

TRANSFUZE A HEMATOLOGIE *dnes*

VYDÁVÁ ČESKÁ LÉKAŘSKÁ
SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ

ČASOPIS SPOLEČNOSTI
PRO TRANSFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ
A ČESKÉ HEMATOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI

KVĚTEN 2016
supplementum



XXX. Olomoucké hematologické dny

XX. Konference ošetrovatelství a zdravotních laborantů
IX. Symposium on Advances in Molecular Hematology

29. – 31. 5. 2016
NH Collection Congress Hotel a OMEGA centrum Olomouc
Legionářská 21, Olomouc

/ PROGRAM



INDEXED IN EMBASE/Excerpta Medica
Excerptováno v BIBLIOGRAPHIA MEDICA ČECHOSLOVACA
Indexováno a excerptováno v databázi SCOPUS
EBSCO-Academic Search Complete
Časopis je indexován v Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik Rady vlády pro výzkum a vývoj ČR.

ISSN 1213-5763 (Print)

ISSN 1805-4587 (On-line)

MK ČR E 7391

VYDÁVÁ ČESKÁ LÉKAŘSKÁ
SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ



TRANSFUZE A HEMATOLOGIE *dnes*

TRANSFUZE A HEMATOLOGIE

dnes

suplementum • ročník 22/2016

VEDOUcí REDAKTOR

MUDr. Jiří Masopust

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

ZÁSTUPCE VEDOUcíHO REDAKTORA

Prof. MUDr. Edgar Faber, CSc.

Hemato-onkologická klinika Fakultní nemocnice, Olomouc

REDAKCE

ZA SPOLEČNOST PRO TRANSFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ

MUDr. Jiří Masopust – hlavní redaktor pro transfuzní lékařství
MUDr. Ivana Meluzínová

Hematologické a transfuzní oddělení Nemocnice Boskovice

MUDr. Martin Písačka

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

MUDr. Vít Řeháček

Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice, Hradec Králové

MUDr. Petr Turek, CSc.

Transfuzní oddělení, Thomayerova nemocnice, Praha

ZA ČESKOU HEMATOLOGICKOU SPOLEČNOST

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

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Doc. MUDr. Tomáš Kozák, Ph. D., MBA

Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice Královské

Vinohrady, Praha

a onkologie Fakultní nemocnice Motol, Praha

Doc. MUDr. Pavel Žák, Ph. D.

Oddělení klinické hematologie FN, Hradec Králové

REDAKČNÍ RADA

ZA SPOLEČNOST PRO TRANSFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ

MUDr. Petr Biedermann

Transfuzní oddělení Nemocnice České Budějovice

pplk. MUDr. Miloš Bohoněk, Ph.D.

Odd. hematologie, biochemie a krevní transfuze

Ústřední vojenská nemocnice, Praha

Doc. MUDr. Zuzana Čermáková, Ph.D.

Krevní centrum Fakultní nemocnice, Ostrava

MUDr. Dana Galuszková, Ph.D., MBA

Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice, Olomouc

Doc. MUDr. Zdenka Gašová, CSc.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

MUDr. Růžena Herynková

Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice, Plzeň

MUDr. Jitka Kracíková

Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha

MUDr. Libuše Pagáčová

Autotransfuzní jednotka PLM Institutu klinické a experimentální medicíny, Praha

MUDr. Renata Procházková, Ph.D.

Transfuzní oddělení Krajské nemocnice, Liberec

MUDr. Eva Tesařová

Transfuzní oddělení a krevní banka Fakultní nemocnice, Brno

ZA ČESKOU HEMATOLOGICKOU SPOLEČNOST

Prof. MUDr. Karel Indrák, DrSc.

Hemato-onkologická klinika Fakultní nemocnice, Olomouc

Prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová, CSc.

Hemato-onkologická klinika Fakultní nemocnice, Olomouc

Prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc.

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

Prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc.

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

Prof. MUDr. Jaroslav Malý, CSc.

I. interní klinika LF UK a FN, Hradec Králové

Prof. MUDr. Miroslav Penka, CSc.

Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice, Brno-Bohunice

Prof. MUDr. Jan Starý, CSc.

