letech, zejména po zveřejnění prvních analýz randomizované studie ASTIC. Indikace jsou však vysoce individuální s přihlédnutím k možným rizikům výkonu, včetně fatální komplikace, která se ve studii ASTIC také objevila. Na naší klinice jsme provedli po indikaci mezioborovou indikační komisí úspěšnou, nekomplikovanou mobilizaci, separaci a následnou pozitivní selekci CD34+ buněk u dvou pacientů s Crohnovou chorobou. Poté byli pacienti (1 muž, 1 žena) podrobena vysokodávkované submyeloablativní terapii s podporou CD34+ buněk. První pacient je 8 měsíců po zcela nekomplikované transplantaci a došlo u něho ke klinickému zklidnění onemocnění a opět byla navozena odpověď na anti-TNF terapii. Druhá pacientka je nedlouho po transplantaci a zhodnocení klinického průběhu s odstupem bude k dispozici v době kongresu OHD.

2739.

Recovery of mucosal-associated invariant T cells after myeloablative chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation

Novák J., Dobrovolný J., Brožová J., Kozák T. (IHK, FNKV, Praha)

Immune reconstitution after high dose chemotherapy and stem cell transplantation plays a key role in restoring immunocompetence including defense against infection, immune regulation, and onco-immune surveillance. In this work we examined the recovery of Mucosal associated invariant T (MAIT) cells, recently discovered innate-like T cells, after various types of myeloablative chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT) in 29 patients. We show that MAIT cells are relatively resistant to myeloablative conditioning. The median amount of MAIT cells rises to 43% around day +30 and is sustained through further measurements on days +60 and +100. Moreover, MAIT cell recovery reaches 100% of pre-treatment values in 33% of patients already by day +60. The only factor affecting recovery of MAIT cells is age, younger age being associated with earlier MAIT cell recovery. The pre-treatment quantity of MAIT cells carries a prognostic impact on the early post-transplantation course. Patients with high levels of MAIT cells pre-treatment have significantly lower peak CRP levels (79.45 mg/L versus 150 mg/L) post-treatment, reflecting a clinical trend of less severe infectious complications (less febrile days and less days on intravenous antibiotics). Moreover, high MAIT cell amount was associated with the clinical trend of less severe mucosal injury (less days on total parenteral nutrition and lower peak mucositis grade) and significantly lower peak liver transaminase levels. Altogether this data suggests that a high proportion of MAIT cells survive myeloablative chemotherapy and maintain their capacity to fight against infections on mucosal surfaces.

POSTEROVÁ ČÁST

OŠETŘOVATELSTVÍ A ZDRAVOTNÍ LABORANTI

P1/2760.

Výroba trombocytárních přípravků na transfuzním oddělení FN Olomouc

Procházková O., Skotáková A., Vymětalová R., Koukalová A., Galuzsková D. (Transfuzní oddělení, FN, Olomouc)

Úvod: Na transfuzním oddělení vyrábíme trombocytární transfuzní přípravky (TP) metodou přístrojových aferetických odběrů a dodatečným zpracováním buffy-coatů (BC) – směsné trombocytární TP. Při výrobě upřednostňujeme použití náhradního roztoku SSP+ (PASIII) před plazmou, čímž snižujeme riziko alergických reakcí. Od července 2011 jsme přešli na výrobu výhradně deleukotizovaných trombocytárních TP. Poměr výroby trombocytů z aferetických odběrů klesá, naopak stoupá výroba trombocytů z BC. Pro klinické pracoviště HOK na vyžádání vyrábíme i trombocyty k přežívání. Tento přípravek slouží ke klinickému vyšetření přežívání trombocytů v oběhu pacienta. Metodika: Výroba trombocytárních TP probíhá v rutinním provozu. Zaměstnanci flexibilně reagují na požadavky klinických oddělení, máme nastavený i statimový režim - přípravek vyexpedujeme do tří hodin. Při urgentním požadavku vyrábíme i o víkendech a svátcích. Našími odběrateli jsou klinická oddělení FN Olomouc a spádová oblast. Trombocyty z aferézy jsou odebrány na odběrovém úseku, poté jsou předány do výroby, kde je rozplníme na požadovaný počet jednotek T.U., rozplňujeme i menší množství jako pediatrickou jednotku. V roce 2014 jsme vyrobili 2545 T.U. trombocytů z aferézy. Směsné trombocytární TP vyrábíme smísením 5 BC stejné krevní skupiny, použijeme jednorázovou soupravu tzv. „chobotnici“ a náhradní roztok. V roce 2014 jsme vyrobili 813 T.D. Po výrobě jsou trombocytární TP skladovány na validovaných třepačkách při teplotě +20°C až +24°C. Součástí výroby TP je kontrola jakostních parametrů – sledujeme objem, množství trombocytů na T.U., reziduální leukocyty po deleukotizaci, hodnotu pH měřenou na konci doby použitelnosti. Požadavek – musí vyhovět 90 % TP. Kontrola sterility musí vyhovět ve 100 %. Kontrolujeme i neporušenost obalu a fenomén vířivosti „swirling“. Po splnění těchto požadavků jsou trombocytární TP propuštěny kvalifikovanou osobou ke klinickému použití. Trombocyty k přežívání - je pouze doplňková výroba TP. V roce 2014 jsme vyrobili 3 jednotky. Závěr: Trend výroby trombocytárních TP má stoupající tendenci, v roce 2014 vzrostla výroba o 16 % proti roku 2013. Stoupá i poměr výroby TBSDR – z celkové produkce výroby roku 2014 na 24,2 %. Jakostní parametry u aferetických odběrů vyhověly v 98 %, u směsných TP ve 100 %. Kontrola sterility vyhověla ve 100 %. Naší snahou je vyrábět kvalitní trombocytární TP, zlepšujeme podmínky skladování, transportu, sledujeme světové trendy výroby transfuzních TP.

P2/2757.

Verifikace před akreditací dle normy ČSN EN ISO 15189:2007 v Laboratoři infekčních markerů Transfuzního oddělení FN Olomouc

Oklešťková D., Šrámková B., Sekaninová P., Vymětalová R., Galuzsková D. (Transfuzní oddělení, FN, Olomouc)

Úvod: Cílem tohoto sdělení je poskytnutí souhrnného přehledu přípravy laboratoře k akreditaci. Účelem vyšetření v Laboratoři infekčních markerů je sérologické vyšetření pacientů a dárců tkání na přítomnost infekcí přenosných krví. Významnou součástí přípravy k akreditaci je verifikace pro jednotlivá vyšetření s ohledem na doporučení Společnosti pro lékařskou mikrobiologii České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně. Materiál: srážlivý krevní vzorek Metodika: verifikované metody: HBsAg Qualitative II, anti-HCV, anti-HIV Ag/Ab Combo, Syphilis TP, anti-HBc II. Byly nastaveny jednotlivé kroky verifikace pro každou metodu a analyzátor: potvrzení správnosti, potvrzení reprodukovatelnosti, mezipřístrojové reprodukovatelnosti, potvrzení návaznosti na referenční vzorky a potvrzení návaznosti na EHK. Byl vyhodnocen průměr jednotlivých vyšetření, směrodatná odchylka a variační koeficient pro všechny vyšetřované infekční markery. Výsledky byly porovnány s údaji z příbalových letáků jednotlivých infekčních markerů. Požadovali jsme 100% shodu údajů. Výsledky: Verifikace byla prováděna na analyzátoru Architect i2000 a Architect i2000SR metodou CMIA (Chemiluminiscenční imunoanalýza na mikročásticích). Závěr: Proces verifikace metod představuje ve spojení s akreditací dle normy ČSN EN ISO 15189:2007 z kvalitnější úrovně poskytovaných služeb pro žadatele laboratorních vyšetření.

P3/2765.

CD22 as a target for antibody therapy of resistant forms of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia

Kužílková D., Kanderová V., Kalina T., Hrušák O., Mejstříková E. (CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie, 2.lékařská fakulta UK a FN Motol, Praha)

Epratuzumab, a humanized anti-CD22 antibody, is being used for treatment of several autoimmune diseases (systemic lupus erythematosus) and non-Hodgkin lymphoma. Because of its low side effects epratuzumab was integrated into IntReALL 2010 protocol for treatment of relapsed childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). The CD22 protein is expressed on B-lymphocytes and shows inhibitory effect on B-cell receptor (BCR) signaling. Although the function of CD22 on B-lymphocytes is described, the mechanism of action of epratuzumab on healthy and malignant B-lymphocytes and the effect on CD22 expression and detection during epratuzumab treatment remains poorly understood. The aim of the study is to determine (i) the effect of epratuzumab on CD22 expression, (ii) the optimal clone for the detection of CD22pos cells after epratuzumab treatment and (iii) the mechanism of action of epratuzumab on healthy and malignant B-lymphocytes and BCP-ALL cell lines. We tested the ability of anti-CD22 antibody (clone S-HCL-1) to distinguish CD22pos cells in peripheral blood (PB, n=4) after epratuzumab treatment. We detected a partial competition between the two clones (S-HCL-1 and epratuzumab), the fluorescence intensity of S-HCL-1 after preincubation of cells with epratuzumab decreased only by 30%. This can be partially caused by internalization of CD22 upon epratuzumab binding. Epratuzumab decreased the proliferation of B-lymphocytes isolated from PB of healthy donors (n=3) in vitro, no effect was observed in BCP-ALL cell lines (n=5). Moreover, in vitro epratuzumab treatment reduced the G0-G1 transition of B-lymphocytes isolated from PB of healthy donors (n=2; 4.15% vs. 8% of cells in G1-phase) with no signs of increased apoptosis. Next we examined the effect of epratuzumab on BCR signaling. We detected phosphorylation of Syk (Y525/526) and Erk1/2 (T202/Y204) kinases after 5 and 15min of stimulation. In BCP-ALL cell lines (n=2) Syk kinase, but not Erk1/2, was detected in its phosphorylated form. Using the S-HCL-1 clone we were able to detect CD22pos cells after epratuzumab treatment. BCP-ALL cell lines are not appropriate models to study the mechanism of action of epratuzumab in vitro, probably because of their independence on external stimuli. In contrast, signaling pathway activation and also proliferation and cell cycle of B-lymphocytes isolated from PB of healthy donors is influenced by epratuzumab. Supported by FP7IntReALL, IGA NT13462, P302/12/G101

P4/2715.

Leukemia-associated antigens as alternative markers of minimal residual disease

Polák J., Petrboková R., Hájková H., Válková V., Soukupová J., Marková M., Vítek A., Schwarz J., Nováková L., Soukup P., Srbová D., Šálek C. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

The follow-up of minimal residual disease (MRD) markers by means of application the quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) is of prognostic importance in AML patients. The monitoring of the specific fusion genes and/or the mutated gene NPM1 is applied for MRD monitoring in AML patients. Unfortunately, these specific markers are available only in approximately 55% of all AML patients, so there is necessity to found sufficiently highly overexpressed MRD marker at the time of diagnosis; it means overexpressed at least 2 orders above the upper normal limit in diagnostics samples. Quantitative estimation of the WT1 gene transcripts level in peripheral blood of majority (72%) AML patients is well known and widely used for monitoring MRD. In order to find another and/or additional MRD markers we had analysed expression of selected leukemia-associated antigens (LAA) at diagnosis. The selected LAA: PRAME, MSLN, XAGE-1/GAGED2, ST18, CSPG4, CA9 and the prognostic marker BAALC were found highly overexpressed: PRAME in 37%, MSLN in 5%, ST18 in 8%, XAGE-1 in 7%, CSPG4 in 5% and BAALC in 9% of 169 samples of AML patients at the time of diagnosis. These selected LAA transcripts were measured in 9 cases of AML patients during the course of disease and strong correlation with disease status and WT1 expression was found. In some instances these LAA as MRD markers were superior to WT1 tracking and/or they were the only available MRD markers in patients with low expression of

WT1 at diagnosis. Consequently, the follow-up of selected LAA concomitantly with the WT1 gene or independently could detect the impending relapse more efficiently. Thus, our results support the idea that the selected LAA could be used as sensitive MRD markers. In conclusion, the application of selected LAA as reliable markers of MRD was confirmed. Supported by the project for conceptual development of research organization (00023736) from the Ministry of Health of the Czech Republic.

CLL

P5/2670.

Cytometrická analýza markerů dráhy programované buněčné smrti u chronické lymfatické leukémie

Novák M., Procházka V., Papajík T. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Prezentujeme cytometrickou analýzu interakce receptoru PD-1 (Programmed Death-1) s ligandem PD-1L u nemocných v různých fázích CLL s rozdílným Binet statusem v porovnání se zdravými dárci krve. U CD4+PD-1+ buněk byl prokázán signifikantní rozdíl mezi zdravými dobrovolníky (HV) a oběma skupinami nemocných: HV vers. neléčení, (0.412×109/L a 0.674×109/L, p=0.037) a HV vers. nemocní s refrakterní/relabovanou CLL, (0.412×109/L a 0.769×109/L, p=0.009) Porovnání neléčených s relabovanými/refrakterními odhalilo nižší zastoupení CD4+PD-1+ u neléčených, rozdíl však nebyl signifikantní: 0.674×109/L vers. 0.769×109/L; p=0.455. U CD8+PD-1+ byl nalezen signifikantní rozdíl mezi HV a oběma skupinami nemocných: HV vers. neléčení, 0.298×109/L vers. 0.494×109/L; p=0.007 a HV vers. nemocní s refrakterní/relabovanou CLL, 0.298×109/L vers. 0.645×109/L; p=0.032. Porovnání neléčených s relabovanými/refrakterními ukázalo nižší zastoupení CD8+PD-1+ u neléčených, rozdíl však nebyl signifikantní: 0.494×109/L vers. 0.645×109/L; p=0.254. Srovnání absolutního počtu CD4+PD-1+ u jednotlivých skupin v různých stage dle Bineta neprokázalo signifikantní rozdíl: Binet A 0.5846×109/L vers. Binet B 0.5783×109/L (p=0.942), Binet A 0.5846×109/L vers. Binet C 0.5264×109/L (p=0.769) a Binet B 0.5783×109/L vers. Binet C 0.5264×109/L (p=0.713). Signifikantní rozdíl absolutního počtu CD8+PD-1+ T-lymfocytů mezi nemocnými v různých stage dle Bineta nebyl nalezen: Binet A 0.4339×109/L vers. Binet B 0.4336×109/L (p=0.973), Binet A 0.4339×109/L vers. Binet C 0.4090×109/L (p=0.816) a Binet B 0.4336×109/L vers. Binet C 0.4090×109/L (p=0.816). Počty CD4+ a CD8+ T-lymfocytů s koexpresí PD-1 vykazují vzrůstající tendenci od HV přes doposud nemocné k pacientům s refrakterní/relabovanou CLL. Signifikantní rozdíl absolutního počtu CD4+PD-1+ ani CD8+PD-1+ T-lymfocytů mezi jednotlivými skupinami nemocných v různých stage dle Bineta nebyl nalezen. Nejvyšší zastoupení CD4+PD-1+ i CD8+PD-1+ populací bylo prokázáno u nemocných s aktivním onemocněním a v relapsu, což podporuje teorii, dle které je nádorový klon nádor schopen cestou dráhy PD-1 /PD-L1 navozovat stav nádorové tolerance. Jelikož rozdíl v expresi receptoru PD-1 mezi jednotlivými stage dle Bineta nebyl zjištěn, předpokládáme, že fáze onemocnění odráží stupeň ovlivnění mechanismů protinádorové imunity cestou navýšení exprese markerů dráhy programované buněčné smrti. Podpořeno grantem IGA-LF-2014-001

P6/2800.

Delece 14q, vzácná rekuretní aberace u pacientů s CLL

Truhlíková L., Šablaturová T., Stoklasová M., Strnková A., Dřevojánková B., Burdová A., Hodslavská V., Sítková R., Klodová D., Wróbel M., Bodzásová C., Zuchnická J., Adamová D., Heinzová V., Živná J., Rytíková N., Brychtová Y., Břejcha M. (Laboratoř lékařské genetiky, Vzdělávací a výzkumný institut AGEL, o.p.s. - pobočka Nový Jičín, Laboratoř AGEL, Nový Jičín; Nemocnice Nový Jičín a.s., Hematologická ambulance, Nový Jičín; Fakultní nemocnice Ostrava, Klinika hematologie, Ostrava, Slezská nemocnice v Opavě, Hematologicko-transfúzní oddělení, Opava; Nemocnice Hranice a.s., Hematologicko-transfúzní oddělení, Hranice; Sdružené zdravotnické zařízení Krnov, Hematologická ambulance, Krnov; Fakultní nemocnice Brno, Interní hematologická a onkologická klinika, Brno)

Úvod Delece 14q je raritní aberace vyskytující se především u B-buněčných neoplazií, nejčastěji je detekována u chronické lymfocytární leukémie (CLL; Mitelmanova databáze 2013). Delecí 14q se pro její sporadický výskyt zabývá jen malé množství studií. Většinou je popisována jako

intersticiální s variabilní velikostí, ale mnoho případů má společná místa zlomu v oblasti 14q24.1 a 14q32.3 (Reindl et al., 2010, Pospíšilová et al., 2007). Pacienti a metody Cytogenetické vyšetření vzorků periferní krve nebo kostní dřeně bylo provedeno u 552 CLL vzorků. Karyotyp byl stanoven z kultury stimulované CpG-oligonukleotidy a IL-2. FISH vyšetření bylo provedeno na nestimulovaných kulturách s panelem sond pro delece 11q, 13q, 17p a trizomii 12. U pacientů s delecí 14q byla hodnocena i přestavba genu IGH a rozsah delece chromozomu 14 byl stanoven metodou mBAND. Výsledky Karyotyp byl stanoven u 92,8 % (512/552) vzorků. Delece 14q byla zachycena ve 2,3 % (12/512), v 11 případech byla intersticiální. Nejčastější místa zlomu byla 14q24 (10/12) a 14q32.3 (8/12), v 8 případech došlo k delecí v genu IGH. U sedmi pacientů byly s del(14q) identifikovány další aberace, ve dvou případech byly spojeny s komplexním karyotypem. IGVH status byl nemutovaný u 9 pacientů. Závěr Podle Reindl et al. je delece 14q spojena s kratším časem do doby zahájení léčby. Navíc v přítomnosti trizomie 12 měla negativní vliv na celkové přežití. V naší skupině pacientů jsme zaznamenali podobná místa zlomu s nápadným sdružováním v oblasti 14q24 a 14q32.3, vazbu s nemutovaným IGVH a výskyt delece 14q jak s dalšími aberacemi, tak jako izolovanou změnu karyotypu.

P7/2769.