Klinika dětské hematologie a onkologie

Fakultní nemocnice Motol, Praha



Česká hematologická
společnost ČS JEP

OBSAH

Prezidentské sympozium	7	Transplantace	56
Postgraduální sekce 1	13	Maligní lymfomy/Chronická lymfocytární leukemie	59
Wiedermannova přednáška	16	Konference zdravotních laborantů 2	69
Postgraduální sekce 2	17	Morfologie	73
Symposium on Advances in Molecular Hematology 1: Lymphoma Pathogenesis	23	Dárcovské a léčebné aferézy	83
Konference Ošetrovatelství 1	25	Laboratorní diagnostika	89
Symposium on Advances in Molecular Hematology 2: Stressed Hematopoiesis	28	Anémie/Cytopenie	92
Symposium on Advances in Molecular Hematology 3: State of the Art Invited Lecture	31	POSTEROVÁ SEKCE	
Konference Ošetrovatelství 2	31	Ošetrovatelství	99
Mnohočetný myelom	35	Mnohočetný myelom	101
Akutní leukemie/Chronická myeloidní leukemie	40	Akutní leukemie/Chronická myeloidní leukemie	108
Psychologie	45	Transplantace	118
Konference zdravotních laborantů 1	48	Maligní lymfomy/Chronická lymfocytární leukemie	119
Myelodysplastický syndrom/Myeloproliferativní onemocnění	49	Laboratorní diagnostika	130
		Podpůrná péče	133
		Transfuzní problematika	135

**Redakce neručí za jazykovou a odbornou správnost abstrakt.
Neprošlo redakční úpravou.**

<http://www.cls.cz>

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2016

TRANSFUZE A HEMATOLOGIE DNES

Online verze časopisu na: www.prolekare.cz/tmd

Registrací a zadáním svého předplatitelského kódu, který najdete na přebalu časopisu, získáte přístup do online verze časopisu a jeho archivu.

Kontakt pro dotazy: info@prolekare.cz nebo +420 602 244 819



Vedoucí redaktor
MUDr. Jiří Masopust

Zástupce vedoucího redaktora
prof. MUDr. Edgar Faber, CSc.

Odpovědná redaktorka
Ing. Lenka Šplichalová
e-mail: lenkasplichalova@hotmail.com

**Vydává: Česká lékařská společnost
Jana Evangelisty Purkyně, z. s.,
Sokolská 31, 120 26 Praha 2**

**Pro ČLS JEP
připravuje Mladá fronta a. s.**



Generální ředitel: Ing. David Hurta

Ředitel divize Medical Services
Karel Novotný, BA (Hons)

Koordinátor odborných časopisů ČLS JEP
MUDr. Michaela Lízlerová

Produkční:
Jana Schrammová

Grafická úprava, sazba:
Jan Borovka

Marketing a distribuce

ředitel marketingu a distribuce: David Švanda
Brand Manager: Petra Trojanová
manažerka výroby a distribuce: Lucie Bittnerová

Tisk: EUROPRINT a. s.

V ČR rozšiřuje: A.L.L. production s. r. o.,
P. O. BOX 732, 111 21, Praha 1

V SR: Mediaprint Kapa – Pressegrasso, a. s.,
Vajnorská 137, P.O. BOX 183
831 04 Bratislava

Vychází: 4krát ročně

Předplatné: na rok pro ČR je 320 Kč,
SR 19,20 €, jednotlivé číslo 80 Kč,
SR 4,80 €.

**Informace o předplatném podává
a objednávky předplatitelů přijímá:**
ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2,
tel.: 296 181 805 – L. Kalná,
e-mail: nto@cls.cz

Inzerce: Kristína Kupcová
kupcova@mf.cz; 225 276 355

Rukopisy zasílejte v elektronické formě na adresy:

Transfuzní tematika – jiri.masopust@kzcr.eu,
případný písemný kontakt:
prim. MUDr. Jiří Masopust, Krajská zdravotní, a. s.
– Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem, o. z.,
Transfuzní oddělení, Sociální péče 3316/12A,
401 13 Ústí nad Labem;
Hematologická tematika – Edgar.Faber@fnol.cz,
případný písemný kontakt:
prof. MUDr. Edgar Faber, CSc.,
Hemato-onkologická klinika FN Olomouc,
I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc

Rukopis byl předán do výroby 6. 5. 2016.
Zaslané příspěvky se nevracejí.

Otištěné příspěvky autorů nejsou honorovány,
autoři obdrží bezplatně jeden výtisk časopisu.

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

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

ORGANIZAČNÍ A VĚDECKÝ VÝBOR KONGRESU

Prezident sjezdu:

prof. MUDr. Karel Indrák, DrSc.

Předseda organizačního výboru:

prof. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.

Předseda vědeckého výboru:

prof. MUDr. Edgar Faber, CSc.

Koordinátoři Konference ošetřovatelství a zdravotních laborantů:

za sekci Ošetřovatelství:

MUDr. Antonín Hluší, Ph.D.

Mgr. Václav Kajaba, Ph.D.

Bc. Monika Labudíková

za sekci Zdravotních laborantů:

Mgr. Jarmila Juráňová

Jana Kadlecová

Mgr. Luděk Slavík, Ph.D.

Koordinátoři 9th Symposium on Advances in Molecular Hematology:

doc. RNDr. Vladimír Divoký, Ph.D.

prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová, CSc.

Vědecký výbor:

Divoký V., Faber E., Galuszková D., Hluší A.,
Indrák K., Jarošová M., Juráňová J.,
Kadlecová J., Kajaba V., Labudíková M.,
Minařík J., Papajík T., Procházka V., Rohoň P.,
Slavík L., Skoumalová I., Sotkowski T.,
Ščudla V., Škrobánková A., Raida L.,
Urbanová R.

Organizační výbor:

Bendová D., Divoký V., Faber E., Hluší A.,
Indrák K., Kajaba V., Lišková L., Slavík L.,
Sotkowski T., Šebíková J., Štursová L.

Organizační sekretariát, registrace:

Lenka Štursová a Dana Bendová

WIEDERMANNŮVA PŘEDNÁŠKA

**Ohlédnutí za 30 ročníky OHD,
pravidelné hematologické akce s nejdelší
tradicí v ČR v kontextu Olomoucké
hematologie**

Indrák K. (Olomouc)

Témata:

Anémie

Akutní leukemie

Dárcovské a léčebné aferézy

Hodgkinův lymfom

Chronická lymfocytární leukemie

Chronická myeloproliferativní onemocnění

Laboratorní diagnostika

Mnohočetný myelom

Morfologie

Myelodysplastický syndrom

Ne-hodgkinské lymfomy

Transplantace krvetvorných buněk

Varia

Konference ošetřovatelství a zdravotních laborantů

Ošetřovatelství

Laboratorní problematika

Topics of Symposium on Advances in Molecular Hematology:

Lymphoma Pathogenesis

Stressed Hematopoiesis

J. Bartek: State of the Art Invited Lecture

Formy prezentace:

přednášky, postery

Jednací jazyk:

čeština, slovenština, angličtina

POŘÁDAJÍ

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



Česká hematologická
společnost ČLS JEP



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, M.A., Ph.D.
předsedy ČHS ČLS JEP doc. MUDr. J. Čermáka, CSc.
ředitele Fakultní nemocnice Olomouc doc. MUDr. R. Havlíka, Ph.D.



XXX. Olomoucké hematologické dny

XX. Konference ošetrovatelství a zdravotních laborantů
IX. Symposium on Advances in Molecular Hematology

29. – 31. 5. 2016

NH Collection Congress Hotel a OMEGA centrum Olomouc
Legionářská 21, Olomouc

/ PROGRAM



Česká hematologická
společnost ČLS JEP



Česká lékařská společnost
J.E. Purkyně



Česká asociace
sester

Lékařská fakulta
Univerzity Palackého
v Olomouci

Haimaom
Nadace na podporu transplantace kostní dřeně

GENERÁLNÍ PARTNEŘI

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



HLAVNÍ PARTNEŘI

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



VÝZNAMNÍ PARTNEŘI

Angelini Pharma ČR s.r.o. / Sysmex CZ s.r.o. / Terumo BCT Europe N.V.



PARTNEŘI

Alexion Pharma Czech s.r.o. / AOP Orphan Pharmaceuticals AG - org.sl. / Astellas Pharma s.r.o.
Baxalta Czech spol.s.r.o. / Bayer s.r.o. / BIOHEM spol.s.r.o. / Biomedica ČS s.r.o. / Carl Zeiss spol. s.r.o.
CSL BEHRING s.r.o. / DS Soft Olomouc spol. s.r.o. / Exbio Praha a.s. / Farmakon Press spol.s.r.o.
Fresenius Kabi s.r.o. / GRIFOLS s.r.o. / I.T.A.-Intertact s.r.o. / Medesa s.r.o. / Medista spol.s.r.o.
Merck Sharp & Dohme s.r.o. / Octapharma CZ s.r.o. / Pfizer spol. s.r.o. / Sandoz s.r.o.
SARSTEDT spol.s.r.o. / SERVIER s.r.o. / Solen s.r.o. / The Binding Site s.r.o. / Werfen Czech s.r.o.