Asociace mutace SF3B1, rekurentních genetických aberací a stereotypního receptoru subset #2 nemocných s chronickou lymfocytární leukémií

Urbanová R., Dřímlová H., Krůžová L., Holzerová M., Turcsányi P., Zinráková P., Kubová Z., Procházková V., Jarošová M., Marešová I., Vrbková J., Papajík T. (Hemato-onkologická klinika LF UP a FN, Olomouc)

Úvod: U třetiny nemocných s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) je popsán výskyt stereotypních B-buněčných receptorů (BCR). Jedním z nich je subset #2, nesoucí subgen IGHV3-21 a charakteristickou, krátkou CDR3 sekvencí. Je u něj popsán nepříznivý průběh nemoci bez ohledu na mutační stav IGHV, častý výskyt mutací v genu SF3B1, přičemž tato mutace je spojována s pokročilostí a agresivním průběhem nemoci. Pokroky v technologických sekvenování nové generace (NGS) umožnily pochopit molekulární evoluci a klonální vývoj nemoci. Sdružení některých rekurentních genetických aberací, genových mutací a stereotypních BCR naznačuje cesty klonální evoluce, což je důležité s ohledem na nové možnosti cílené léčby. Je popsána asociace mutace SF3B1, delece 11q a subsetu #2. Cílem práce bylo popsat klinický průběh onemocnění pacientů se subset #2 ve vztahu k výskytu genetických aberací a mutací SF3B1. Materiál a metody: Byla provedena analýza mutací genu SF3B1 na úrovni transkriptu pomocí přímého Sangerova sekvenování z mononukleární frakce buněk periferní krve nebo uzlin celkem 20 vzorků 13 pacientů před léčbou a v průběhu vývoje nemoci. Vyšetřovaná oblast zahrnovala exony 13-16. U všech pacientů byla provedena klasická cytogenetika a FISH s panelem CLL sond. Výsledky: Výskyt subgenu IGHV3-21 u souboru 417 nově diagnostikovaných nemocných z let 2000-2011 na HOK LF UP a FN Olomouc byl 7 % (29 pacientů). U všech nemocných se subgenem IGHV3-21 popisujeme krátký interval do zahájení léčby (TFS), 9 měsíců (rozmezí: 4 – 63). Subset #2 byl přítomen u celkem 13 nemocných (45%), medián celkového přežití (OS) 98 měsíců (rozmezí: 64 – nedosažen). Nebyl prokázán rozdíl v OS nemocných s IGHV3-21 v závislosti na přítomnosti subset #2 ($p < 0,938$) ani rozdíl v TFS ($p < 0,134$). Mutovaný stav IGHV byl přítomen u 8 ze 13 nemocných se subset #2 (61,3 %), ale pouze u 7 ze 16 nemocných (43,8 %) bez subsetu #2, s vysokou mírou homologie, s mediánem počtu mutací 3,4 a 3,3 % u podskupin. U nemocných se subset #2 byl prokázán vyšší výskyt delece 13q (81 %) a 11q (31 %), přičemž výskyt delece 13q a 11q v souboru všech nemocných byl 46 % a 19 %. U celkem 8 nemocných se subset #2 byla prokázána mutace SF3B1 (61,5 %). Medián OS nemocných s mutací SF3B1 byl 64 měsíců (rozmezí: 31 – nedosažen) a u nemocných bez mutace 107 měsíců (rozmezí: 75 – nedosažen). Závěr: Ve shodě s literaturou popisujeme sdružení stereotypního BCR subset #2, delece 13q, 11q a mutace SF3B1, ale bez asociace s mutačním stavem IGHV.

P8/2763.

Mutační status IGHV jako prognostický faktor u CLL

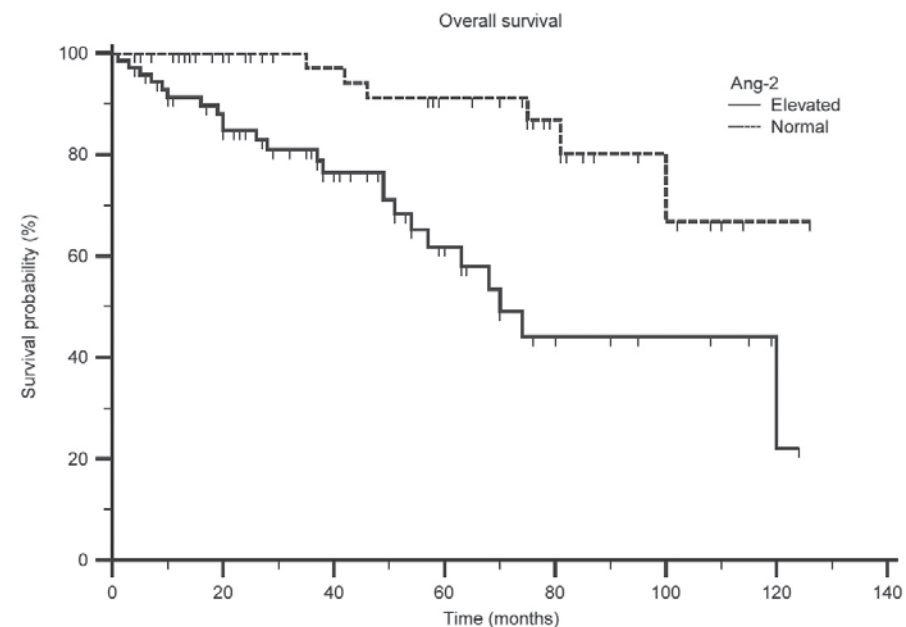
Skirková L., Hikkel I., Čermák M., Copáková L. (Národní onkologický ústav Bratislava, Oddelenie lékařskej genetiky, Bratislava - SK)

Úvod: Chronická lymfocytová leukémia B- typu (B- CLL) je lymfoproliferatívne ochorenie, ktoré vzniká malignou transformáciou periférnych pamäťových antigén skúsených a aktivovaných B lymfocytov v krvi, kostnej dreni prípadne iných hemopoetických a non- hemopoetických orgánoch. Predstavuje 25-30 % všetkých leukémií, pričom väčšina pacientov má v čase diagnózy viac ako 65 rokov. Postihuje 2-krát častejšie mužov ako ženy. Asi 80 % prípadov CLL má abnormálny karyotyp. Medzi najvýznamnejšie genetické prognostické faktory u CLL patria mutácie TP53 génu, IGHV mutačný status a štrukturálne a numerické chromozómové aberácie. Medzi prognosticky relevantné chromozómové aberácie patrí del13q14, 11q22-23 (nesúca gén ATM) a 17p13 (nesúca gén TP53), ďalej trizómia chromozómu 12. Iba delécia 13q14 ovplyvňuje prognózu v porovnaní s normálnym karyotypom priaznivo, ostatné aberácie ovplyvňujú prognózu nepriaznivo. Nezávislý prognostický marker ochorenia, ktorý počas ochorenia zostáva stabilný je mutačný status génov kódujúcich variabilné oblasti génov pre ťažké reťazce imunoglobulínov (IGHV). Homológia vo > 98 % sekvencií, tj. IGHV nemutované koreluje s horšou prognózou a kratším prežívaním. Naopak prítomnosť somatických mutácií vo viac ako 2 % sekvencií, tj. IGHV mutované je považované za prognosticky priaznivé (potenciálne indolentná forma B-CLL). Sekvenčná homológia 98 % predstavuje klinický „cut-off“ medzi dobrou (mutovaný status) a zlou (nemutovaný status) prognózou. Postup: Analýzu mutačného statusu IGHV vykonávame na podklade doporučení pracovnej skupiny ERIC (European Research Initiative on CLL). Ako materiál používame periférnu krv, alebo kostnú dreň v EDTA. Výsledky : V priebehu rokov 2011 až 2014 sme na Oddelení lekárskej genetiky Národného onkologického ústavu (NOÚ) vyšetřili mutačný status IGHV u 184 CLL pacientov (116 mužov a 68 žien). Identifikovali sme 46 % prípadov s mutačným statusom mutovaným a 54 % s nemutovaným, z toho boli pri hranici „cut off“, ! (98± 0,5 %) 3 % prípadov. Prestavbu zahrňujúcu región VH3-21, ktorá predstavuje nepriaznivú prognózu nezávisle od mutačného statusu sme identifikovali v 4 % prípadov. Kombináciu IGHV mutované plus 11q- a/alebo 17p- predstavujúcu obzvlášť nepriaznivú prognózu sme identifikovali v 18 % prípadov.

P9/2733.

Mikroprostředí u chronické lymfocytární leukémie: prognostický význam cirkulujících angiogenních faktorů.

Smolej L., Vodárek P., Andrýs C., Šimkovič M., Motyčková M., Belada D., Žák P. (IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové)



Úvod: Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je mimořádná různorodostí klinického průběhu. Angiogeneze patří mezi nezbytné procesy v patogenezi malignit včetně CLL. Vyšetřování parametrů angiogeneze by mohlo zlepšit zpřesnění individuální prognózy nemocných. Cíle: hodnocení plazmatických koncentrací angiogenních cytokinů u CLL a posouzení jejich prognostického významu. Nemocní a metodiky: Vyšetřili jsme plazmatické koncentrace fibroblastového růstového faktoru-2 (FGF-2), cévního endotelového růstového faktoru (VEGF), solubilního endoglinu (sCD105), endostatínu a angiopoetinu-2 (Ang-2) metodou ELISA u nemocných s neléčenou CLL (medián věku 63 let, 69 % mužů) (FGF-2 a VEGF, n=181; sCD105, n=175; endostatin, n=137; Ang-2, n=130). Zdraví dárce krve (n=80) tvořili kontrolní skupinu. Koncentrace angiogenních faktorů vyšší než horní mez 95% intervalu spolehlivosti kontrolního souboru byly označeny za zvýšené. Výsledky: Všechny cirkulující cytokiny kromě endostatínu byly významně vyšší u nemocných s CLL vůči kontrolám (FGF-2 a sCD105: $p < 0,0001$; VEGF, $p = 0,0004$; Ang-2: $p = 0,001$). Koncentrace sCD105 se zvyšovaly s pokročilostí choroby (Rai nízké vs. střední vs. vysoké riziko $p = 0,024$ a $p = 0,033$). Nemocní s progredující chorobou měli významně vyšší koncentrace sCD105, endostatínu a Ang-2 v porovnání s nemocnými se stabilním průběhem (sCD105: $p = 0,0008$; endostatin: $p = 0,019$; Ang-2: $p = 0,015$). Nemocní s nemutovanými IGHV geny měli významně vyšší Ang-2 ($p = 0,023$). Celkové přežití bylo významně kratší u nemocných se zvýšenou koncentrací Ang-2 (medián 70 měsíců vs. nedosažen, poměr rizik 0,23 [95% interval spolehlivosti 0,11-0,48], $p = 0,0004$). Závěr: Naše výsledky ukazují na komplexní aktivaci angiogenních signálních drah u CLL, souvislost s prognostickými faktory a význam pro klinický průběh. Ang-2 a sCD105 se v tomto smyslu jeví jako nejužitečnější a zasluhují další studium. Podpořeno grantem IGA MZ ČR NT/13412-4, grantem Vnitřní soutěže Lékařské fakulty UK v Hradci Králové „Prognostický význam exprese HLA-G na buňkách chronické lymfocytární leukémie“ a programem PRVOUK P37/08.

CML/PH-MPN

P10/2746.

Detekcia mutácií v géne CALR u pacientov s ET a PMF

Mikulášová Z., Leitnerová M., Skirková L., Copáková L. (Oddelenie lekárskej genetiky, Národný onkologický ústav v Bratislave, Bratislava - SK)

Úvod: Do skupiny Ph negatívnych myeloproliferatívnych neoplázií (MPN) radíme podľa klasifikácie WHO z roku 2008 polycytémiu vera (PV), esenciálnu trombocytémiu (ET) a primárnu myelofibrózu (PMF). V roku 2005 bola u viacerých Ph- MPN objavená aktivačná mutácia v exóne 14 génu JAK2, ktorej prítomnosť potvrdzuje klonalitu ochorenia. Dochádza pri nej k substitúcii aminokyseliny valínu (V) na fenylalanín (F) v pozícii 617 aminokyselínovej sekvencie (V617F) a má za následok konštitutívnu aktiváciu JAK2 kinázovej domény. Táto mutácia sa vyskytuje u 95% pacientov s PV a u približne 50%-60% pacientov s ET a PMF. U pacientov s PV sa ďalej môžu vyskytovať mutácie v exóne 12 génu JAK2 a u 5%-10% prípadov s ET a PMF a nemutovaným génom JAK2 je možné identifikovať aktivačné mutácie v exóne 10 génu MPL. Zvyšných 30%-45% pacientov s MPN však donedávna nemalo žiadny molekulový marker. Koncom roku 2013 boli objavené mutácie v exóne 9 génu CALR, kódujúceho proteín kalretikulín, ktoré sa vyskytujú u približne 56%-88% pacientov s nemutovaným JAK2 a MPL génom. Stanovenie mutácií v géne CALR teda výrazne posilnilo súčasnú diagnostiku ET a PMF. Predpokladá sa, že tento molekulový marker môže mať i prognostický význam. Nedávne štúdie naznačujú, že pacienti s mutáciou v géne CALR môžu mať indolentnejší priebeh ochorenia ako pacienti s mutáciou JAK2 V617F. Cieľom našej práce bolo zavedenie molekulovo-genetického vyšetrenia mutácií v exóne 9 génu CALR prostredníctvom HRMA (High Resolution Melting Analysis) - analýzy kriviek topenia s vysokou rozlišovacou schopnosťou u pacientov s diagnózou ET a PMF. Materiál a metódy: Na genetickú analýzu mutácií v exóne 9 génu CALR sme použili vzorky DNA izolované z periférnej krvi 40 dospelých a troch detských pacientov so suspektnou diagnózou ET alebo MPN s nie presne definovaným podtypom. Exón 9 sme vyšetřili prostredníctvom HRMA. Verifikáciu pozitívnych vzoriek sme realizovali Sangerovým sekvenovaním DNA. Výsledky: Mutácie v exóne 9 génu CALR sme zachytili u troch pacientov (dvoch dospelých a jedného detského pacienta s ET), čo predstavuje ~7%. V dvoch prípadoch sa jednalo o inzerciu 5bp a v jednom prípade sme identifikovali deléciu 52bp. Záver: Na našom oddelení sme zaviedli molekulovo-genetické vyšetrenie nového markera, identifikovaného u pacientov s ET a PMF. Vzhľadom k tomu, že náš súbor pozostával z pacientov so suspektnou diagnózou, sme pozitívitu zachytili iba u ~7% z nich.

P11/2722.

Prognostické indexy u Chronické myeloidní leukemie – existuje prostor ke zlepšení? Faber E., Fürstová J., Fürst T., Mužik J., Janoušová E., Dufková T., Čermáková Z., Indrák K. (Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc; 1. LF UK, Praha; Katedra matematické analýzy a aplikací matematiky PřF UP, Olomouc; Institut biostatistiky a analýz LF MU, Brno; LF UP, Olomouc)

V současné době se pro odhad prognózy nemocných s CML při stanovení diagnózy používají 3 systémy – Sokalův, Hasfordův a skóre European LeukemiaNet (ELN) EUTOS, které potvrdily svou validitu v různých studiích. Přitom Sokalův index byl publikován již v roce 1984 na základě analýzy 813 pacientů léčených chemoterapií, zatímco Hasfordovo skóre bylo určeno pro odhad prognózy nemocných s CML léčených interferonem alfa. Snaha evropských statistiků sdružených v ELN najít lepší skóre pro pacienty léčené inhibitory tyrosinové kinázy (TKI) vyústila v identifikaci skóre EUTOS, které je sice velmi jednoduché, ale hůře identifikuje pacienty se špatnou prognózou a není také optimální pro odhad jejich přežití. Jak si nedávno správně všimli korejští autoři (Int J Hematol 2014;100:132), pacient může být podle různých systémů zařazen do různých rizikových skupin. O tento fakt se opírají také naše analýzy, k nimž jsme využili nejprve nemocné léčené v jednom centru a poté databázi CAMELIA. Analýzy byly prováděny pomocí Kaplan-Meierových křivek, přičemž statistickou významnost rozdílů jsme posuzovali podle log rank testu a konkordance měřené Harrellovým indexem c. K identifikaci nového skóre byla dále provedena multivariační Coxova regresní analýza. První analýza byla provedena na skupině 194 netransplantovaných pacientů s CML léčených v Olomouci TKI. 117 mužů a 77 žen s mediánem věku 53 let (věkové rozpětí 17-88 let) bylo léčeno po dobu 90 měsíců (medián). 74 (38 %) pacientů bylo předléčeno interferonem. Výpovědní hodnota nově navržených skórovacích systémů byla ověřena v databázi CAMELIA na skupině 469 pacientů v chronické fázi CML léčených imatinibem v první linii. Námi navržené skóre, které kombinuje hodnoty Sokalova, Hasfordova a EUTOS skóre, odděluje s vysokou statistickou významností 3 skupiny pacientů s různou pravděpodobností celkového přežití (úmrtí pouze na CML) a přežití bez události. V obou případech (OS i EFS) je predikční síla námi navrženého skóre lepší než u všech dosavadních prognostických skóre, s nejvyšším Harrellovým indexem konkordance. Je třeba zdůraznit, že nové skóre neobsahuje žádné parametry, jejichž kritické hodnoty („cut-off“) by byly přízřebnými („nafitovaný“) naší skupině pacientů. V databázi CAMELIA bylo dále validováno další skóre s lepší predikcí než dosavadní systémy opírající se o věk, procento eozinofilů a hemoglobin. Bude diskutována hodnota těchto výsledků a možný další postup.

MONOKLONÁLNÍ GAMAPATIE

P12/2767.

Multiple myeloma and bone marrow microenvironment – immunohistochemical study.

Flodr P., Minařík J., Pika T., Bačovský J., Látalová P., Pusciznová P., Ščudla V. (ÚKMP LF UPOL a FNOL, Olomouc; HOK LF UPOL, FNOL, Olomouc)

Aim: Neoplastic milieu is an integral part of all malignant diseases including multiple myeloma and plays variable role in their development, retention/adhesivity, resistency or sensitivity to a therapeutic approach, homing and also paraneoplastic manifestations. Relatively genetical stabile milieu may play more important role in a new specific molecular therapeutic approaches and therefore should be contextually studied with neoplastic cells as complex neoplastic tissues. The expressions of 11 proteins were analysed in consecutives multiple myeloma specimens. Materials and methods: Bone marrow trephine biopsy specimens with multiple myeloma were included in our prospective study. FFPE tissues were processed in app. 5microm sections and placed on charged slides. The indirect immunohistochemical staining was applicated after antigen retrieval and commercial primary antibodies were used for a detection of observed proteins. Standard secondary antibody and ABC method were included in visualisation. The expression of MIP1alfa, Annexin A2, TRAP, DKK-1, RANK, RANKL, OPG, Sclerotisin, Activin A, NFkappaB proteins (p50, p52, p65), p62 (sequestosome 1), and MMP9 was analysed. Results: Bone marrow multiple myeloma specimens showed variable positivity of MIP1alfa in 61% (cut-off point 20%), Annexin A2 in 28% (myeloma cells, cut-off point 30%) and in 40% (stromal cells, cut-off point 5%), TRAP in 64% (cut-off point 5%), DKK-1 in 20%

(cut-off point 30%), RANK in 44% (cut-off point 30%), RANKL in 66%, OPG in 3,6% (cut-off point 5%), Sclerotisin in 100% (cut-off point 90%), Activin A in 36% (cut-off point 30%), cytoplasmic positivity of p50 in 24%, p52 in 84% (cut-off point 10%), p62 in 100% (cut-off point 10%), p65 in 76% (cut-off point 10%) and positivity of MMP9 in 56% (cut-off point 30%). Conclusions: Our preliminary study showed variable expression of observed proteins in multiple myeloma and its bone marrow microenvironment that implicate different biological "stage", development and/or stromal plasticity in this complex hemato-oncological disease including myeloma cells itself and myeloma bone disease. The knowledge of engaged signaling pathways may suggest more specific or tailored therapeutic approaches in a particular patient and also in his stable or progressive multiple myeloma disease. Conclusions: Supported by NT 14393

P13/2740.

Genotypový profil plazmocelulární leukemie

Bezděková R., Všianská P., Suská R., Kučerová P., Pour L., Penka M., Hájek R., Říhová L. (Oddělení klinické hematologie, FN, Brno; Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; Babáková myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie MU, Brno)

Plazmocelulární leukemie (PCL) je vzácná a agresivní choroba charakterizovaná v periferní krvi cirkulujícími plazmatickými buňkami (cPC). Primární PCL (pPCL) nevzniká z mnohočetného myelomu (MM), nicméně sekundární PCL (sPCL) je leukemickou transformací MM. Detekce cPC pomocí průtokové cytometrie je důležitá pro diagnostické stanovení a odlišení PCL od reaktivní plazmocytozy. Identifikace genotypového profilu - charakteristického pro PCL - může být přínosná pro její včasnou detekci. Pacienti a metody: Bylo analyzováno 86 pacientů (12 pPCL, 10 sPCL a kontrolních 64 MM). V periferní krvi (PK) a kostní dřeni (KD) byly identifikovány CD38+CD138+PC, na nichž byla pomocí průtokové cytometrie analyzována exprese CD19, CD20, CD27, CD28, CD44, CD56, CD117 a nestinu (cut-off pozitivita: 20 %). Výsledky: Medián zastoupení PC v PK byl srovnatelný pro pPCL (26,7 %) a sPCL (26,8 %); v KD byla infiltrace PC vyšší u sPCL (55,6 %) oproti pPCL (39,2 %) a MM (5,8 %). U sPCL nebyly nalezeny žádné CD19+ a/nebo CD20+ PC ve srovnání s pPCL (pozitivita 16,7 % CD19+ nebo CD20+ případů v PK; 18,2 % CD19+ a 27,3 % CD20+ případů v KD) a MM (4,7 % CD19+ a 11,7% CD20+ případů v KD). CD56+ PC byly v KD nalézány častěji u MM (87,5 %) než u pPCL (54,5 %) a sPCL (66,7 %); v PK pak bylo CD56 pozitivních 58,3 % případů pPCL a 50,0 % sPCL. Množství CD27+ případů v KD bylo nejvyšší u MM (MM 51,6 %; pPCL 9,1 %; sPCL 28,6 %); v PK pak byla nalezena stejná pozitivita pro oba typy PCL (25,0 %). V pozitivitě na CD28 nebyl zjištěn rozdíl pro KD (30,0 % pPCL; 42,9 % sPCL a 22,6 % MM) ve srovnání s PK (16,7 % pPCL vs. 28,6 % sPCL). U obou typů PCL byl v KD exprimován znak CD44 ve 100 % případů, u MM jen v 70,7 %; pozitivita CD44 v PK byla nižší u pPCL (8,7 %) než u sPCL (100,0 %). Znak CD117 byl častěji exprimován v KD u sPCL (50,0 %) a MM (43,5 %) ve srovnání s pPCL (10,0 %), v PK byla nalezena podobná pozitivita pro oba typy PCL (8,3 % pPCL vs. 14,3 % sPCL). Nestin byl vysoce exprimován u sPCL (80,0 %) a pPCL (75,0 %), méně u MM (36,1 %); exprese v PK se u obou typů PCL příliš nelišila (57,1 % pPCL vs. 66,7 % sPCL). Shrnutí: Genotypový profil pPCL a sPCL se v PK ani KD příliš neliší vyjma ztráty znaku CD19 a CD20 u sPCL a snížené exprese CD117 u pPCL. Při srovnání s MM byla u obou typů PCL nalezena snížená exprese CD56 a CD27 se zvýšenou expresí CD44 a nestinu. Genotypový profil CD56-CD27-CD44+Nestin+ by mohl být specifický pro klonální PC nalézané u mimodřeňového rozšíření.

P14/2738.

Cirkulující mikroRNA v moči u mnohočetného myelomu

Sedlaříková L., Bešše L., Kubáčková V., Novosadová S., Almáši M., Bezděková R., Stanková M., Radová L., Penka M., Adam Z., Pour L., Krejčí M., Hájek R., Ševčíková S. (Babáková myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno; Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice, Brno; Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice, Brno; Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno; Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice, Brno; Ústav klinické hematologie, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava)

Úvod: MikroRNA (miRNA) jsou krátké jednořetězcové RNA a významné regulátory genové exprese. Dříve již bylo prokázáno, že se účastní také patogeneze mnohočetného myelomu (MM). V současnosti se pozornost kliniků i vědeckých pracovníků zaměřuje především na cirkulující miRNA, které je možné detekovat v různých tělních tekutinách jako např. sérum, plasma či moč. Cirkulující miRNA v moči jsou velice stabilní a díky kvantifikovatelnosti mají také potenciál stát se volně dostupným neinvazivním biomarkerem tohoto onemocnění. MM je systémové onemocnění, které postihuje i celou řadu dalších orgánů, jako jsou např. ledviny. Je tedy možné, že cirkulující miRNA identifikované v moči pacientů mohou korelovat s onemocněním. Cíl: Cílem studie bylo identifikovat miRNA, které cirkulují v moči, a které by byly schopné odlišit pacienty s MM od zdravých dárců (ZD). Materiál a metody: Do studie bylo zahrnuto 76 vzorků moči. Analýza potenciálně biologicky zajímavých miRNA byla provedena pomocí platformy Serum/Plasma Focus MicroRNA PCR Panel (Exiqon) na 8 vzorcích moči nově diagnostikovaných pacientů MM a 8 vzorcích moči ZD. Na základě výsledků byly vybrány rozdílně exprimované miRNA ($p < 0,05$) mezi skupinami pacientů MM a ZD a tyto byly ověřeny citlivější metodou qPCR s využitím relativní kvantifikace pomocí cel-miR-39 u 30 nově diagnostikovaných MM, 15 ZD a 15 pacientů s renálním karcinomem (RCC). Výsledky: Při miRNA profilování bylo nalezeno 20 deregulovaných miRNA ($p < 0,05$ pro všechny miRNA) mezi MM a ZD. Pro validaci bylo vybráno 8 z nejvíce deregulovaných miRNA. Hladiny exprese těchto miRNA byly dále ověřeny na rozsáhlejší souboru vzorků pacientů s MM a ZD. Do analýzy byli zařazeni také pacienti s RCC pro odlišení miRNA spojených s MM. Na základě výsledků byla pouze hladina miR-22 významně zvýšena v moči pacientů s MM ve srovnání se ZD ($p < 0,012$) a ve srovnání se vzorky moči u pacientů s RCC ($p < 0,009$). Závěr: Naše předběžné výsledky ukazují, že specifické miRNA cirkulující v moči by mohly mít potenciál stát se diagnostickým biomarkerem pacientů s MM. Podpořeno grantem IGA NT14575.

P15/2723.

Význam hloubky kompletní remise u mnohočetného myelomu po indukční léčbě ve vztahu k časnosti progresu/relapsu

Zábranská T., Jungová A., Jindra P. (Hematoonkologické oddělení, FN, Plzeň)

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je zhoubná, obtížně trvale léčitelná malignita z B-lymfocytů. Zdá se, že hloubka dosažené remise koreluje s délkou jejího trvání. V této souvislosti se logicky kumulují data významnosti dosažení remise i na úrovni molekulárně-genetické či imunofenotypické (absence minimální reziduální nemoci – MRD). MRD v kostní dřeni můžeme detekovat pomocí flowcytometrie (s hranicí citlivosti na hladině 1×10^{-4}). Imunofenotypická kompletní remise (iCR) je definována splněním podmínek konvenční CR spolu s negativním výsledkem vyšetření free light chains v séru a nepřítomností klonu plazmatických buněk v kostní dřeni při vyšetření 10^6 bb. při použití > 4-barevné průtokové cytometrie. Cíl: Ověření významu iCR po indukční léčbě u pacientů s MM na časnost progresu/relapsu. Soubor pacientů: Provedli jsme retrospektivní analýzu u 25 pacientů s MM konsekutivně diagnostikovaných v letech 2010-2013, u kterých bylo po indukční léčbě dosaženo konvenční CR a bylo provedeno flowcytometrické vyšetření kostní dřene k hodnocení event. přítomnosti MRD (metodika dle EMN – European myeloma network) Výsledky: V souboru bylo 14 mužů a 11 žen, průměrný věk byl 60 let. Pacienti byli léčení indukčním režimem obsahujícím u 12/25 (48%) thalidomid a u 13/25 (52%) bortezomib, všichni byli následně zajištěni vysocedávkovanou chemoterapií (HD-Melphalan 200mg/m²) s autologní transplantací. Celkem 8 pacientů (32%) s CR po indukci dosáhlo i iCR (dále MRD-ve), zatímco 17 pacientů (68%) mělo nadále flowcytometricky detekovatelnou MRD v kostní dřeni na hladině 1×10^{-2} až 1×10^{-4} (MRD+ve). Imunofenotypizační data po autologní transplantaci nebyla k dispozici. Mezi oběma skupinami nebyl statisticky rozdíl v pohlaví ($p=0,34$), v rizikové cytogenetice ($p=0,63$) ani v použitém indukčním režimu ($p=0,73$). Medián PFS u MRD+ve byl 23 měsíců (12-48) a u MRD-ve 35 měsíců (15-57), rozdíl PFS mezi oběma skupinami však nebyl statisticky významný ($p=0,73$). Závěr: V našem malém souboru je naznačen trend k delšímu PFS u pacientů MRD -ve, nicméně absence statistické signifikance může být dána jednak relativně malým souborem a případně efektem následné HD-terapie. Je vhodné další sledování na větším souboru pacientů a s podrobnější flowcytometrickou monitorací ve všech fázích léčby (tedy i po HD-Melphalan).

P16/2698.

Molekulárno-cytogenetická analýza vybraných regiónov chromozómu 8 u pacientov s MM a ich porovnanie v čase diagnózy a relapsu/progresii

Vincová M., Holzerová M., Mičková P., Pika T., Ščudla V., Jarošová M. (Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc)

Mnohopočetný myelóm (MM) je druhé najčastejšie malígne hematologické ochorenie spôsobené proliferáciou a akumuláciou terminálne diferencovaných plazmatických buniek v kostnej dreni. Genóm klonálnych plazmatických buniek MM sa vyznačuje enormným množstvom genetických zmien s prognostickým významom. Do skupiny abnormalít s vysokým rizikom patria hypodiploidie s častými prestavbami ťažkých imunoglobulínových reťazcov (IgH) zahrňujúcich gény CCND3, MAF, MAFB a FGFR3/MMSET. Progresia ochorenia je sprevádzaná množstvom sekundárnych chromozomálnych zmien, z ktorých najčastejšie sú prestavby génu c-MYC, del(13q), del(17p), strata 1p a/alebo amplifikácia 1q. Cieľom našej štúdie bolo určiť typ a frekvenciu zmien chromozómu 8, ich vzťah k priebehu ochorenia a nakoniec výsledky porovnať s vybranými klinickými charakteristikami. Analyzovaný súbor tvorilo 62 pacientov s MM vyšetrených v čase diagnózy a relapsu/progresii ochorenia metódou konvenčnej cytogenetiky, ďalej metódami FICTION a FISH so špecifickými sondami pre detekciu aberácií génov c-MYC, TRAIL-R1, -R2. Zmeny chromozómu 8 boli preukázané u 53% pacientov. Prestavby génu c-MYC boli detegované u 14 pacientov, početné zmeny génu c-MYC u 23 pacientov a delécia oblasti 8p21.3 u 12 pacientov v čase relapsu/progresie, avšak až 73% týchto zmien bolo pozorovaných už v čase diagnózy. Hodnotenie týchto zmien v súvislosti s klinickým vývojom naznačuje súvislosť s horším klinickým priebehom ochorenia a prevahou monoklonálneho IgG typu. Frekvencia a prognostický význam sledovaných zmien chromozómu 8 demonštrujú dôležitosť ich zaradenia do rutinných FISH vyšetrení. Táto práca je podporovaná z grantov: IGA MZ ČR NT 14400 a IGA-LF-2015-001

P17/2682.

Riziko progresie monoklonálnej gamapatie (MGUS) do mnohočetného myelomu - výsledky jedného centra.

Havlová E., Jungová A., Lavičková A., Šlechtová J. (Ústav klinické biochemie a hematologie, FN, Plzeň; Hematologicko-onkologické oddelení, FN, Plzeň)

Úvod: Monoklonálna gamapatia nejasného významu (MGUS) je asymptomatickou formou neoplázie z plazmatických buniek. Je charakterizovaná prítomnosťou monoklonálneho imunoglobulínu v krvi a klonálnou akumuláciou plazmatických buniek v kostnej dreni pri nesplnení diagnostických kritérií pro mnohočetný myelóm, AL-amyloidózu či inú B-lymfoproliferačnú. Incidence tohoto onemocnenia je v ČR 2-4/100 tisíc obyvateľov starších päťdesiat rokov. Prevalence sa zvyšuje s vekom. Riziko prechodu MGUS do mnohočetného myelomu (event. iné lymfoproliferačné - M.Waldenström, ...) je dle České myelomové spoločnosti (CMG) asi 7% s mediánom doby do transformácie 3 roky. Medzi rizikové faktory progresie do mnohočetného myelomu patrí non IgG subtyp, hladina paraproteínu nad 15 g/l, vysoké LD, hemoglobín menej než 120g/l, počet plazmocytov nad 5% a patologická hodnota pomeru kappa/lambda (< 0,26 alebo >1,65). Cieľ: Zistiť riziko progresie na souboru pacientov jedného centra zatiaľ nezařazeného do RMG registru (Registru monoklonálnych gamapatií ČR). Soubor pacientů: Provedly jsme retrospektivní analýzu 103 pacientů s MGUS diagnostikovaných mezi roky 1989-2014. V souboru bylo 31 mužů a 72 žen (0.4:1), průměrný věk v době stanovení diagnózy MGUS byl 63 let. Nejčastějším typem byl IgG kappa 44/103 (42,7%), IgG lambda 41/103 (39,8%), IgA kappa 7/103 (6,8%), IgA lambda 7/103 (6,8%), ostatní typy (biklonální gamapatie) 4/103 (3,9%). Medián hodnot hladiny paraproteínu byl 5,6 g/l (1-30) a medián doby sledování byl 54 měsíců (4-306). Výsledky: V souboru 103 pacientů došlo k progresi do mnohočetného myelomu u 7 pacientů (6,7%). Pouze 2 pacienti byli non IgG subtyp, naopak nejrizikovějším nálezem byla hladina paraproteínu. 75 pacientů mělo vstupně hladinu více než 15 g/l. U 2 pacientů (33%) byly nalezeny změny na 17. chromozomu (prognosticky negativní změna), naopak u 1 pacienta (17%) nález příznivý - t(11;14). Medián do progresie byl 53 měsíců (9-130). Vyhledávání rizikových faktorů je u pacientů s MGUS s důležitostí pro možnost predikce přechodu do MM a tím i časnějšího zahájení léčby. Křivky pravděpodobnosti přežití bez nemoci (PFS) byly zpracovány Kaplan-Meier metodikou.

P18/2681.

Hodnocení histomorfometrie u nemocných s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem

Minařík J., Überall I., Petrová P., Heřmanová Z., Puščíznová P., Hrbek J., Pika T., Bačovský J., Heřman M., Ščudla V. (Hemato-onkologická klinika LF UP a FN, Olomouc; Ústav patologie, LF UP a FN, Olomouc; Oddělení klinické biochemie, LF UP a FN, Olomouc; Ústav imunologie, LF UP a FN, Olomouc; Radiologická klinika, LF UP a FN, Olomouc)

Cíl: Cílem našeho hodnocení bylo posouzení histomorfometrických ukazatelů kostní dřeni u nemocných s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem. Pacienti a metody: Celkem byla hodnocena histomorfometrie u 37 nemocných s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem. Hodnoceny byly následující ukazatele: procento objemu kompakty ve vztahu k celé kosti (norma 20%), procento objemu kostních trámčů tvořené osteoidem - objem osteoidu (norma 2%), procento povrchu kostních trámčů kryté osteoidem (norma 20%), šířka kostních trabekul (norma 200um), počet osteoklastů na mm² (norma 0,2). Výsledné hodnoty byly korelovány se stěženými sérovými ukazateli kostního metabolismu - vápníku (Ca), fosforu (P), N-terminálního propeptidu prokolagenu typu I (PINP), karboxyterminálního telopeptidu kolagenu I (ICTP), Crosslaps (CTx), osteokalcinu (OCN), parathormonu (PTH), kalcitoninu (CAL), 25-hydroxyvitaminu D (D2), 1,25dihydroxyvitaminu D (D3), kostní frakce alkalické fosfatázy (bALP), sklerostinu (SCL) a matrix metaloproteinázy 9 (MMP9). Ke statistické analýze byl použit Mann-Whitney U-test na hladině statistické významnosti p<0,05. Výsledky: Celkem 16 vzorků nebylo z důvodu špatné kvality dále hodnotitelných. U zbýlých 21 vzorků přesahovala kompaktní norma v 10/21 případech (48%), objem osteoidu byl u všech jedinců v rozmezí normy, stejně jako procento povrchu kostních trámčů kryté osteoidem. U jednoho nemocného (5%) se současným selháním ledvin a sekundární hyperparathyreózou byla výrazně zvýšena šířka kostních trabekul. V 10/21 případech (48%) byl zaznamenán zvýšený počet osteoklastů na mm². Signifikantní rozdíl byl v rámci korelační analýzy zjištěn pouze u Ca (p=0,037), významně nižší hodnoty byly zjištěny ve skupině pacientů se zvýšeným % objemu kompakty (mediány 2,25 vs 2,37). Nebyla prokázána významná změna parametrů v souvislosti se zvýšeným počtem osteoklastů. Závěr: Histomorfometrie poskytuje u nemocných s mnohočetným myelomem především informaci o objemu kompakty a počtu osteoklastů na mm². Zavedená metodika nicméně neumožňovala při nedostatečné kvalitě vzorku relevantní zpracování téměř u poloviny vzorků. Získané ukazatele navíc neměly kromě inverzního vztahu objemu kompakty a sérového vápníku žádný jiný významný vztah k stěženým sérovým parametrům kostního metabolismu. Při hodnocení kostní nemoci bude zřejmě třeba upravit techniku odběru i histomorfometrického posuzování k dosažení validních výsledků použitelných v klinické praxi. S podporou grantu NT14393 a IGA-LF-2015-001

P19/2680.