ZA PODPORY



HARMONOGRAM XXX. OLOMOUCKÝCH HEMATOLOGICKÝCH DNŮ 2016


www.olhemdny.cz

	08:00	09:00	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	17:00	18:00	19:00	20:00	21:00
Ne / 29. 5.														
E1			Prezidentské symposium			Postgraduální sekce 1		Wiedemannova přednáška	Postgraduální sekce 2				Slavnostní zahájení	
Po / 30. 5.														
O	Advances in Molecular Hematology 1	Advances in Molecular Hematology 2	Advances in Molecular Hematology 3			Prezentace posterů	Mnohočetný myelom	Mylodysplastický sy/ Myeloproliferativní onemocnění	Pfizer					
M	Janssen	Roche	Gilead Sciences				Akutní leukemie/ CML	Transplantace	Servier					
E3	Amgen	Bristol-Myers Squibb	Novartis				Psychologie	Maligní lymfomy/CLL						
E1	Konference Ošetrovatelství 1	Konference Ošetrovatelství 2					Konference zdravotních laborantů 1	Konference zdravotních laborantů 2						
Út / 31. 5.														
M	Morfologie	Laboratorní diagnostika												
E1	Dárcovské a léčebné aferézy	Anémie/Cytopenie												

VYSVĚTLIVKY:
 NH Congress Hotel:
 O - sál Olomouc
 M - sál Madrid
 E1 - sál Evropa 1
 E3 - sál Evropa 3

PREZENTACE FIREM / SLAVNOSTNÍ ZAHÁJENÍ / SPOLEČENSKÝ VEČER
 probíhá v hale Omega centra - naproti NH hotelu

POSTEROVÁ ČÁST PROGRAMU
 probíhá /neděle - úterý/ v hale Omega centra - naproti NH hotelu

 SATELITNÍ SYMPOSIA

 PROGRAM KONFERENCE



PREZIDENTSKÉ SYMPOZIUM

2927. GRANULOCYTOPENIE – PATOFYZIOLOGIE, DIAGNOSTIKA, LÉČBA

Čermák J. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Abstrakt sdělení není k dispozici.

2966. DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA EOZINOFILIE

Doubek M., Brychtová Y., Adam Z. (Interní hematologická a onkologická klinika, LF MU a FN, Brno)

ÚVOD

Eozinofilie je častým nálezem u řady onemocnění, včetně onemocnění onkologických či interních. Na druhou stranu klonální hypereozinofilie sama o sobě může mít zhoubný průběh.

INCIDENCE

Údaje o incidenci eozinofilie v české či slovenské populaci neznáme. Podle zahraničních dat je eozinofilie přítomna u < 0,2 % pacientů s normálními parametry krevního obrazu. Incidence život ohrožujícího idiopatického hypereozinofilního syndromu je pak asi 0,5 případů na 100 000 obyvatel a rok.

Základní dělení eozinofilí

Eozinofilie se dělí na:

- Sekundární eozinofilie – cytokiny indukovaný reaktivní fenomén
- Primární (klonální) eozinofilie – přítomny histologické, cytogenetické nebo molekulární známky klonality
- Idiopatická eozinofilie – není prokázána neklonální či klonální příčina. Hypereozinofilní syndrom je pak

Tab. 1 Příčiny eozinofilie.

Sekundární eozinofilie	Primární (klonální) eozinofilie
Infekce – nejčastěji helmintické. Výraznější eozinofilie při parazitech infiltrujících tkáně (strongyloides, trichinelóza, filariáza, toxocaróza), méně výrazná při střevní helmintóze	Akutní leukémie (nejčastěji myeloidní)
Reakce na léky (antikonvulsiva, antibiotika, antirevmatika, allopurinol), potravinová alergie,	
atopické choroby (atopická dermatitis, alergické astma bronchiale, plicní eozinofilie indukovaná léky)	Chronické myeloproliferativní nemoci (Ph negativní)
Plicní eozinofilie - eozinofilní syndromy s plicními projevy (chronická eozinofilní pneumonie, akutní eozinofilní pneumonie, prostá plicní eozinofilie)	Chronická myeloidní leukemie (Ph pozitivní)
Další příčiny související s autoimunitou a zánětem či toxickou reakcí	Eozinofilní myeloproliferace obsahující přestavbu genu PDGFRA
Eozinofilie-myalgie syndrom, syndrom asociovaný s podáním L-tryptofanu v toxickém oleji	Eozinofilní myeloproliferace obsahující přestavbu genu PDGFRB
Eozinofilní fasciitis, Schulmanův syndrom, Kimurova choroba, Wellsův syndrom, Omennův syndrom	Systémová mastocytóza (často s mutací genu KIT)
Choroby pojiva (sleroderma, polyarteritis nodosa), granulomatóza s polyangiitidou, lupus erythematosus, revmatoidní artritida	Syndrom 8p11
Sarkoidóza, zánětlivé střevní nemoci, chronická pankreatitis	Myelodysplastický syndrom
Maligní nemoci (metastazující karcinomy, Hodgkinova nemoc T-lymfomy)	
Endokrinopatie, Addisonova nemoc, deficit růstového faktoru	
Defekty imunity (hyper IgE syndrom, Selektivní IgA deficit, Wiscott Aldrichův syndrom, infekce HIV a HTLV-1 retrovirem).	
Eozinofilní syndromy s kožními projevy (hypereozinofilní dermatitis, episodický angioedém s eozinofilii, eozinofilní celulitis)	
Eozinofilní syndromy s postižením pojiva a svalů (eozinofilní perimyositis, eozinofilní myositis, eozinofilní fasciitis, sklerodermie)	
Eozinofilní syndrom s vaskulitidou (Churgův-Straussův syndrom, smíšený polyangiitický syndrom s eozinofilii, syndrom eozinofilní vaskulitidy)	

podmnožinou idiopatické eozinofilie, kdy je přítomno více než $1,5 \cdot 10^9/l$ eozinofilů a je prokázáno poškození orgánů a tkání eozinofily.

Přehled příčin eozinofilie uvádí tabulka 1.

Při diferenciální diagnostice eozinofilie je vhodné přihlédnout i k absolutnímu počtu eozinofilů v periferní krvi, i když pravděpodobnost ireverzibilního orgánového postižení při eozinofilii nezávisí na absolutním počtu všech eozinofilů.

VYBRANÉ PŘÍČINY EOZINOFILIE

1) Infekce

Eozinofilie nejčastěji provází parazitární choroby. Tyto lze nomenklaturně rozdělit na parazitující prvky (*protozoa*) a na parazitující červy (*vermes*), pro které se v lékařství používá termínu helminti.

2) Alergické choroby

V průmyslových zemích jsou alergie nejčastější příčinou eozinofilie (senná rýma, alergická rýma, astma, reakce na léky či jiné látky, alergická cystitida). Tyto alergie však způsobují nejčastěji jen mírný ($0,5 - 0,7 \cdot 10^9/l$), výjimečně střední vzestup počtu eozinofilů.

K alergickým eozinofilii patří rovněž tzv. **DRESS syndrom** (*drug rash with eosinophilia and systemic symptoms*), který je formou alergické reakce na léky. Z léků mohou vyvolat eozinofilii antibiotika, antituberkulotika, antimykotika, antiflogistika, antipsychotické léky, fenothiaziny, chlorpromazin, antiepileptika, hydantoináty, barbituráty, antidiabetika, antikoagulantia a protinádorové léky. Nejčastějšími reakcemi, doprovázejícími lékovou alergickou reakcí, je kožní raš, makulopapulózní exantém, výjimečně jiná forma postižení kůže až exfoliativní dermatitis, často i teplota s bolestmi kloubů a svalů. Méně častá je hmatná lymfadenopatie. Interval mezi zahájením užívání léku a vznikem polékové alergické reakce je nejčastěji 2 – 6 týdnů.

3) Eozinofilní syndromy s plicní manifestací a další plicní nemoci

Eozinofilie provází často řadu plicních onemocnění – plicní karcinomy, sarkoidózu či astma (viz alergické choroby). Může jít jak o důsledek plicního postižení, tak i o příčinu.