Pilotní hodnocení korelace rozsahu kostního postižení u mnohočetného myelomu s panelem vybraných biomarkerů Oncology I

Minařík J., Kriegová E., Schneiderová P., Zapletalová J., Puščíznová P., Hrbek J., Heřmanová Z., Pika T., Bačovský J., Heřman M., Ščudla V. (Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc; Ústav imunologie, LF UP a FN, Olomouc; Ústav biofyziky a statistiky, LF UP a FN, Olomouc; Radiologická klinika, LF UP a FN, Olomouc)

Cíl: Cílem našeho hodnocení bylo prvotní posouzení vztahu rozsahu kostního postižení u nemocných s mnohočetným myelomem (MM) a monoklonální gamapatií nejistého významu (MGNV) s vybranými nádorovými ukazateli. Pacienti a metody: Celkem bylo posuzováno 92 ukazatelů z panelu Oncology I 96x96 (Olink, Uppsala, Sweden). Hodnocené ukazatele jsou známy vztahem k řadě nádorových onemocnení a souvisejí s angiogenezí, buněčnými signálními dráhami, kontrolou růstu a diferenciace, případně se zánětlivými stavy. K hodnocení byla pilotně použita technika Proximity Extension ImmunoAssay (PEA). Celkem bylo hodnoceno 25 nemocných s MM a 5 jedinců s MGNV, u všech byly paralelně posuzovány hladiny analytů v kostní dřeni i v séru. Byl analyzován vztah posuzovaných ukazatelů k aktivitě MM a zejména ve vztahu k rozsahu myelomové kostní nemoci (MKN). Ke statistickému zhodnocení byly použity následující metody: Mann-Whitney U-test, Kruskal-Wallis test a Spearmanova korelační analýza na hladině p<0,05 a Principal Component Analysis (GenEx, SSPS). Výsledky: U 58 analytů byly hodnoty v séru významně odlišné od nálezů

v kostní dřeni, u zbylých 34 analytů byly hodnoty obdobné. U 9 analytů byla sérová hladina ovlivněna přítomností renální insuficience (ve 3 případech byly rozdíly signifikantní, v ostatních 6 na hranici statistické významnosti). Z celkového počtu jsme našli 19 ukazatelů, které měly signifikantní rozdíly u MGNV a MM. Některé z parametrů korelovaly se stádiem onemocnění jak dle Durie-Salmona (D-S), tak dle mezinárodního prognostického indexu (ISS). Korelace byly nalezeny i ve vztahu k typu a hladině M-proteinu a volných lehkých řetězců (VLŘ). S rozsahem MKN korelovaly ze sérových ukazatelů C-C motif chemokine 19 (CCL-19), Fms-related tyrosine kinase 3 ligand (Flt3-L), amphiregulin (AR), epididymal secretory protein E4 (HE4) a C-X-C motif chemokine 13 (CXCL13), z dřevých ukazatelů pak AR, HE4, CXCL13, CD40 ligand (CD40L), kallikrein 11 (hK11), C-C motif chemokine 19 (CCL19), early activation antigen CD69 (CD69) a vimentin (VIM). Závěr: Metodika PEA je velmi citlivá a umožňuje posuzovat analyty s velkým dynamickým rozsahem včetně hodnot mimo rozsah kalibračních křivky. U 9 parametrů byly sérové hladiny ovlivněny renální insuficiencí. I přes malý rozsah souboru bylo možné vytipovat perspektivní ukazatele se vztahem k aktivitě mnohočetného myelomu, jeho vnitřním vlastnostem i k rozsahu kostního postižení. Za podpory grantu NT14393a IGA-LF-2015-001.

P20/2679.

Srovnání hladin sérového sklerostinu a matrix metaloproteinázy 9 u mnohočetného myelomu a monoklonální gamapatie nejistého významu

Minařík J., Heřmanová Z., Petrová P., Hrbek J., Zapletalová J., Puščíznová P., Píka T., Bačovský J., Heřman M., Študla V. (Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc; Oddělení klinické imunologie, LF UP a FN, Olomouc; Oddělení klinické biochemie, LF UP a FN, Olomouc; Radiologická klinika, LF UP a FN, Olomouc; Ústav biofyziky a statistiky, LF UP a FN, Olomouc)

Cíl: Cílem našeho prospektivního hodnocení bylo srovnání vybraných ukazatelů kostního metabolismu při hodnocení rozsahu myelomové kostní nemoci (MKN) u nemocných s mnohočetným myelomem (MM) a monoklonální gamapatii nejistého významu (MGNV). **Pacienti a metody:** V souboru 108 jedinců (28 jedinců s MGNV, 12 jedinců s doutnajícímm MM a 68 nemocných s aktivním MM) jsme srovnávali hladiny nových ukazatelů obratu kostního metabolismu, sklerostinu (SCL) a matrix metaloproteinázy 9 (MMP9). Hodnocení SCL bylo provedeno pomocí metody enzymové imunoeseje (ELISA) na analyzátoru EVOLIS od firmy Bio-Rad, MMP9 byla hodnocena soupravou Human MMP-9 Platinum ELISA. Rozsah kostního postižení byl hodnocen pomocí konvenční radiografie (RTG), magnetické rezonance (WB-MR) a nízkodávkové výpočetní tomografie (LD-CT). Byly posuzovány rozdíly v sérových hladinách SCL a MMP9 u nemocných s doutnajícímm a aktivním MM a u MGNV a ve vztahu ke stádiu MM a k přítomnosti extramedulárního postižení. Hodnoty SCL a MMP9 byly korelovány s ostatními ukazateli kostního metabolismu – sérovou hladinou vápníku (Ca), fosforu (P), N-terminálního propeptidu prokolagenu-I (PINP), karboxyterminálního telopeptidu kolagenu typu I (ICTP), crosslaps (CTX), osteocalcinu (OC), parathormonu (PTH), kalcitoninu (C), 25-hydroxyvitaminu D (D2), 1,25 dihydroxyvitaminu D (D3) a kostní frakce alkalické fosfatázy (bALP). Ke statistickému posouzení bylo použito Mann-Whitneyho U-testu, Kruskal-Wallisova testu a Spearmanovy korelační analýzy, na hladině statistické významnosti $p < 0,05$. **Výsledky:** Mann-Whitneyho U test neprokázal u MMP9 ani SCL signifikantní rozdíl mezi soubory MGUS a MM. Kruskal-Wallisův test neprokázal signifikantní rozdíly mezi MGUS, MM aktivním, MM doutnajícímm, MM v relapsu a MM v remisi. Nebyla prokázána signifikantní závislost mezi MMP9, SCL a stádiem onemocnění. Nebyl prokázán vztah mezi rozsahem postižení skeletu ani extramedulárním postižením a MMP9 nebo SCL. Spearmanova korelační analýza prokázala slabou pozitivní korelaci mezi MMP9 a Ca ($r=0,197$; $p=0,041$), mezi SCL a P ($r=0,203$; $p=0,035$), mezi SCL a ICTP ($r=0,263$; $p=0,011$) a slabou negativní korelaci mezi SCL a ALPb ($r=-0,247$; $p=0,013$). **Závěry:** Hodnoty MMP9 a sklerostinu slabě korelují s některými vybranými ukazateli kostního metabolismu. V posuzovaném souboru ale neměly zřejmý vztah k aktivitě onemocnění, velikosti nádorové masy ani k rozsahu myelomové kostní nemoci hodnocené pomocí RTG, WB-MR a LD-CT. Za podpory grantu NT14393a IGA-LF-2015-001.

P21/2669.

Raritní imunofenotypy u mnohočetného myelomu

Novák M., Píka T., Minařík J., Bačovský J., Študla V. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Prezentujeme tři případy mnohočetného myelomu s raritními imunofenotypy, identifikované v Laboratoři průtokové cytometrie HOK FN/LF Olomouc. Prvním případem je muž F.K. (1950) s typizačním nálezem 1,78% plazmocytů v kostní dřeni, z nichž 90,3% neslo imunofenotyp CD38+CD138+CD56-CD19+ kappa chain. Kombinace markerů CD56-CD19+ je typická pro fyziologické plazmocyty a její výskyt na patologické populaci je možno považovat za extrémně raritní. Druhým nemocnou je žena MB (1944) s nálezem 8,79% plazmocytů v kostní dřeni, 23% z nich exprimuje imunofenotyp CD38+CD138-CD56+CD19+CD28+CD117+ kappa chain. Marker CD138 spolu s CD38 definuje plazmocyty, analytické protokoly průtokové cytometrie pro detekci monoklonálních gamapatií bývají nastaveny na gatování populace CD38+CD138+, což může ve výjimečných případech jako je tento vést k falešné negativitě. V obou těchto případech se jednalo o pozdní refrakterní/rezistentní fázi onemocnění spojenou s dediferenciací nádorové populace Třetím případem je muž MD (1926) s přítomností 21,7% plazmocytů v kostní dřeni. 97% plazmatických buněk nese imunofenotyp CD38-CD138+CD56+CD19- lambda chain. Aberantní imunofenotyp byl spojen s iniciálním pokročilým postižením a s renálním selháním, morfologicky plazmablastický typ. Ve všech třech případech se jedná o agresivní formy onemocnění s raritními imunofenotypy, které buď exprimují markery fyziologických plazmocytů, nebo postrádají některý ze znaků definujících plazmocyty. Laboratorní diagnostika bez důkladné analýzy metodami mnohobarevné průtokové cytometrie, zahrnující znaky identifikující plazmocyty, markery patologického imunofenotypu a klonalitu lehkých řetězců v jedné zkumavce, může v takto atypických případech vést k problémům s identifikací maligních buněk. Výzkum byl financován z prostředků grantu IGA MZ ČR r.č. NT12451.

AKUTNÍ LEUKEMIE

P22/2707.

Sledování minimální reziduální nemoci pomocí MLL-PTD u pacientů s AML

Hrochová K., Chmelařová M., Lánská M., Višková A., Plíšková L. (ÚKBD, Fakultní nemocnice, Hradec Králové; IV. interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové; GeneriBiotech)

Akutní myeloidní leukémie dospělých (AML) je klonální maligní onemocnění hematopoetické tkáně, charakterizované akumulací abnormálních (leukemických) blastů a porušenou tvorbou normálních buněk krvetvorby. Mechanismus neoplastické transformace není detailně objasněn. Jde nejspíše o více na sebe navazujících kroků, během nichž zřejmě leukemický klon vzniká v kostní dřeni a je následně vyplavován do periferní krve. Genetické změny nádorových buněk mají rozhodující význam v určení prognózy AML ve smyslu šance na dosažení léčebné odpovědi a sledování minimální reziduální nemoci (MRN). Jedním z markerů vhodných pro sledování MRN je i přítomnost MLL-PTD (mixed lineage leukemia – parciální tandemové duplikace). Pro MLL-PTD přestavbu je charakteristické zachování všech proteinových domén kódovaných MLL protoonkogenem. Přítomnost MLL-PTD u pacientů s AML je obecně spojována s velmi špatnou prognózou. Ve spolupráci v firmou GeneriBiotech se nám podařilo vyvinout assaye pro sledování exprese MLL-PTD. Tyto assaye umožňují analýzu nejčastěji se vyskytujících zlomů (e9e3, e10e3, e11e3). Celkově jsme vyšetřili 45 pacientů v době diagnózy, z nichž jsme u 4 pacientů prokázali MLL-PTD. U těchto pacientů je dále sledována MRN pomocí navržených assayů. U jednoho pacienta jsme prokázali počátek relapsu již 3 měsíce před změnou imunofenotypizace. Tato metodika je citlivá, reprodukovatelná, jednoduchá a vhodná pro rutinní sledování MRD.

MDS

P24/2759.

Morfologické nálezy u pacientů s MDS - kasuistiky

Zuchnická J. (Klinika hematologie FN Ostrava a LF Ostravské univerzity, Ostrava)

Myelodysplastický syndrom (MDS) je skupina klonálních hematopoetických onemocnění charakterizovaných inefektivní hematopoézou a dysplazií jedné nebo více krvetvorných linií. Diagnóza MDS se opírá z podstatné části o morfologický nále v nátěru periferní krve a kostní dřeni. Hodnocení nálezů pacientů s MDS provádíme podle aktuální WHO klasifikace, která je založena na procentuálním zastoupení blastů v kostní dřeni a periferní krvi, typu a stupni dysplazie a přítomnosti prstenčitých

sideroblastů. Kromě morfoloického nálezu přináší další důležité informace histologické vyšetření kostní dřene, cytogenetické a molekulárně genetické vyšetření. Ve vlastním sdělení prezentujeme hodnocení nátěrů periferní krve a kostní dřene několika pacientů - jako kasuistiky s názornou obrazovou dokumentací (fotografie z mikroskopu), zachycení charakteristických morfoloických změn v jednotlivých krvetvorných liniích, zařazení MDS dle WHO klasifikace. Příklady pacientů se sekundární myelodysplazií.

P25/2711.

Role DNA reparačních mechanismů v patogenezi myelodysplastického syndromu

Válka J., Beličková M., Veselá J., Stará E., Planetová B., Jonášová A., Čermák J. (Ústav hematologie a krevní transfuze (UHKT), Praha; I. interní klinika – klinika hematologie VFN a 1. LF UK, Praha)

PŘEDPOKLADY A CÍLE: Nedávné studie ukázaly přítomnost mutací DNA u většiny případů myelodysplastického syndromu (MDS). To naznačuje, že abnormální mechanismus DNA reparace může představovat jak příčinu, tak následek maligní transformace. V naší práci zkoumáme možnou roli změn DNA reparačních genů v patogenezi MDS. **METODY:** Expresí genů v CD34+ buňkách byla měřena pomocí RT Profiler PCR Array (Qiagen). Polymorfismy a mutace byly studovány metodou cíleného sekvenování nové generace. Expresní analýza 84 vybraných DNA reparačních genů byla provedena na vzorku 18 MDS pacientů a následná analýza vybraných genů pak na kohortě 80 pacientů. Exomová sekvenace 84 DNA reparačních genů byla provedena u 16 pacientů. **VÝSLEDKY:** Srovnáním genové exprese mezi CD34+ buňkami pacientů a kontrol byly identifikovány čtyři odlišně exprimované DNA reparační geny ($p < 0,05$). Snížená exprese byla zjištěna v genech RAD51, RPA3 a XRCC2, zvýšená exprese byla zjištěna v genu MPG. Gen RAD51 vykazoval ve srovnání s kontrolní skupinou vyšší expresi u pacientů s níže rizikovými formami MDS ($p = 0,0004$) a naopak snížená exprese byla detekována u vysoce rizikových MDS pacientů ($p = 0,0002$). Skupina pacientů s RCMD vykazovala expresi srovnatelnou s kontrolní skupinou. Expresní profil genu XRCC2 měl podobnou charakteristiku jako profil genu RAD51. U genu RPA3 byla exprese signifikantně snížena bez ohledu na formu MDS ($p < 0,0001$), přitom zůstal zachován trend postupného snižování exprese s rostoucí závažností MDS ($p < 0,0001$). Exomová sekvenace odhalila šest polymorfismů (SNP) signifikantně asociovaných s citlivostí k onemocnění: rs4135113 (gen TDG, OR 4,41, $p = 0,03$), rs12917 (MGMT, OR 3,33, $p = 0,003$), rs2230641 (CCNH, OR 2,35, $p = 0,01$), rs2228529 a rs2228526 (ERCC6, OR 2,06, $p = 0,04$, respektive 2,15, $p = 0,03$), rs1799977 (MLH1, OR 1,86, $p = 0,04$). Při rozdělení pacientů dle cytogenetiky jsme pozorovali významné zvýšení závislosti těchto polymorfismů s přítomností MDS u pacientů s vysoce rizikovou cytogenetikou (OR 4,1-9,7, $p < 0,0001$). **ZÁVĚRY:** Naše práce demonstruje, že změněná exprese reparačních genů v CD34+ buňkách může být zodpovědná za tvorbu a hromadění mutací u hematologických malignit. Dále jsme identifikovali genetické varianty, které mohou přispívat k patogenezi MDS zvýšením individuálního rizika nemoci. Podpořeno granty (NT/13899, NT/14377, a NT/14539) a projektem Ministerstva zdravotnictví České republiky pro koncepční rozvoj vědeckých organizací (00023736).

P26/2818.

Výskyt méně častých chromosomových aberací u nemocných s MDS

Holzerová M., Balcárková J., Mikešová M., Krůzová L., Prekopová I., Kropáčková J., Hanzlíková J., Rohoň P., Pikalová Z., Indrák K., Papajík T., Jarošová M. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Myelodysplastický syndrom (MDS) je klonální onemocnění pluripotentní kmenové buňky, charakterizované klinickou, biologickou i morfoloickou heterogenitou. Chromosomové aberace se vyskytují u 30-50 % primárních MDS a společně s morfoloickými parametry jsou součástí mezinárodního prognostického skórovacího systému (IPSS). Pro určení chromosomových aberací se rutinně používá klasické cytogenetické vyšetření kostní dřene a metoda fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Doporučený základní FISH panel určuje ztráty genetického materiálu na chromosomech 5q, 7q, 20q a zmožnění chromosomu 8. V letech 2000-2014 jsme vyšetřili celkem 193 nově diagnostikovaných nemocných s MDS, 105 mužů, 88 žen, s mediánem věku v době vyšetření 65 let. Celkem 32 nemocných bylo vyšetřeno opakovaně v souvislosti s progresí onemocnění. Cy-

togenetické vyšetření bylo úspěšné u 187 nemocných. Normální karyotyp byl nalezen u 93 (49,7 %) nemocných, zatímco chromosomové změny u 94 (50,3 %) nemocných. Metodou FISH bylo vyšetřeno 161 nemocných a změny s použitím panelu MDS sond byly prokázány u 79 (50 %) nemocných. Na základě cytogenetického nálezu, který byl doplněn dalším vyšetřením pomocí FISH a mFISH, byly u 17 nemocných určeny nové, panelem neurčené změny. Celkem u 38 nemocných s alespoň jednou změnou detekovanou panelem pro MDS byly prokázány další, přídatné změny. V práci budeme detailně analyzovat méně časté chromosomové změny u MDS pacientů a vyhodnotíme některé klinické parametry těchto nemocných. Práce je podporována grantem IGA_LF_2015_001.