4) Maligní choroby

Mnoho maligních chorob je provázeno vzestupem počtu eozinofilů. Nejčastěji jde o pokročilé malignity s metastázami. Často je eozinofilie nalézána u pacientů s plicními tumory nebo hematologickými chorobami (neklonální eozinofilie u Hodgkinova lymfomu,

nehodgkinských lymfomů obzvláště T typu, akutní lymfoblastické leukemie). V případech maligních lymfoproliferativních onemocnění může eozinofilie předcházet roky jejich další manifestaci. Po úspěšné léčbě maligního lymfoproliferativního onemocnění může eozinofilie vymizet a relabovat může opět až měsíce před zřetelným relapsem maligní choroby.

5) Imunologické příčiny eozinofilie

Imunologické příčiny eozinofilie zahrnují hyper-IgE syndrom, izolovaný deficit IgA nebo Wiskottův-Aldrichův syndrom.

Hypereozinofilní syndrom vyvolaný T lymfocyty

T-lymfocyty stojí v pozadí všech reaktivních eozinofilií. V některých případech známe příčinu, a pak je eozinofilie klasifikována dle této příčiny (léky, paraziti apod.), nebo příčinu neznáme a pak jednotka spadá do kategorie idiopatického hypereozinofilního syndromu, pokud splňuje jeho kritéria uvedená výše. Na hypereozinofilní syndrom mediovaný T-lymfocyty lze usuzovat v případech neprokázané klonální eozinofilie, nebo při prokázané klonální populaci T-lymfocytů, produkujících vysoké koncentrace výše uvedených interleukinů, signalizujících Th2 profil těchto buněk. Pacienti s hypereozinofilií způsobenou T-lymfocyty mají častěji vysokou koncentraci imunoglobulinu IgE a polyklonální hypergamaglobulinemii. Za fyziologických okolností dochází k T-lymfocyty mediované eozinofilii při parazitárních infekcích. Za patologických okolností dochází k této reakci u alergických stavů, autoimunitních onemocnění a nakonec i u maligních lymfomů, obzvláště T-typu.

Další stavy spojené s eozinofilií

Mezi eozinofilní syndromy ne zcela jasné etiologie, ale pravděpodobně rovněž související s T-buněčnou imunitní odpovědí patří následující choroby: idiopatický epizodický angioedém s eozinofilií, hypereozinofilní dermatitis, eozinofilní celulitida (Wellsův syndrom), eozinofilní myositidy, eozinofilní fascitida, eozinofilní gastroenteritidy či Crohnova nemoc nebo ulcerózní kolitida spojené s eozinofilií. Tyto relativně benigní nemoci s eozinofilií obvykle poškozují jen jeden orgán a počet eozinofilů v krvi může a nemusí být zvýšený.

Eozinofilie může provázet i revmatoidní artritidu a další kolagenózy. Odborná literatura popisuje takzvanou eozinofilní myopatii.

Syndrom eozinofilní fascitidy (Schulmanův syndrom) je příbuzný sklerodermii, které se značně podobá makroskopickým postižením kůže a podkoží a odlišuje se eozinofilií, infiltrací podkoží eozinofily a přítomností hypergamaglobulinemie.

Kimurova choroba je podobné onemocnění mladých mužů. Projevuje podkožními infiltráty v oblasti hlavy a krku a je spojena s regionální lymfadenopatií. Histologický obraz zahrnuje folikulární hyperplazii a eozinofilní infiltráty.

6) Klonální eozinofilie

Klonální eozinofilie jsou způsobena primární poruchou v kostní dřeni. Klonalitu lze pak prokázat cyto geneticky nebo molekulárně genetickými metodami. Klonální eozinofilie spadá do skupiny myeloproliferativních nemocí. Ke klonálním eozinofiliím patří podle klasifikace Světové zdravotnické organizace chronická eozinofilní leukemie (CEL) a myeloidní a lymfoidní neoplázie spojené s eozinofilií a abnormalitami genů PDGFRA, PDGFRB nebo FGFR1.

Chronická eozinofilní leukemie

Ke kritériím CEL patří: 1) zvýšený počet nezralých eozinofilů v krvi (nad $1,5 \times 10^9/l$) a v kostní dřeni, která navíc může obsahovat až do 20 % blastů, 2) infiltrace tkání nezralými eozinofily, 3) jsou přítomny hematologické abnormality: degranulace, vakuolizace, hyposegmentace, hypersegmentace eozinofilů, hepatomegalie, splenomegalie, zvýšená koncentrace vitamínu B12, abnormálním skóre leukocytární alkalické fosfatázy,

kteří bývá spíše zvýšené než snížené, myelofibróza, myeloidní dysplazie a bazofilie a 4) je vyloučena abnormalita genů PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 či BCR-ABL1 (bývá u chronické myeloidní leukemie). V literatuře jsou popsány i morfologické odchylky patologických eozinofilů od jejich fyziologických protějšků při vyšetření elektronovou mikroskopií. Odlišení CEL od idiopatického hypereozinofilního syndromu může být ale někdy komplikované. K odlišení může pomoci průkaz chromozomálních abnormalit v buňkách eozinofilní řady u CEL, které u HES přítomny nebývají, nebo zmožení blastů v kostní dřeni nebo periferní krvi.

Kardiální, neurologické a další komplikace (viz níže) se mohou vyvinout v případě CEL stejně jako u idiopatického HES s polyklonálními eozinofily, nebo při parazitární chorobě, a proto nepředstavují rozlišovací ukazatel.

Diagnostická kritéria CEL jsou přesně uvedena v tabulce 2.

Myeloidní a lymfoidní neoplázie spojené s eozinofilií a abnormalitami genů PDGFRA, PDGFRB nebo FGFR1 a) Eozinofilní myeloproliferace spojené s přestavbou genů **PDGFRA** nebo **PDGFRB**

V některých případech lze prokázat souvislost klonální eozinofilie s mutacemi či přestavbami genů pro

Tabulka 2. Kritéria chronické eozinofilní leukemie a hypereozinofilního syndromu podle Světové zdravotnické organizace.

Požadavek: Trvající eozinofilie s absolutním počtem eozinofilů v periferní krvi $1.5.10^9/l$ a více, zvýšený počet eozinofilů v kostní dřeni, počet myeloblastů v krvi nebo kostní dřeni < 20 %.

1. Vyloučení všech příčin eozinofilie způsobené:

- alergií,
- parazitárními chorobami,
- infekčními chorobami,
- plicními chorobami (hypersenzitivní pneumonitis, Löfflerův syndrom atd),
- kolagenními vaskulárními chorobami.

2. Vyloučení maligních chorob se sekundární, reaktivní plasmocytózou

- T-buněčné lymfomy včetně mykosis fungoides a Sézaryho syndromu,
- Hodgkinův lymfogranulom,
- akutní lymfoblastickou leukemii/lymfom,
- mastocytózu.

3. Vyloučení maligních chorob, u nichž jsou eozinofily částí maligního klonu

- chronická myeloidní leukemie (Ph chromozom ABL/BCR fúzní gen),
- akutní myeloidní leukemie,
- ostatní myeloproliferativní choroby,
- myelodysplastický syndrom.

4. Vyloučení T-buněčné populace s aberantním fenotypem nebo abnormální produkcí cytokinů.

5. Pokud není přítomna nemoc, která může způsobovat eozinofilii, není přítomen abnormální T-buněčná populace a není průkazu klonální • • myeloidní choroby, je možné uzavřít diagnózu jako hypereozinofilní syndrom.

6. Pokud jsou splněny všechny požadavky 1–4 a pokud myeloidní buňky mají

- prokázanou chromozomální klonalitu,
- nebo jejich klonalita byla prokázána jiným způsobem,
- nebo pokud počet blastů v periferní krvi > 2 % nebo v kostní dřeni > 5 %, ale < 19 % všech jaderných buněk,
- je diagnostikována chronická eozinofilní leukemie.

takzvaný *platelet derived growth factor receptor alfa* (PDGFRA) a *beta* (PDGFRB). Klinickými projevy se tyto případy eozinofilie podobají HES (viz níže), systémové mastocytóze nebo CEL. Z klinického průběhu nelze tedy na přítomnost mutace PDGFRA usuzovat.

Gen PDGFRA kóduje tyrozinkinázový receptor PDGFRA a je lokalizován na chromosomu 4 (4q12). Jako první byla popsána translokace t(1;4)(q44;q12), která má za následek fúzi genu PDGFRA s genem *FIP1L1* za vzniku fúzního genu *FIP1L1-PDGFR*. K aktivaci PDGFRA může dojít také v důsledku dalších chromosomálních translokací. Například t(4;22)(q12;q11), která má za následek vznik fúzního genu *BCR-PDGFR*. Postupně byly rozeznávány další geny, které po fúzi s genem PDGFRA: *KIF5B*, *CDKSRAP2*, *STRN* nebo *ETV*. Každá z výše uvedených cest vede ke konstitutivní aktivaci genu PDGFRA.