P27/2683.

Využití I-FISH k molekulárně cytogenetické analýze CD34+ buněk získaných z periferní krve nemocných s MDS.

Ransdorfová Š., Březinová J., Šárová I., Beličková M., Jonášová A., Neuwirthová R., Zemanová Z., Čermák J., Michalová K. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK, Praha; 1. interní klinika - klinika hematologie VFN a 1. LF UK, Praha)

Klasická cytogenetická analýza buněk kostní dřene je standardem pro vyšetření pacientů s myelodysplastickými syndromy (MDS). Existuje však několik faktorů nepříznivě ovlivňujících úspěšnost této metody, jako je míra buněčné proliferace, kvalita preparátů, velikost patologického klonu. V těchto případech lze využít interfázni fluorescenční in situ hybridizaci (I-FISH), která umožňuje detekovat chromosomové aberace i v jádrech nedělících se buněk. V této studii jsme proto využili metodu I-FISH pro analýzu chromosomových aberací v CD34+ buňkách cirkulujících v periferní krvi. Naším cílem bylo zhodnotit frekvenci chromosomových aberací v CD34+ buňkách izolovaných z periferní krve, porovnat ji s výsledky I-FISH analýz buněk kostní dřene a posoudit možnost využití této metody k monitorování úspěšnosti terapie u nemocných s MDS. Vyšetřili jsme celkem dvacet vzorků CD34+ buněk separovaných z periferní krve čtrnácti pacientů s MDS (1 muž, 13 žen; 11x 5q- syndrom, 2x RAEB a 1x MDS/MPS). Šest pacientů bylo vyšetřeno opakovaně. CD34+ buňky byly izolovány za pomoci Auto MACS separátoru (firma Miltenyi Biotec, GmbH) z mononukleárních buněk, které jsme získali gradientovou centrifugací periferní krve. Sondy pro I-FISH byly vybrány na základě výsledků molekulárně cytogenetického vyšetření buněk kostní dřene. Použili jsme přímo značené lokusy specifické komerčně dodávané sondy LSI 5q31, ON 5q31/5q33/5p15 a ON 20q11q12 (Abbott Molecular, Kreatech) a postupovali dle protokolů doporučených výrobcem. Metoda I-FISH na separovaných CD 34+ buňkách potvrdila předchozí nálezy v kostní dřeni u všech vyšetřených pacientů - 13 nemocných mělo delecí v oblasti 5q31, u jednoho byla zjištěna delecí chromozomu 20 v oblasti 20q11q12. Zastoupení patologických klonů v obou typech buněk byl shodný a odpovídal aktuálnímu klinickému stavu nemocných. Naše studie potvrdila, že výsledky I-FISH analýz CD34+ buněk získaných z periferní krve jsou v souladu s výsledky analýz buněk kostní dřene. Popsaná metoda izolace CD34+ buněk a následná I-FISH analýza je praktická, neinvazivní, má vypovídající hodnotu a reprezentuje patologické klony přítomné v kostní dřeni. Metodu lze s výhodou využít pro průběžnou kontrolu onemocnění a ke sledování dynamiky patologického klonu po léčbě. Podpořeno granty Ministerstva zdravotnictví koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00023736, RVO-VFN64165 a GAČR P302/12/G157.

P28/2668.

Kongenitální dyserytropeická anémie typu II (CDAIL) s unikátní mutací SEC23B a těžkou neonatální prezentací u dvou sourozenců

Lejhancová K., Malý J., Schwarz K., Špaček J., Lukeš A., Heimpel H. † (Dětská klinika, FN, Hradec Králové – Czech Republic; Department of Transfusion and Immunogenetics, University of Ulm – Germany; Fingerlandův Ústav Patologické anatomie, FN, Hradec Králové; Department of Internal medicine II, University of Ulm, Germany)

Úvod: Kongenitální dyserytropeická anémie typu II (CDAIL) je charakterizována inefektivní erytropoézou s dysplazií erytroidních prekursorů s binuklearitou. Klinicky jde většinou o mírnou chronickou hemolýzu. Velmi raritní je manifestace nemoci v podobě neonatálního hydropsu s těžkou anémií. Kauzálně je CDAIL spojena s mutací v genu SEC23B. Kasuistika: Dva sourozenci se

narodili v odstupu u 5 let s obrazem neonatální hydrpsu s těžkou anémií, extramedulární hematopeesou a hypertrofickou karydiomyopatií. První dívka zemřela 9. den po narození. Vstupní hemoglobin (Hb) byl 47g/l. Kostní dřev byla velmi chudá, ojediněle byly zastiženy dvoujaderné normoblasty. Přesná diagnosa nebyla za života ani post mortem stanovená. Druhá dívka se narodila o 5 let později stejným rodičům, pod stejným klinickým obrazem. Vstupní Hb byl 76g/l. Kostní dřev 3. den života byla pro nedostatek buněk prakticky nehodnotitelná. Dívka při intenzivní podpůrné péči přežila, v klinickém obrazu postupně dominovala anemie závislá na transfuzích a postupně regredující kardiomyopatie. V kostní dřevě ve 3 měsících věku bylo přítomno 25% binukleárních normoblastů, což vedlo k suspekci na CDAll. Diagnosa byla potvrzená průkazem dvojité heterozygotní mutace v genu SEC23B: c.53G>A (p.Arg18His); c.222-817_366+5241del9570(p.Arg75Glufs*7). V obou případech se jedná o nové genetické varianty SEC23B. Od 14 měsíců věku se významně snížila potřeba transfuzí, Hb se pohybuje mezi 80-90g/l, ferritin je 950 ng/ml. Postupně regreduje kardiomyopatie a psychomotorický vývoj je ve 3 letech zcela v normě. Identická dvojitá heterozygotie byla zpětně prokázána u zemřelé sestry. U obou zdravých rodičů byla potvrzena přítomnost jednoduché heterozygotní mutace v genu SEC23B. Závěr: Jedná se celosvětově o 3.a 4. pacienta s CDAll prezentující se kongenitálním hydropsem s prokázanou složenou heterozygotní mutací SEC23B. Genetické varianty našich pacientů dosud v rámci mutačního spektra SEC23B popsány nebyly.

P29/2782.

Dlouhodobý efekt a pozdní následky imunosupresivní léčby Antithymocytárním globulinem a cyklosporinem A u dětských pacientů s aplastickou anémií

Suková M., Mejstříková E., Smíšek P., Keslová P., Pospíšilová D., Čermák J., Zapletal O., Sedláček P., Starý J. (Klinika dětské hematologie a onkologie, 2.LF UK a FN Motol, Praha; CLIP a KDHO 2.LF UK a FN Motol, Praha; Dětská klinika, Fakultní nemocnice, Univerzita Palackého, Olomouc; ÚHK, Praha; Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice, Brno)

Imunosupresivní léčba (IST) kombinující antithymocytární globulin (ATG) a cyklosporin A (CsA) je standardní léčebnou modalitou u dětí s aplastickou anémií (AA), kteří nemají HLA identického sourozence pro preferenční alogenní transplantaci kmenových buněk. V mezinárodních pediatrických studiích je přežití po IST (>80%) srovnatelné s efektem MSD-SCT. Z dlouhodobého pohledu je účinnost IST limitována jednak nespolehlivou primární odpovědí (70%), jednak vysokým výskytem relapsů (30%) a rizikem klonálního vývoje - MDS/AML (10%) a PNH (10-20%). Dosud existuje jen minimum informací o pozdních následcích IST, systematická prospektivní studie nebyla publikována. V ČR bylo v letech 1991-2010 diagnostikováno 103 dětí s AA, z nichž 76 bylo stratifikováno k IST. V tomto souboru byla provedena prospektivní analýza s cílem stanovení rizika klonálního vývoje a pozdních následků léčby. Celkové přežití po 10 letech bylo 88.5 ± 3.5%, EFS: 55.1 ± 6%, primární odpověď 79% a kumulativní výskyt relapsů 32%. 11 dětí podstoupilo z důvodu nonresponse nebo relapsu 2.kúru ATG s účinností 45%, 16 bylo indikováno k SCT od alternativního dárce, s pravděpodobností 5-letého přežití 86%. 12 z 59 responderů (22%) zůstalo závislých na CsA. Analýza klonálního vývoje a pozdních následků IST byla provedena ve skupině dlouhodobě přežívajících bez SCT (n=59). Depistáž PNH byla prováděna kombinací plošné a prospektivní analýzy a vyšetření PNH klonu v periferní krvi metodou průtokové cytometrie. Klonální vývoj byl zachycen u 9 (18%) hodnocených pacientů, oproti předpokladům byla PNH v 5 případech symptomatická (hemolytická/trombotická forma) a žádný pacient nevyvinul MDS/AML. Kumulativní incidence PNH byla 11.8% a 20.5% v intervalu 10 a 15 let od IST. Ve skupině dlouhodobě přežívajících (n=48) je při mediánu sledování 11,2 roku 46% pacientů bez zdravotních obtíží, u 5(10%) je pozorována zvýšená nemocnost, u 12 (25%) hypertenze a 3 (6%) metabolický syndrom. Ve skupině dospělých není dokumentována žádná porucha gonadálních funkcí nebo významná psychosociální alterace. IST představuje efektivní léčebnou alternativu u dětí s aplastickou anémií s akceptovatelnou toxicitou a kurativním potenciálem. Z pohledu dlouhodobých následků IST je významné zejména riziko vývoje PNH, přesahující 10-letý interval od léčby. Pozdní následky ve smyslu morbidity a alterace kvality života jsou ve srovnání se skupinou pacientů po SCT nevýznamné. Podpořeno MZ-ČR-RVO FN v Motole 00064203 a IGA NT14534-3

P30/2764.

Prevalence mutace v transkripčním faktoru GATA-2 u dětí s myelodysplastickým syndromem v České republice

Nováková M., Žaliová M., Froňková E., Wlodarski M. W., Janda A., Suková M., Zemanová Z., Campr V., Zapletal O., Kuhn T., Pospíšilová D., Lejhancová K., Vodičková E., Trka J., Starý J., Hrušák O., Mejstříková E. (CLIP-Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2.LF a FN Motol, Praha – Czech Republic; Center for Pediatric and Adolescent Medicine, University Medical Center Freiburg, Freiburg im Breisgau – Germany; Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1.LF UK v Praze, Praha; Ústav patologie a molekulární medicíny UK 2.LF a FN Motol, Praha; Oddělení dětské hematologie, Dětská nemocnice, FN Brno, Brno; Oddělení dětské hematologie a hematookologie, FN Ostrava, Ostrava; Dětská klinika LF UP a FN v Olomouci, Olomouc; Dětská klinika, FN Hradec Králové, Hradec Králové - Czech Republic)

Úvod. Mutace v genu pro transkripční faktor GATA-2 byla identifikována u pacientů s imunodeficitem, familiárním a sporadickým myelodysplastickým syndromem (MDS) a lymfédémem. Představuje v současnosti nejčastější známý genetický podklad vzniku MDS u dětí. Prevalence mutace nebyla dosud u dětí s MDS či aplastickou anémií (AA) studována. Naším cílem bylo stanovit výskyt této mutace v kohortě dětských pacientů s MDS a AA v ČR. Pacienti a metody. Od roku 1998 bylo diagnostikováno 25 dětí s primární formou refrakterní anémie s excesem blastů (RAEB) či RAEB v transformaci (RAEBt). Diagnostický algoritmus pro odlišení refrakterní cytopenie u dětí (RCC) a AA zahrnující histopatologické hodnocení biopsie kostní dřevě (KD) byl zaveden v roce 2005, do analýzy proto byli zahrnuti pacienti diagnostikovaní 2005-2014: celkem 32 RCC a 41 AA pacientů. Kódující část genu GATA2 včetně intronického enhancer regionu byla vyšetřena u pacientů s dostupným materiálem (22 RAEB/RAEBt, 31 RCC a 38 AA). Vzorky KD a periferní krve (PK) byly dále vyšetřeny pomocí průtokové cytometrie. Stanovena byla hladina excizních kroužků buněčného receptoru B (KREC) a T lymfocytů (TREC). Výsledky. Mutace v GATA2 byla nalezena u 9 pacientů s MDS: 3 RAEB/RAEBt a 6 RCC pacientů, žádný pacient s AA mutaci neměl. U pacientů s GATA2 mutací byly často přítomny cytogenetické abnormality: monosomie 7 (N=7), trisomie 8 (N=1) a simultánní přítomnost monosomie 7 a trisomie 8 (N=1). Jedna pacientka neměla cytogenetické změny, avšak její otec zemřel na MDS s monosomií 7. Frekvence GATA2 mutace byla 41% mezi všemi pacienty s monosomií 7 a 29% mezi pacienty s trisomií 8. V rámci pacientů s monosomií 7 se pacienti s GATA2 mutací odlišovali tendencí k nižšímu zastoupení B lymfocytů v KD a nižší hladinou KREC v PK. Při vyšetření Guthrieho kartiček od 4 pacientů s GATA2 mutací byla hladina KREC téměř normální (N=3), pouze 1 pacient měl nízkou hladinu při narození: tento pacient byl diagnostikován s MDS ve 4 letech a je nejmladším pacientem v naší kohortě. Dva pacienti s GATA2 mutací zemřeli, příčinou byla CMV pneumonie (N=1) a progresivní onemocnění do AML s imunofenotypovým posunem blastů do B prekurzorové leukémie (N=1). Závěr. Prevalence mutace GATA2 u dětí je 19% v rámci RCC, 14% v rámci RAEB/RAEBt a 0% v rámci AA. Skutečný výskyt však může být vyšší, protože je vyšetřována pouze část regulační části genu. Mutace může být prokázána i u pacientů bez cytogenetické abnormality. GAUK 802214, IGA NT/14534-3, UNCE 204012

MALIGNÍ LYMFOMY

P31/2762.

Double hit lymfóm

Svoren Z., Albertová K., Džubasová M., Žákovcová A., Čermák M., Janíková P., Štuková M., Balúchová K., Copáková L. (NOÚ, Bratislava - SK)

Double hit lymfómy (DHL) tvoria špecifickú skupinu veľmi agresívnych B-lymfómov s prekrývajúcimi sa črtami medzi difúznym veľkobunkovým B-lymfómom (DLBCL) a Burkittovým lymfómom (BL). Pre double hit lymfómy je typická prestavba génu MYC (8q34) v kombinácii s inými prestavbami génov typickými pre lymfómy (BCL2, BCL6 alebo CCND1). Najčastejší typ DHL nesie súčasne aberáciu génov MYC aj BCL2 a predstavuje asi 2/3 všetkých prípadov. DHL sa vyznačujú pravidla komplexnými zmenami karyotypu a sú vysoko agresívne s veľmi nepriaznivou prognózou (medián prežívania < 1rok). U 51 ročnej ženy bol diagnostikovaný susp. lymfóm, rýchlo rastúci BL, prípadne

iný agresívny NHL. Prietokovou cytometriou bolo zistené že sa jedná pravdepodobne o preB-ALL, nemožno však vylúčiť zrele B-ALL. Morfológiu a imunohistochemiou bol daný predbežný záver, že opísaný obraz zodpovedá vysoko agresívnej B-bunkovej neoplázii zo spektra B-ALL/B-LBL alebo o double hit lymfóm. Cytogenetická analýza preukázala translokáciu t(8;14) a súčasne t(14;18) (prestavbu génov MYC a BCL2) spolu s komplexnými zmenami karyotypu. Na základe týchto výsledkov je možné vidieť náročnosť diagnostiky DHL ako aj nevyhnutnosť participácie jednotlivých vyšetrujúcich metód na určení presnej diagnózy.

P32/2756.

Molekulárne-cytogenetická analýza souboru nemocných s difúznym veľkobuněčným B-lymfómom

Mikešová M., Holzerová M., Krůžová L., Procházková V., Prouzová Z., Flodr P., Papajík T., Jarošová M. (Hemato-onkologická klinika FN a LF, Olomouc; laboratoř cytogenetiky, Hemato-onkologická klinika FN a LF, Olomouc; Ústav klinické a molekulární patologie FN a LF, Olomouc)

Difúzní veľkobuněčný B-lymfóm (DLBCL) je nejčastějším typem lymfomu dospělého věku. Jedná se o velmi heterogenní onemocnění a to jak z hlediska klinického, tak biologického. Biologická heterogenita DLBCL se odráží v širokém spektru genetických změn. Nejčastější změnou je přestavba genu BCL6 (3q27), často jsou také pozorovány změny genů MYC (8q24), TP53 (17p13), BCL2 (18q21) nebo delece oblastí 6q. Cílem studie bylo pomocí metod molekulární cytogenetiky analyzovat soubor nemocných s DLBCL, určit typy a frekvence genetických změn a výsledky porovnat s imunohistochemickými (IHC) podskupinami CG-like a non-CG-like DLBCL. Vyšetřovaný soubor tvořilo 58 pacientů diagnostikovaných na Hemato-onkologické klinice FN v Olomouci v letech 1997-2014. Soubor tvořilo 30 mužů a 28 žen, medián věku 61 let. Primární onemocnění mělo 49 pacientů, 9 pacientů mělo sekundární DLBCL. Metodou FISH byly vyšetřeny změny genů BCL6 (3q27), MYC (8q24) a BLIMP1 (6q21), metodou mFISH byli vyšetřeni nemocní s komplexními změnami. Metoda aCGH byla použita u nemocných, u kterých byla získána kvalitní nádorová DNA. Genetické změny byly nalezeny u 43 (73 %) DLBCL pacientů. Metodou FISH byla translokace genu BCL6 pozorována u 9/49 (18 %) pacientů. Translokační partner se nacházel na chromosomech: 2 (IgK), 10, 12 a 14 (IgH). Celkem u 14/54 (16 %) pacientů bylo pozorováno zmožením signálů pro gen MYC. Přestavba genu MYC v našem souboru prokázána nebyla. Delece genu BLIMP1 byla nalezena u 8/46 (17 %) pacientů a byla vždy součástí komplexních změn karyotypu. Metodou mFISH jsme analyzovali 24 pacientů s komplexním karyotypem a vyhodnotili jsme, že nejčastěji vstupují do přestavby chromosomy 1, 3, 6, 9, 10, 14 a 18. Metodou aCGH bylo vyšetřeno 39 pacientů a změny byly určeny u 26 (67 %) pacientů. Zmožením genetického materiálu se nejčastěji vyskytovalo v oblastech 1q, 6p, 7 a 13q a ztráty se vyskytovaly v oblastech 6p, 6q a 17p. Srovnání IHC prognostických podskupin s cytogenetickými nálezy ukázalo, že skupina GCB-DLBCL je častěji spojena s přestavbou chromosomů 14 a 18 a BCL2/IgH pozitivitou, zatímco ve skupině nonGCB-DLBCL to jsou chromosomy 3, 6, 7, 9, 10 a X, které nejčastěji vstupují do přestavby. Analýza potvrdila heterogenitu genetických změn a význam těchto metod pro určení prognostických podskupin DLBCL. Práce je podporována grantem IGA-LF-2015-001.

P33/2755.

Zavedení detekce somatických mutací v genech MYD88 a CXCR4 z periferní krve u pacientů s Waldenströmovou makroglobulinémií a IgM MGUS

Kuřová Z., Sedlaříková L., Bešše L., Kaščák M., Jelinek T., Ševčíková S., Penka M., Adam Z., Kryukov F., Hájek R. (Klinika hematologie, Fakultní nemocnice Ostrava; Katedra interních oborů, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě; Babáková myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita, Brno; Klinika hematologie, Fakultní nemocnice, Ostrava; Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice, Brno; Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Brno)

Waldenströmova makroglobulinémií (WM) řadíme mezi raritní low-grade lymfomy. WM je charakterizovaná infiltrací lymfoplazmatických buněk v kostní dřeni (BM) a přítomností monoklonálního imunoglobulinu IgM v séru. Jedny z důležitých faktorů WM, které mají diagnostickou a prognostickou hodnotu jsou somatické mutace v genech MYD88 a CXCR4. Mutace v genu MYD88 je přítomná

v BM a zároveň v periferní krvi (PB) s konkordancí blížící se 100%. Pro vyšetření těchto mutací ze vzorků (PB) v rutinní praxi je třeba zavést standardizovanou metodu, která by byla dostatečně citlivá, jednoduchá a levná. Cílem tohoto projektu bylo standardizovat metodu alelově-specifické PCR (AS-PCR), která se zda být optimální pro potřeby vyšetření somatických mutací v genech MYD88 a CXCR4 ze vzorků PB, a její zavedení do rutinní praxe. Materiál a metody: Analýza byla provedena celkem u 31 nově diagnostikovaných i relabovaných pacientů(30/1), (13 WM a 18 IgM MGUS). Analýza mutace MYD88 (L265P) byla provedena u vzorků genomové DNA (gDNA) mononukleárních buněk PB (PBMCs). Purifikovaný PCR produkt byl dále sekvenován. Zároveň byla provedena citlivější AS-PCR analýza mutací v genu CXCR4 následovně: lokus genu CXCR4 byl amplifikován pomocí specifických primerů a dále purifikován a sekvenován jako v případě mutace MYD88. Navíc byla pomocí kvantitativní real-time AS-PCR analyzována mutace CXCR4 (C1013G), Analýza byla dále provedena u 7 vzorků z plně PB a u 5 vzorků z plně BM pro případné srovnání výsledků. Výsledky: Analýza mutací v genu MYD88 (L265P) ze vzorků gDNA PBMCs odhalila 46 % (6/13) WM pacientů jako pozitivních. U IgM-MGUS vzorků byl záchyt mutací 5 % (1/18). Mutace CXCR4 (C1013G) se objevila pouze u 1 vzorku WM (1/13) a u jednoho vzorku IgM-MGUS (1/18). Vzorky plně krve a kostní dřeni potvrdily výsledky získané z analýzy mutací gDNA z PBMCs. Závěr: AS-PCR se jeví jako vhodná metoda pro detekci somatických mutací v genech MYD88 a CXCR4 ze vzorků PB pacientů s WM a IgM MGUS v rutinní praxi. Využití PB může zjednodušit a urychlit proces získání biologického materiálu. Zároveň je odběr PB pro pacienty méně stresující. Kontrola přítomnosti mutace v genu MYD88 z PB se jeví jako jednoduchý zdroj informace především u pacientů s IgM MGUS, kde mutace v MYD88 hraje roli nezávislého rizikového faktoru pro progresi do WM. Tato práce byla podpořena granty: NT14575, SGS02/LF/2014, SGS01/LF/2014-2015, MSK 02680/2014/RRC, MSK 02692/2014/RRC, MZ ČR - RVO - FNOs/2014

P34/2742.

Anaplastický veľkobuněčný lymfóm – diagnostika a sledování minimální reziduální nemoci

Kalinová M., Hliská I., Mrhalová M., Kabičková E., Kodet R. (Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK Praha a FN v Motole, Praha; Klinika dětské hematologie a onkologie 2. LF UK Praha a FN v Motole, Praha)

Anaplastický veľkobuněčný lymfóm (ALCL) patří mezi T non-Hodgkinské lymfomy, kdy u pacientů s ALK protein pozitivním ALCL dochází k patologické aktivaci onkogenu ALK. Je způsobena chromozomální translokací, při které vznikají fúzní geny s různými translokačními partnery. Asi u 75 % nacházíme translokaci t(2;5), kdy dochází k fúzi genu ALK s genem NPM. Cílem práce byla: 1) detekce nejčastějšího fúzního genu NPM/ALK 2) u pacientů bez prokázané fúze NPM/ALK bylo provedeno hledání translokačního partnera genu ALK pomocí metody 5' RACE. 3) u všech ALK protein pozitivních ALCL jsme vyšetřili kvantitativně expresi translokované části genu ALK, která sloužila jak k diagnostice ALK pozitivních ALCL, tak ke sledování minimální reziduální nemoci (MRN). Výsledky genové analýzy jsme porovnávali s imunohistochemickým průkazem (IHC) exprese proteinu ALK a jeho lokalizací v buňce a dále s výsledky fluorescenční in situ hybridizace na interfázických jádrech (I-FISH). Hladiny MRN jsme porovnávali s klinickým průběhem onemocnění. Celkem jsme vyšetřili 63 pacientů s ALCL (2-80 let; medián 18 let) s IHC prokázanou expresí proteinu ALK. U 59 pacientů bylo provedeno vyšetření zlomu chromozomu 2, oblastí 2p23 a ve všech případech byl detekován zlom. Ve 47/63 případech jsme detekovali fúzní gen NPM/ALK (75 %), v 5 případech ATIC/ALK, ve dvou případech CLTC/ALK, 1x jsme detekovali TPM4/ALK, TPM3/ALK, ALO17/ALK a MYH9/ALK. U 5 pacientů NPM/ALK negativních, ALK protein pozitivních jsme neměli dostatek materiálu (RNA) pro následné vyšetření metodou 5' RACE. U všech vyšetřených pacientů (60) jsme detekovali vysokou hladinu exprese translokované části genu ALK s mediánem 32253 kopií, kterou jsme u 35 pacientů využili ke sledování MRN bez ohledu na přítomný fúzní gen v době diagnózy. Hladina MRN korelovala s klinickým průběhem onemocnění. Molekulární diagnostika umožňuje detekovat translokační partnery genu ALK u ALK pozitivního ALCL. Kvantitativní detekce exprese translokované části genu ALK slouží jak k diagnostice ALK pozitivních ALCL, tak ke sledování MRN. Posouzení vlivu jednotlivých translokací na klinický průběh onemocnění vyžaduje multicentrickou klinickou studii, která by přispěla k rozšíření souboru pacientů s onemocněním ALK pozitivního ALCL. Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN MOTOL) a OPVK CZ.2.16/3.1.00/24022.

Chemoterapie zaměřená na centrální nervový systém (CNS) v kombinaci s vysokodávkovanou chemoterapií a autologní transplantací kmenových buněk (ASCT) u primárních CNS lymfomů

Paličková M., Novák J., Jančárková T., Kozák T. (Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha)

Úvod: Primární CNS lymfom (PCNSL) reprezentuje méně než 1% non-Hodgkinských lymfomů. Standardní léčbou užívanou v ČR je režim HDMTX/HDARA c s radioterapií. Prognóza pacientů s PCNSL je celkově nepříznivá. Rizikové faktory (RF) určující IELSG skóre jsou (věk>60 let, performance status(-PS)>2, LDH>norma, protein v likvoru>norma, postižení hlubokých mozkových struktur). Zejména u mladších pacientů je onemocnění potenciálně kurabilní. Pacienti a metody: Referujeme výsledky léčby protokolem CNS-zaměřené chemoterapie v kombinaci s vysokodávkovanou chemoterapií a ASCT v 1.linii léčby u 3 pacientů s nově diagnostikovaným PCNSL. Dle výše uvedených RF jsme zjistili u 1.pacienta IELSG 4, u 2.pacienta IELSG 3, u 3.pacientky IELSG 1. Cykly chemoterapie byly podávány po 21 dnech. Po 1.cyklu HDMTX/IFO/Dep (Methotrexat 4g/m² i.v.D1, Ifosfamide 2g/m² i.v.D3-5, liposomální cytarabin 50mg i.t.D6, dexamethason 2x4mg p.o.D6-10) byl proveden restaging. Pacienti bez progresu byli v 2.cyklu léčeni stejnou chemoterapií. Progredující pacienti byli od 2.cyklu léčeni HDARA c/TT/Dep (Cytarabin 3g/m² i.v. D1-2, Thiotepa 40mg/m² i.v. D2, liposomální cytarabin 50mg i.t. D3, dexamethason 2x4mg p.o. D3-7). Periferní kmenové buňky byly mobilizovány 2.cyklem chemoterapie. 3.cykly byl u všech stejný, t.j. HDARA c/TT/Dep. Poté byla podána vysokodávkovaná chemoterapie(Carmustin 400mg/m² i.v. D-5, Thiotepa 2x5mg/kg i.v. D-4 a D-3, Etoposide 150mg/m² i.v. D-5 až D-3) s následnou ASCT. Výsledky: Všichni tři pacienti dosáhli kompletní remise, která trvá 9 měsíců, 5měsíců a 1 měsíc po ukončení léčbě. Z hematotoxicity v průběhu podání konvenční chemoterapie se vyskytla neutropénie (2x gr.2 a 2x gr.4), opakovaně anémie gr.2, trombocytopenie (5x gr.2, 1x gr.3 a 1x gr.4). Z nehematologické toxicity se vyskytla senzitivní polyneuropatie (1x gr.2 a 1x gr.3). Při ASCT se vyskytla se 1x porucha vědomí s respiračním selháním na podkladě plicního edému nejasné etiologie, 1x paroxysmus fibrilace síní, 3x mukositis GIT gr.3, 2x febrilní neutropénie gr.4. Všechny komplikace se upravily ad integrum. Závěr: Chemoterapie zaměřená na CNS v kombinaci s vysokodávkovanou chemoterapií a autologní transplantací kmenových buněk v 1.linii léčby je účinná léčba u PCNSL s přijatelnou toxicitou. Postavení tohoto protokolu je nutné vyhodnotit v randomizovaných klinických studiích. Podpořeno z výzkumného projektu P 27/2012 Univerzity Karlovy, 3. Lékařské fakulty v Praze.

P36/2673.

Vyšetření mutací v genech MYD88 a CXCR4 u pacientů s Waldenströmovou makroglobulinémií

Křupková L., Divoká M., Pika T., Orviská M., Koláčková M., Divoký V., Papajík T. (Hematologická klinika, FN, Olomouc; Ústav biologie LF UP, Olomouc)

Úvod: Waldenströmova makroglobulinémie (WM) je definována jako lymfoplazmocytární lymfom s infiltrací kostní dřevě a IgM monoklonální gamapatií jakékoliv koncentrace. Až u 95 % pacientů s WM je přítomna aktivující mutace L265P v genu MYD88, jejíž detekce napomáhá odlišení WM od jiných lymfoproliferací. MYD88L265P ovlivňuje přežívání a proliferaci buněk prostřednictvím přímé interakce s Brutonovou tyrozininázou (BTK) a následnou aktivací signální dráhy NFκB. U téměř třetiny MYD88L265P-pozitivních pacientů jsou zároveň přítomny i aktivující mutace v genu pro chemokinový receptor CXCR4, které se ukazují být významným prognostickým faktorem v diagnostice WM. V genu CXCR4 se vyskytují záměny nukleotidů (nejčastěji za vzniku předčasného stop kodonu a zkrácení výsledného proteinového produktu – tzv. „nonsense mutace“ – NS) nebo inserce a delece jednotlivých nukleotidů mající za následek posun čtecího rámce (tzv. „frameshift“ mutace“ – FS). Pacienti a metody: Bylo vyšetřeno celkem 21 pacientů léčených na Hemato-onkologické klinice FN Olomouc s podezřením na WM. Z mononukleární frakce buněk z odběru kostní dřevě v době diagnózy byla izolována DNA. Vyšetření mutačního stavu MYD88 probíhalo pomocí alelové specifické PCR. U MYD88L265P-pozitivních pacientů bylo následně provedeno vyšetření mutace CXCR4 pomocí přímého Sangerova sekvenování PCR produktu. Nalezené mutace v genech MYD88 i CXCR4 byly ověřeny specifickým štěpením restriktivními endonukleázami. Výsledky: Bylo

identifikováno celkem 7 pacientů nesoucích mutaci MYD88L265P, z nichž u 3 byla současně nalezena i mutace v genu CXCR4. U 1 pacienta byla nalezena inserce jednoho nukleotidu v kodonu 318 způsobující posun čtecího rámce (CXCR4FS) a u 2 pacientů záměna nukleotidu v kodonu 338 (CXCR4NS). Všechny 3 nalezené mutace vedly ke vzniku předčasného stop kodonu a zkrácení C-konce výsledného chemokinového receptoru, které má za následek aktivaci CXCR4-zprostředkované signalizace. Závěr: Analýza mutačního stavu genů MYD88 a CXCR4 má význam v diagnostice WM a umožňuje hlubší pochopení molekulární patogeneze tohoto onemocnění. Ukazuje se, že přítomnost a typ mutací v genech MYD88 a CXCR4 mají vliv na klinické projevy a prognózu WM a vyšetření mutačního stavu těchto genů by mohla napomáhat při výběru optimální léčebné strategie. Tato práce byla podpořena granty IGA MZ ČR NT 13576 a IGA-LF-2015-001.

TRANSPLANTACE

P37/2678.

Výběr a příprava dárce k separaci PBPC a následná péče o něj

Černobilová K., Bhuiyan Ludvíková Z., Franzová K. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Odběry krvetvorných buněk /PBPC, Pheripheral Blood Progenitor Cells / jsou nedílnou součástí při léčbách poruch krvetvorby. Dárce PBPC se vytipovává z okruhu přímých příbuzných a to nejlépe sourozenců a někdy i rodičů. Pokud není nalezen vhodný dárce, zahajuje se vyhledávání v Národním registru dárců kostní dřevě. Nejdříve se z malého vzorku krve stanoví typ HLA znaků na povrchu červených krvinek, které se následně porovnají s typem HLA krvinek pacienta. Pokud je nalezena akceptovatelná shoda, zahajuje se příprava dárce k odběru PBPC. Zároveň ale musí být transplantace schválena komisí transplantčního centra a získán souhlas, jak od pacienta, tak od samotného dárce. Pak následuje řada interních a laboratorních vyšetření dárce. Výsledky posoudí kvalifikovaný lékař a stanoví zdravotní způsobilost k zahájení odběru. Dárce dostává rozpis aplikací injekcí Neupogenu / růstového hormonu / a termín separace. V určený den plánovaného sběru, dárce přichází na aferetické odd., kde je podroben 3-4 hod. separaci. Po odběru odchází v doprovodu domů. Nadále však zůstává v kontaktu s lékařem aferetického odd. pro případ, že by se vyskytly možné zdravotní problémy. Týden po separaci se u dárce provádí kontrola krevního obrazu. Pokud je krevní obraz normalizován a dárce se cítí dobře, je pozván k další kontrole za 6 měsíců, kdy se mu provedou podrobné krevní testy, včetně infekčních markerů. Další kontrola se provádí 2x po 4 měsících a následně každý rok a to po dobu nejméně 15 let. V současné době je takto sledováno 220 dárců aktivně docházejících a 263 neaktivních dárců, kteří nereagují na písemnou výzvu. Darování krvetvorných buněk se považuje na celém světě za zcela jedinečný dar, jaký je člověk člověku schopen dát. Tento hluboce lidský čin pomoci bezúplatně nemocnému člověku si právem zaslouží náš obdiv a úctu.

P38/2728.

Komplexní změny karyotypu jako významný prediktor výsledků alogenní transplantace u pacientů s myelodysplastickým syndromem

Víšek B., Zaviřelová A., Bělohávková P., Lánská M., Žák P., Radocha J. (IV.interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice, Hradec Králové)

Úvod: Ve skupině pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS) se dle recentních prací jeví přítomnost komplexního karyotypu jako výrazně negativní faktor, který ovlivňuje výstup těchto pacientů po alogenní transplantaci. Přestože se jedná o jedinou kurativní metodu, postavení alogenní transplantace v terapii těchto pacientů je diskutabilní. Pacienti a metodika: Zpracovali jsme soubor pacientů, kteří byli na našem pracovišti alogenně transplantováni pro MDS (všech typů) v letech 2007 – 2014. Parametry jako demografická data, stav choroby, dosažení remise před transplantací, typ transplantace a karyotypy byly následně hodnoceny jako faktory ovlivňující výstup pacientů po alogenní transplantaci. Výsledky: Retrospektivně byla analyzována data od 22 pacientů (12 mužů, 10 žen, medián věku 56 let, věkové rozmezí 32 – 66 let). Typ základní choroby sledovaného souboru byl: 2 pacienti s RAEB-T, 4 pacienti s RAEB-2, 3 pacienti s RAEB-1 a 3 pacienti s RA / RCMD. Celkem 20 pacientů podstoupilo alogenní transplantaci od shodného nepřibuzného dárce, pouze 2 pacienti měli shodného sourozence. Myeloablativní přípravný režim podstoupilo 13 pacientů, ostat-

ní (9) podstoupili přípravný režim s redukovanou intenzitou. 14 pacientů dosáhlo hematologické kompletní remise (CR) před transplantací. 5 pacientů mělo komplexní karyotyp. Medián sledování pacientů po alogenní transplantaci byl 3 měsíce. Medián celkového přežití zatím nebyl dosažen, 5-leté přežití bylo 56%. Jako nejsilnější prediktory výsledku transplantace byly vyhodnoceny: CR před transplantací (medián přežití 4,5 měsíce proti dosud nedosaženému, $p = 0.0977$), stadium choroby (RAEB-T a RAEB-2 proti ostatním, medián přežití 18 měsíců proti dosud nedosaženému, $p = 0.0361$) a komplexní karyotyp (medián přežití 4.5 měsíce proti dosud nedosaženému, $p = 0.0044$). Závěr: Komplexní změny karyotypu, stadium choroby a přítomnost remise onemocnění před alogenní transplantací jsou pravděpodobně nejdůležitějšími faktory, které ovlivňují prognózu pacientů alogenně transplantovaných pro MDS. Vzhledem k neutěšeným výsledkům je tedy přínos transplantace u této skupiny pacientů věcí diskuze.

P39/2704.

Alogénná transplantácia krvotvorných buniek v liečbe chronickej lymfocytovej leukémie

Sopko L., Bojtárová E., Roziaková L., Al Sabty F., Mistrik M., Bátorová A. (Klinika Hematológie a transfuziologie SZU, LFUK a UNB, Bratislava - SK)

Alogénná transplantácia krvotvorných buniek je naďalej jedinou potenciálne kuratívnu liečbou chronickej lymfocytovej leukémie, ktorá je však chorobou vyššieho veku, čo výrazne limituje použitie transplantáčnej liečby. Zavedenie prípravných režimov so zníženou intenzitou rozšírilo použitia transplantácie. CIBMTR uvádza 3 ročnú pravdepodobnosť prežitia $50\% \pm 3\%$ s myeloablatívnym a až $58\% \pm 2\%$ s redukovaným prípravným režimom. Materiál a metódy. V období od apríla 2013 do februára 2014 sme transplantovali 10 chorých s chronickou lymfocytovou leukémiou (bez mutácie IGVH 8 a 2 s mutáciou), 8 mužov a 2 ženy, medián veku 57 rokov (53-60). Medián času od dg. do transplantácie bol 60 mesiacov (8 až 120 mesiacov). V čase transplantácie malo 8 chorých rezistentnú/ progredujúcu chorobu (1 Richterov sy), 2 chorí hematologickú remisiu. Prípravný režim bol 7 x myeloablatívny a 3 x redukovaný, štep periférnych krvotvorných buniek bol 3 x od HLA identického súrodenca a 7 x od nepribuzného darcu. GVHD profylaxia spočívala v kombinácii CsA a MMF, iba 1x CsA a MTX. Výsledky. Znamky prihojenia boli u všetkých chorých, medián regenerácie neutrofilov $> 0,5$ a $1,0 \times 10^9/l$ bol D+16 a D+17, Tr > 20 , 50 a $100 \times 10^9/l$ v D+13, D+14 a D+15. Ku 5.3.2015 zomreli 4 chorí, 2 s akútnou GVHD st.IV, 1 na sepsu a 1 na relaps choroby. 6 chorých (60%) žije s trojrovným prihojením a kompletnou hematologickou remisiou. Avšak 3 majú extenzívnu chronickú GVHD s výrazne zníženou kvalitou života. Záver. Aj keď sa v súčasnosti pri použití redukovaných prípravných režimov mortalita do 100 dní alogénnej transplantácie pre chronickú lymfocytovú leukémiu významne znížila, výsledky negatívne ovplyvňuje dlhodobá nerelapsová mortalita, ktorú spôsobuje hlavne chronická reakcia štepu proti príjemcovi. A okrem dopadu na nerelapsovú mortalitu, chronická reakcia štepu proti príjemcovi výrazne negatívne ovplyvňuje kvalitu života po TKB. Prítomnosť aktívnej alebo neodpovedajúcej choroby v čase transplantácie ostáva prediktorom jej nepriaznivého výsledku. Jednou z podmienok zabezpečenia prínosu transplantácie pri chronickej lymfocytovej leukémii je starostlivý výber chorých nielen z hľadiska choroby, komorbidít, ale aj sociálnej anamnézy a primeraného rodinného zázemia. Nové lieky majú významnú efektivitu a priaznivý bezpečnostný profil. Ich nespornou výhodou je, že ich použitie nesúvisí bezprostredne so život ohrožujúcimi komplikáciami a majú potenciál pripraviť lepšie východisko pre transplantáčnu liečbu.

VARIA

P41/2776.

Zkušenosti s léčbou potransplantačních lymfoproliferací (PTLD)

Ticháková P., Novák J., Kozák T. (Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, 3.Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha)

Úvod: PTLD je závažná komplikace orgánových transplantací (Tx) vyplývající z imunosuprese a replikace viru EBV. PTLD představují celé spektrum onemocnění, histologicky se však nejčastěji jedná o Difúzní velkobuněčný lymfom (DLBCL). PTLD postihuje cca 2-5% pacientů v závislosti na transplantovaném orgánu, resp. na druhu imunosuprese. Největší incidence je u pacientů

léčených inhibitory kalcineurinu (CNI). Základní terapeutické opatření spočívá v redukcii ev. ve vysazení imunosuprese v kombinaci s podáním anti-CD20 monoklonální protilátky (Rituximab) u CD20 poz. PTLD, ev. kombinace chemoterapie s anti-CD20. Ve sdělení uvádíme naše zkušenosti a výsledky léčby PTLD. Pacienti a metody: V letech 2001-2014 bylo na IHK FNKV pro PTLD léčeno 30 pacientů. Většina byla diagnostikována v pokročilém klinickém stadiu - 43% v KS III, 46% v KS IV, pouhých 11% bylo v iniciálním KS I-II. Jednalo se o pacienty po Tx srdce (9), jater (14), ledviny+pankreatu (4), pankreatu (2) a jater+ledviny (1). 26 z těchto pacientů bylo léčeno CNI v monoterapii (9), ev. v kombináční terapii (17). Zbývající pacienti byli léčeni inhibitory mTOR (3) a kombinací steroidy + mykofenolát mefetil (1). Histologicky se jednalo o DLBCL (19), Folikulární (2) a Hodgkinův lymfom (2), Mnohočetný myelom (1), Anaplastický velkobuněčný lymfom (1), MALT (1), Mantle-cell (1) a další blíže neurčené lymfomy (3). U všech pacientů byla v průběhu terapie zcela vysazena imunosuprese. 8 pacientů bylo léčeno Rituximabem, u 15ti byla použita kombinace Rituximab + chemoterapie, u zbývajících 5ti pouze chemoterapie. Nejčastěji používaným chemoterapeutickým režimem je CHOP (17), ev. další protokoly dle typu PTLD. Výsledky: 8 pacientů bylo léčeno Rituximabem, medián sledování je 88 měsíců, přičemž 37% pacientů je v 1. kompletní remisi (KR), k relapsu došlo u 50% a 13% zemřelo. 13 pacientů bylo léčeno kombinací Rituximab + chemoterapie, medián sledování je 26 měsíců, přičemž 61% pacientů je v 1.KR, k relapsu došlo u 8% a zemřelo 31%. U dalších 2 pacientů terapie t.č. probíhá. 5 pacientů bylo léčeno pouze chemoterapií, medián sledování je 42 měsíců, přičemž 40% pacientů je v 1.KR a 60% zemřelo. U zbývajících 2 pacientů bylo přistoupeno pouze k paliativní terapii. Závěr: Z dosavadních zkušeností vyplývá, že vedle snížení dávek imunosuprese je nejuspěšnější léčebnou modalitou kombinace Rituximab + chemoterapie. V porovnání s literárně uváděnými daty zahraničních center dosahujeme s touto terapií lepších výsledků.

P42/2775.

Hemoterapie ve Fakultní nemocnici Olomouc v roce 2014

Entrová A., Smítal J., Galuszková D. (Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice, Olomouc)

Úvod: Fakultní nemocnice Olomouc patří mezi významná zdravotnická zařízení v ČR poskytující komplexní zdravotní péči, která se neobejde bez adekvátně zajištěné hemoterapie. Hemoterapii pro pacienty Fakultní nemocnice Olomouc zajišťuje Transfuzní oddělení, které poskytuje široké spektrum transfuzních přípravků, včetně raritních produktů nebo přípravy individuálních přípravků pro indikované pacienty. Metodika: Největší objem hemoterapie ve FNOL představuje aplikace erytrocytárních transfuzních přípravků, v tomto segmentu pozorujeme v posledních 5-ti letech nárůst o 10% na 14364 T.U. v roce 2014. Procento výdeje deleukotizovaných erytrocytárních TP povolna narůstá, aktuálně se pohybuje na úrovni 20%. Ozařování bylo v roce 2014 indikováno u 26% erytrocytárních TP. Největší objem hemoterapie tradičně směřuje na chirurgické obory+ARO 46% (6548/14364) a hematologické a onkologické pracoviště 32% (4596/14364). Interní obory se podílejí na spotřebě 17% (2452/14365). V roce 2014 byl zaveden masivní transfuzní protokol, upravující masivní hemoterapii u pacientů s život ohrožujícím krvácením. Nárůst spotřeby erytrocytárních transfuzních přípravků do FNOL byl následován vzestupem výdeje trombocytárních transfuzních přípravků na 2816 T.U. Změna spektra výdeje trombocytárních TP následuje celosvětové trendy v tomto segmentu hemoterapie, tedy nárůst podílů výdeje TBSDR na 24% a celkové navýšení výdeje trombocytárních TP v náhradních roztocích na 84%. Největším odběratel tohoto typu transfuzních přípravků je hematologická klinika, na kterou expedujeme 80% (2256/2816) trombocytárních TP a 33 T.U. granulocytárních TP. Ozařováno před výdejem je 91% trombocytárních TP. V roce 2014 pokračoval pokles spotřeby plazmy ve FNOL, výdej od roku 2009 klesl o 25% na 4 827 T.U. Pro pacienty s alegickými reakcemi je k dispozici preparát Octaplas. V roce 2014 vyvrcholilo úsilí trombocytárních oddělení o zvýšení bezpečnosti plazmy pro pacienty, od tohoto roku bude pacientům poskytována vysoce bezpečná plazma se sníženým rizikem vzniku TRALI u příjemců (plazma pouze od mužů, kteří nemají v anamnéze údaj o aplikaci transfuzního přípravku). Spektrum výdeje krevních derivátů bylo shodné s rokem 2013, spotřeba přípravků obsahující faktor VIII a IX je stacionární, pokračoval nárůst výdeje preparátů s obsahem imunoglobulinů a albuminu. Závěr: Hemoterapie je nedílnou součástí léčby řady onemocnění pacientů ve FNOL. V roce 2014 došlo k nárůstu spotřeby hemoterapie, mimo spotřeby plazmy.

P43/2774.**Mukormykóza u hematoonkologických pacientů na IHK FNKV**

Petečuková V., Novák J., Lysková P., Kozák T. (Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha; Laboratoř lékařské mykologie, Odd. parazitologie, mykologie a mykobakteriologie Praha, Zdravotní ústav se sídlem, Ústí nad Labem)

Úvod: Mukormykóza je mykotické onemocnění imunokompromitovaných osob, s velmi špatnou prognózou, postihující zejména VDN, mozek, plíce, ale i jiné orgánové systémy (GIT, kůže...). Diagnostika je založena na histologickém průkazu v postižené tkáni; u pacientů, kde není biopsie možná potom z mikrobiologického vyšetření (stěr, sputum) a klinického průběhu. Pacienti a výsledky: Na IHK jsme v letech 2012-2014 zaznamenali 6 případů mukormykózy - z toho 4 histologicky prokázané a 2 velmi suspektní (klinický průběh a mikrobiologický průkaz). 4 pacienti měli plicní postižení a 2 pacienti postižení VDN. 5 pacientů (4x akutní leukémie a 1x agresivní lymfom s výraznou infiltrací KD) bylo v době diagnózy v dlouhodobé těžké neutropenii; všichni z nich zemřeli - 4 na následky mukormykózy, 1 pacient podstoupil pneumonektomii, ale vzhledem k tomuto výkonu nebyl schopen další terapie základního onemocnění (AML) a zemřel na jeho relaps. Jediný přeživší pacient (DLBCL, dg po autologní transplantaci PBSC, postižení VDN, infiltrace baze lebni) nebyl dlouhodobě v neutropenii. Nyní je bez antimykotické terapie, v remisi mykózy. Všichni pacienti byli léčeni kombinací Abelcetu a Posakonazolu. Ve shodě s literaturou jsme identifikovali tyto rizikové faktory mukormykózy: dlouhodobá neutropenie, vysokoriziková leukémie, terapie kortikoidy, u plicních forem potom též preexistující plicní onemocnění/nikotinismus. Závěr: Mukormykóza u hematoonkologicky nemocných je onemocněním s vysokou mortalitou. Možné chirurgické řešení zatěžuje pacienta vysokým rizikem relapsu hematologického onemocnění vzhledem k časově posunu další cytostatické terapie (zejména akutní leukémie); antimykotická terapie stabilizuje onemocnění v době bez neutropenie, ale další chemoterapie vedoucí k neutropenii vede k rychlé progresi mykózy i přes maximální antimykotické krytí. Jako základ pro kontrolu mukormykózy se tedy jeví normalizace imunitního stavu jedince, s podporou odpovídající antimykotické terapie.

P44/2754.**Transport transfuzních přípravků pomocí systému TRANS Control**

Osmanová A., Smital J., Krumpholcová D., Galuszková D. (Transfuzní oddělení FN, Olomouc)

Úvod: Trombocytární a granulocytární transfuzní přípravky by měly být během přepravy udržovány co nejlíže k teplotě mezi 20 °C až 24 °C. Při přepravě na větší vzdálenosti, zvláště při extrémnějších venkovních teplotách je obtížné udržet doporučenou teplotu a může dojít k znehodnocení transfuzního přípravku. K udržení konstantní úrovně teploty během transportu lze použít systém TRANS Control. Přepravní systém TRANS Control (22°, 4°, -30°) umožňuje bezpečně transportovat transfuzní přípravky, vakuinací látky, léky a jiné zboží, které si klade vysoké nároky na tepelnou stabilitu. Produkty jsou udržovány na konstantní teplotní úrovni po dobu až 160 hodin, bez aktivního ochlazování. Regulace teploty je udržována předchlazeným chladivem v prvcích TRANS Control. Chladicí tekutina v TRANS Control se skládá z organické látky, která je řazena mezi zdravé nezávadné a je používána v potravinářství. Je pouze třeba bránit přímému kontaktu s transportovaným materiálem. Systém TRANS Control má vlastní indikátory fyzikálního stavu a teploty, které zobrazují jeho použitelnost. Náhodnému otevření TRANS Control během přepravy zabráňují patentované, po všech stranách uzamykatelná zařízení. Kapacitu transportního prostoru TRANS Control lze několikanásobně rozšířit rámy. Úkol: Zvalidovat stabilitu teploty v transportním systému, kdy teplota pro přepravované trombocytární nebo granulocytární transfuzní přípravky je stanovena v teplotním rozmezí 20 °C až 24 °C. Výsledky: Validace byla provedena na trasách Olomouc – Jeseník a Olomouc – Prostějov, teplota v transportním systému se pohybovala mezi 21 °C a 22 °C a mezi 22 °C a 23 °C, bez větších výkyvů. Validace vyhověla. Závěr: Systém TRANS Control se nám v praxi při přepravě trombocytů kladně osvědčil jako stabilní přepravní systém s minimálním výkyvem od zvolené požadované teploty. Nedostatkem jsou omezené stísněné skladovací prostory pro vak a jeho součásti.

P45/2747.**Erythrocytaferetická léčba čtrnáctileté pacientky s diagnózou polycytemia vera**

Stejskalová M., Sulovská I., Pospíšilová D., Galuszková D. (Transfuzní oddělení, FN, Olomouc; Dětská klinika, FN, Olomouc)

Předmětem sdělení je popis případu čtrnáctileté pacientky s diagnózou pravé polycytemie, a sice pohledem lékaře- transfuziologa- podílejícího se na erythrocytaferetické léčbě dívky. Pacientka byla odeslána na Dětskou kliniku Fakultní nemocnice Olomouc z Fakultní nemocnice Ostrava s podezřením na pravou polycytemii, jež u dětí představuje zcela raritní diagnózu. Vstupní laboratorní hodnoty se známkami lehké polycytemie, byly zkráceny předchozí léčebnou erythrocytaferézou, realizovanou ve Fakultní nemocnici Ostrava. Genetickým vyšetřením byla prokázána JAK2 mutace (val617phe), jež je specifickým diagnostickým znakem tohoto onemocnění. Na léčbě pacientky jsme začali participovat dva měsíce po vyslovení diagnózy, v době, kdy hodnoty krevního obrazu ukázaly jasnou indikaci k provedení depleční léčebné erythrocytaferézy. Během prvního roku od stanovení diagnózy absolvovala pacientka celkem čtyřikrát depleční léčebnou erythrocytaferézu. V průběhu každého výkonu bylo odebráno průměrně 342,5 gramů erythrocytární masy s kompletní náhradou fyziologickým roztokem. I přes relativně malé množství odseparované erymasy jsme dosáhli uspokojivého poklesu hematokritu, a sice z hodnoty 0,47 na fyziologickou hodnotu 0,42. Depleční výkon proběhl vždy bez komplikací, s dobrou léčebnou odezvou a s tendencí k prodloužení intervalu mezi jednotlivými výkony.

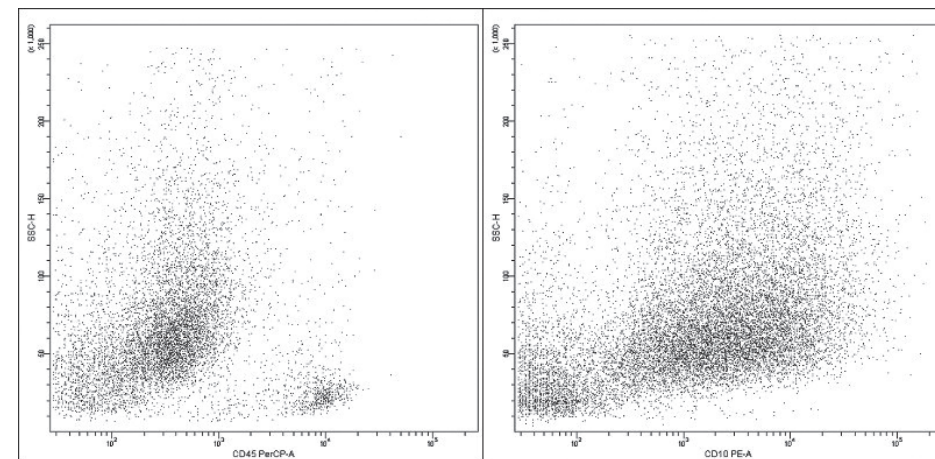
P46/2710.**K perinukleolární oblasti granulocytárních precursorů u nemocných s chronickou fází CML**

Smetana K., Mikulenková D., Klamová H., Jirásková I. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

V nedávné době perinukleolární oblast byla definována jako nový jaderný kompartment, který hraje významnou úlohu v maligní transformaci a je jednou z expresí malignity buňky. Na druhé straně, znalosti o morfologii a strukturální organizaci perinukleolární oblasti jádra jsou však velmi omezeny. Proto byl perinukleolární heterochromatin (velikost a stav kondenzace) studován během diferenciace granulocytárních precursorů u nemocných s chronickou fází Ph+ CML pomocí počítačové úpravy a denzitometrie na nátěrech kostní dřeně. Heterochromatin v interfázi totiž představuje chromozomální teritoria se „spícími geny“, která jsou charakterizována vysokou kondenzací DNA a chromatinu. Zvětšená heterochromatinová perinukleolární teritoria během diferenciace granulocytárních precursorů patrně souvisí s expresí genomové stability v této oblasti a to jak u neléčených, tak u léčených nemocných imatinibem. Cílená terapie imatinibem pak měla za následek zvýšenou kondenzaci perinukleolárního heterochromatinu, která představuje další typ přechodné terminální diferenciace leukemických granulocytárních precursorů. Studie byla z části hrazena z prostředků MZ.

P47/2702.**Supraklavikulární lymfadenopathie**

Koláček D., Starostka D., Švidrnochová J. (OKH NsP, Havířov)



67letý pacient byl přijat k diferenciální diagnostice levostranné supraklavikulární lymfadenopatie. Gastroskopické a kolonoskopické vyšetření ne zjistilo postižení gastrointestinálního systému zhoubným novotvarem. Současně pacient podstoupil exstirpaci levostranné supraklavikulární lymfatické uzliny, která byla podrobena mimo jiné imunofenotypizačnímu vyšetření, jež vyloučilo hematologickou malignitu. Patologická populace CD45 negativních buněk však exprimovala povrchový znak CD10 (nepriylisin, CALLA). V kontextu souběžně provedeného cytologického vyšetření otisku mizní uzliny a nálezu nehomogenní cisty pravé ledviny jsme stanovili diagnózu metastazujícího světlouňčného renálního karcinomu, která byla potvrzena histologickým vyšetřením exstirpované lymfatické uzliny a později i origa metastázy – samotné pravé ledviny.

P48/2691.

Thrombin Generation Test at R2 Polymorphism of Factor V

Procházková J., Slavík L., Procházka M., Úlehlová J. (Hemato-onkologická klinika LF a UP, Olomouc; Medical genetics, University Hospital, Olomouc)

Background: Thrombin generation test (TGT) is a functional test with a potential to assess the capacity of complete hemostatic system unlike routinely used coagulation tests that reflect specific part of coagulation system only. TGT has a special area of application in the determination of real prothrombogenic effect of known thrombophilias. R2 polymorphism of factor V (FV A4070G) increases the risk of thrombotic disease only slightly according to recent experience. Aims: The aim of our paper was to assess the prothrombogenic effect of R2 FV using TGT test. Methods: We performed thrombin generation test in the cohort of R2 FV heterozygotes and in a control group. All the assessed individuals had negative personal history of thrombotic complications. Thrombin generation test: Venous blood was collected into 0.1 volume of 3.6% trisodium citrate, centrifuged for 20 minutes at 2000g and stored at -80°C until time of analysis. Three major parameters of thrombin generation curve were used for analysis – maximum of thrombin generation (TGT max), endogenous thrombin potential (TGT ETP, area under curve) and TGT lag time. R2 polymorphism FV was detected by allele specific PCR. Results: The group of patients with R2 polymorphism of FV had thrombin generation with significantly higher value only of TGT max 229,4 (nM), but not ETP 2175 (nm) and lag time 3,0 (min) in comparison with control group TGT max 123,5 (nM); ETP 2380,7 (nm); lag time 3,6 (min). The total value of thrombin generation was not significantly different between both groups. Conclusion: Our results show increased formation and a higher peak of formed thrombin, whereas the total level of thrombin using ETP parameter was without any significant difference in the assessed groups. Our results support clinical experience of just a moderate increase of the risk of thrombotic disease in R2 FV polymorphism heterozygotes. Supported by the grant LF-2015-001 and IGA NT 14394

P49/2689.

Extracorporeal elimination – method of kinetically guided removal of plasma pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer patients.

Stanislav F., Kubeček O., Bláha M., Martinková J., Maláková J., Špaček J. (Klinika onkologie a radioterapie LFUK a FN, Hradec Králové; IV. Interní klinika LFUK A FN, Hradec Králové; Chirurgická klinika LFUK a FN, Hradec Králové; Ústav klinické biochemie FN, Hradec Králové; Gynekologická a porodnická klinika LFUK a FN, Hradec Králové)

Background: Cytostatic treatment is often negatively affected by dose-limiting toxicities. Novel agents including nanoparticle-based drug delivery systems (DDS) are becoming available to overcome this problem. Despite more favourable toxicity and pharmacokinetic profiles the use of DDS is often associated with different side effects. The accumulation of DDS in tumor tissue is much faster than in sensitive tissues, where side effects occur. Since only a small amount of DDS is accumulated in tumor tissue and majority of administered drug is circulating in the plasma removal of this circulating fraction could reduce toxicity. Methods: In a monocentric, open-labelled, prospective study pharmacokinetics of PLD was evaluated in ovarian cancer patients. Patients were divided into two groups: control group, study group undergoing extracorporeal elimination (EE, plasmafiltration). PLD (Caelyx®) 50 mg/m² every 4 weeks was used as a treatment regimen. EE was performed 44-48 h

after administration (cycle 2-4). Concentration of total and free doxorubicin was determined using HPLC (High Performance Liquid Chromatography). The efficacy of EE was evaluated comparing AUC in study group to AUC in control group and AUC in cycle 1 to AUC in cycles 2-4 within study group. Efficacy of EE to reduce AUC, and tolerability were primary endpoints of the study. Results: 3 patients have been enrolled so far – one in the control group and two in the study group. Pharmacokinetic parameters were evaluated in 10 cycles of chemotherapy. Three of them were affected by EE. We present an example of a typical course of therapy influenced by EE of PLD. The AUC (area under the curve) in the time interval defined by the first and the last sample collection (0.5 - 116 hours) without the use of EE was estimated 1742.3 mg.h/L. AUC in the same time interval using EE was 1413.5 mg.h/L meaning that the use of EE reduced AUC by 18.9 %. No adverse events occurred so far. Conclusion: Plasmafiltration can significantly influence the AUC of PLD and represents a suitable, well tolerated method enabling individualized and effective administration of chemotherapy. Acknowledgements: This project was supported by the grant IGA Ministry of Health CZ, NT 14035-3/2013.

P50/2688.

Transfuze granulocytů v léčbě těžkých infekcí během prolongované neutropenie: Zkušenosti jednoho centra z let 2005-2014.

Faber E., Vráblová L., Blahutová Š., Ráida L., Sztokowski T., Hubáček J., Rohoň P., Urbanová R., Marešová I., Lišková L., Indrák K., Čermáková Z., Papajík T., Kolář M. (Department of Hematology, FACULTY HOSPITAL OLOMOUC; FACULTY OF MEDICINE AND DENTISTRY, PALACKY UNIVERSITY IN OLOMOUC, Olomouc; Blood Center, University Hospital, Ostrava-Poruba; Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University Palacky, Olomouc)

Use of granulocyte transfusions (GT) in patients with hematologic malignancy and prolonged neutropenia complicated with severe infection represents a discussed strategy. We retrospectively evaluated the efficacy and safety of GT applied at our center over the last ten years period (2005-2014). GT were collected after stimulation with 40mg i.v. Solu-Medrol from unrelated ABO and Rh compatible donors at Cobe Spectra - Caridian BCT separator. Decisions to give GT in individual patients were made after agreement of 3 physicians. Decisions to stop GT treatment were taken according to clinical response and hematologic reconstitution. GT were given to 41 patients (15 female and 26 male) at age from 22 to 69 years (median 45.5). There were 26 acute leukemias, 7 MDS, 5 CLL and 3 patients with lymphoma. In most patients disease was active on (30; 73.2%), only 11 patients were in hematologic remission. 30 patients were after chemotherapy while 3 patients were after allogeneic stem cell transplantation (HSCT). Duration of severe neutropenia (less than 0.5x10⁹/l) was from 4 to 80 days (median 19 days). The main clinical indications were soft-tissue inflammations (26 cases) and pneumonias (16). 14 patients have suffered from proven invasive fungal infections (9 aspergilosis and 5 candidiasis) while coincident Gram+ or Gram- sepsis was present in 9 and 16 cases, respectively, complicated in 12 patients with septic shock. Together 191 GT were given – in a single patient from 1 to 17 GT (median 3.5). GT contained from 0.5 to 3.0x10¹⁰ granulocytes per one transfusion unit (median 1.3x10¹⁰). No side-effects both in donors and patients were recorded. Decrease of fever, complete resolution of infection and clinical improvement after GT was observed in 36 (87.8%), 29 (72.5%) and 34 (82.9%) of patients, respectively. Clinical deterioration occurred in 6 (14.6%) patients (4 – 9.8% – of these were fatalities). In six patients immediately after GT treatment HSCT was performed. We have not observed any problems in these patients after HSCT, one patient transplanted with active disease died early after relapse of acute leukemia while all other patients achieved full donor chimerism and hematologic remission. We can conclude that in our hands GT used in selected patients with severe infections in neutropenia have a high efficacy and safety and enabled also safe proceeding to HSCT. Acknowledgement: Grant of IGA LF UP 01-2015.

P51/2686.

Plazmafiltrace restauruje junkci fotoreceptorů u věkem podmíněné makulární degenerace

Bláha M., Rencová E., Langrová H., Studnička J. (4. interní hematologická klinika LF a FN, Hradec Králové; Oční klinika LF UK a FN, Hradec Králové)

ÚVOD: Věkem podmíněná makulární degenerace (AMD) je nejčastější příčinou praktické slepoty lidí nad 50 let. Pokud je stanovena diagnosa ještě v období suché formy AMD, nežli nastoupí irreversibilní změny, pak je naděje, že může být lepší zraková ostrost zachována, ale možnosti léčby jsou zde stále omezené. V posledních deseti letech byla zkoumána reohemaféza (RHF) – metoda plazmafiltrace jako možnost jak pozitivně ovlivnit AMD již ve stadiu suché formy. V této práci hodnotíme vliv RHF na kvalitu junkce vnitřní a zevní vrstvy (IS/OS) fotoreceptorů sítnice, která je důležitá pro zrakovou ostrost. SOUBOR NEMOCNÝCH A METODY: Bylo dlouhodobě sledováno (>2,5 roku) 24 nemocných suchou formou AMD, kteří měli druzové odchlípení retinálního pigmentového epitelu (DPED). 12 pacientů (22 OČÍ) bylo léčeno RHF a randomizováno 12 kontrol (18 očí). Pacienti léčení RHF dostali každý 8 standardizovaných RHF procedur během 10 týdnů. Hodnotili jsme zrakovou ostrost, IS/OS junkci a elektroretinografii na začátku a po 2,5 letech. VÝSLEDKY: RHF působí pokles viskozity plazmy i plné krve o 15/12%. Zraková ostrost stoupla u léčených pacientů nesignifikantně z 0.68 ± 0.31 na 0.72 ± 0.31 , zatímco poklesla u kontrol signifikantně z 0.60 ± 0.33 na 0.52 ± 0.28 ($p = 0.041$). Po 2,5 letech zůstalo 15 očí (68.2%) z léčených pacientů bez defektu junkce IS/OS. Odpovědi na mfERG v oblasti excentricity mezi $1,8^\circ$ a 7° byly signifikantně lepší u léčených ($p = 0.04$). ZÁVĚR: Pomocí reohemafézy lze docílit preservaci vrstvy fotoreceptorů sítnice u AMD a to i v případě DPED. Po RHF docházelo k významnému morfologickému zlepšení porušené vrstvy IS/OS nebo i úplnému znovupřiložení odchlípené vrstvy IS/OS. Po 2,5 roku sledování byla zjištěna v sledované skupině lepší zraková ostrost a zlepšily se některé funkční parametry (elektroretinografické nálezy). PODĚKOVÁNÍ: Tato práce vznikla za podpory grantů IGA MZ ČR NT14037-3/2013 a Prvok P27/8, 12.

ADAM, ZDENĚK
 ADAM, ZDENĚK
 BAČOVSKÝ, JAROSLAV
 BĚLOHLÁVKOVÁ, PETRA
 BEZDĚKOVÁ, RENATA
 BLÁHA, MILAN
 BOJTÁROVÁ, EVA
 BRÁZDILOVÁ, KAMILA
 BŘEZINOVÁ, JANA
 ČERMÁK, JAROSLAV
 ČERMÁK, JAROSLAV
 ČERNOBILOVÁ, KATEŘINA
 ČERVINEK, LIBOR
 DOBIÁŠOVÁ, ALENA
 DOUBEK, MICHAEL
 DYNTEROVÁ, ANDREA
 ENTROVÁ, ALICE
 FABER, EDGAR
 FABER, EDGAR
 FABER, EDGAR
 FLODR, PATRIK
 FRIEDECKÝ, DAVID
 FUCHS, OTA
 GIMSING, PETER
 HAVLOVÁ, EVA
 HELSTROM-LINDBERG, EVA

HLOŽKOVÁ, MICHAELA
 HLUŠÍ, ANTONÍN
 HOLZEROVÁ, MILENA
 HORÁČEK, JAN M.
 HOVORKOVA, LENKA
 HRABÁNKOVÁ-NAVRÁTILOVÁ, DARJA
 HROCHOVÁ, KATEŘINA
 HUTÁKOVÁ, BRONISLAVA
 CHIRON, DAVID
 INDRÁK, KAREL
 JAKLOVÁ, ZUZANA
 JINDRA, PAVEL
 JONÁŠOVÁ, ANNA
 KALINOVÁ, MARKÉTA
 KARAS, MICHAL
 KARAS, MICHAL
 KESLOVÁ, PETRA
 KOLÁČEK, DAVID
 KOŘALKOVÁ, PAVLA
 KOTROVÁ, MICHAELA
 KOUKALOVÁ, ALENA
 KOZÁK, TOMÁŠ
 KRALOVICS, ROBERT
 KREJČÍ, MARTA
 KRŮZOVÁ, LENKA
 KŘUPKOVÁ, LENKA

KUBA, ADAM
 KUFOVÁ, ZUZANA
 KULASEKARARAJ, AUSTIN
 KUPSA, TOMÁŠ
 KUŽÍLKOVÁ, DANIELA
 LACHMANOVÁ , JANA
 LEJHANCOVÁ, KATEŘINA
 LENKA, SKIRKOVÁ
 LUKÁŠOVÁ , MARIE
 LYSÁK, DANIEL
 LYSÁK, DANIEL
 MACICHOVÁ , MICHAELA
 MAISNAR, VLADIMÍR
 MARIE, JAROŠOVÁ
 MARINOV, IURI
 MAYER, JIŘÍ
 MIKEŠOVÁ, MICHAELA
 MIKULÁŠOVÁ, ZUZANA
 MINAŘÍK, JIŘÍ
 MINAŘÍK, JIŘÍ
 MINAŘÍK, JIŘÍ
 MÓCIKOVÁ, HEIDI
 MUSILOVA, KATERINA
 NEUWIRTHOVÁ, RADANA
 NOHAVOVÁ, IVETA
 NOVÁK, JAN

NOVÁK, MARTIN
 NOVÁK, MARTIN
 NOVÁKOVÁ, MICHAELA
 OBR, ALEŠ
 OKLEŠŤKOVÁ, DRAHOMÍRA
 ORVISKÁ, MONIKA
 OSMANOVÁ, ANNA
 PALIČKOVÁ, MONIKA
 PETEČUKOVÁ, VERONIKA
 PIKA, TOMÁŠ
 PIKA, TOMÁŠ
 PLANK, LUKÁŠ
 POLÁK, JAROSLAV
 POLÍVKOVÁ, VÁCLAVA
 POSPÍŠILOVÁ , DAGMAR
 POSPÍŠILOVÁ , DAGMAR
 PROCHÁZKA , VÍT
 PROCHÁZKA, VÍT
 PROCHÁZKOVÁ, JANA
 PROCHÁZKOVÁ, OLGA
 PROUZOVÁ, ZUZANA
 PYTLÍK, ROBERT
 RADOCHA, JAKUB
 RANSORFOVÁ, ŠÁRKA
 ROHOŇ , PETER
 ROHON, PETER

RUSINAKOVA , ZUZANA
 ŘÍHOVÁ, LUCIE
 SEDLAŘÍKOVÁ, LENKA
 SEDLAŘÍKOVÁ, LENKA
 SCHNEIDEROVÁ, PETRA
 SMETANA, KAREL
 SMOLEJ, LUKÁŠ
 SMOLEJ, LUKÁŠ
 SOPKO, LADISLAV
 STANISLAV, FILIP
 STAROSTKA, DAVID
 STAROSTKA, DAVID
 STAROSTOVÁ, LENKA
 STARÝ, JAN
 STARÝ, JAN
 STEJSKALOVÁ, MONIKA
 STETKA, JAN
 STOPKA, TOMÁŠ
 SUKOVÁ, MARTINA
 SVOREŇ, ZDENKO
 SZOTKOWSKI, TOMÁŠ
 ŠEMROVÁ, LUCIE
 ŠEVČÍKOVÁ, SABINA
 ŠIMEČKOVÁ, RADKA
 TICHÁKOVÁ, PETRA
 TRUHLÍKOVÁ , LUCIE

URBANOVÁ, RENATA
 VÁLKA, JAN
 VÁLKOVÁ , VERONIKA
 VAŠEKOVÁ, PETRA
 VÉVODA, JIŘÍ
 VINCOVÁ, MIROSLAVA
 VÍŠEK, BENJAMÍN
 VODIČKOVÁ, MARTA
 VOKURKA, SAMUEL
 VRBOVÁ, JANA
 VYTISKOVÁ, SOŇA
 WLODARSKA, IWONA
 ZÁBRANSKÁ, TEREZA
 ZADRAŽILOVÁ, VĚRA
 ZEMANOVÁ, ZUZANA
 ZIDOVA, ZUZANA
 ZUCHNICKÁ, JANA
 ŽÁK, PAVEL
 ŽIŽKOVÁ, HANA