Fúzní gen *FIP1L1* byl nalezen asi u 12-14 % všech pacientů s eozinofilií, většinou u mužů.

Gen PDGFRB je lokalizován na chromosomu 5, v oblasti 5q33. K jeho aktivaci dochází různými chromosomálními translokacemi, například t(5;12)(q33;p13), která vede ke vzniku fúzního genu *ETV6-PDGFRB*. Popsáno bylo dalších několik genů, které mohou být fúzními partnery genu PDGFR.

Velmi významným faktem, který se týká tohoto podtypu eozinofilie je fakt, že zde existuje velmi účinná terapeutická možnost tyrozinkinázovými inhibitory, například imatinibem (1, 2, 3, 11, 12, 13).

b) Eozinofilní myeloproliferativní syndrom 8p11 (FGFR1 eozinofilní myeloproliferativní syndrom)

Myeloproliferativní syndrom 8p11 je známý pod označením *human stem cell leukemia/lymphoma syndrome*. Je asociován s mutací či translokací receptoru 1 fibroblastového růstového faktoru (*fibroblast growth factor receptor-1* FGFR-1).

Klinicky se tato myeloproliferace projevuje eozinofilií, myeloproliferativními a myelodysplastickými znaky, lymfadenopatií, zvýšeným výskytem současného maligního T-lymfomu. Nemoc má agresivní průběh.

7) Idiopatický hypereozinofilní syndrom (HES)

Termín idiopatický HES je vyhrazen pro případy zvýšeného počtu eozinofilů, u nichž nebyl prokázán klonální ani reaktivní původ. Definice HES je následující:

Počet eozinofilů v periferní krvi je $\geq 1,5 \times 10^9/l$ po dobu 6 měsíců, nebo do smrti způsobené důsledky eozinofilie.

Není přítomna jiná rozpoznatelná příčina hyper-eozinofilie.

Jsou příznaky orgánového poškození, například kardiomyopatie, hepatosplenomegalie, plicní poruchy, horečky, anémie, ale i neurologické poruchy.

Incidence hypereozinofilního syndromu je poměrně malá. Chorobou průměrně ročně onemocní jeden člověk z 200 000 obyvatel. Muži jsou postiženi 9x častěji než ženy. Nejvíce se manifestuje u lidí ve věku 20 – 50 let.

Častým nálezem u HES je postižení řady tkání a orgánů. Nejčastější je postižení srdce (58 %), případně mozku a periferních nervů (54 %). K příznakům HES tedy patří: eozinofilní endomyokardiální choroba (k poškození srdečního svalu dochází ve třech stádiích: 1) akutní nekrotické, 2) pozdější trombotické, 3) pozdní fibrotické stádium; první zánětlivé stádium je charakterizováno eozinofilní infiltrací endomyokardu; vznik poškození srdce není závislý na počtu eozinofilů) (13, 14), postižení centrálního nervového systému, trombembolická nemoc, plicní projevy (plicní infiltráty, které jsou prchavé, trvají od několika hodin do několika dní), postižení zažívacího traktu, postižení pohybového aparátu (bolesti svalů a kloubů), kožní postižení (např. kopřivkovitý výsev), postižení ledvin, postižení zraku (suché konjunktivitidy, episkleritidy a abnormality cév sítnice), imunologické poruchy (někdy extrémně zvýšené hladiny imunoglobulinu E).

8) Eozinofilie provázející další myeloproliferativní choroby

Eozinofilie může provázet chronickou myeloidní leukémií (CML), pravou polycytémií (PV), esenciální trombocytémií (ET) i primární myelofibrózu (PMF). Dále se může vyskytovat u chronické neutrofilní leukémie (CNL), neklasifikovatelných myeloproliferací, chronické myelomonocytární leukémie (CMML) i systémové mastocytózy (častá mutace genu *KIT*).

ZÁVĚR

Zvýšený počet eozinofilů může provázet velký počet chorob, z nichž některé jsou dobře, jiné hůře léčebně ovlivnitelné. V některých případech je eozinofilie zcela asymptomatická a je otázkou, zda se příznaky nemoci neobjeví až po několika letech trvání eozinofilie.

Každopáně každý nález zvýšeného počtu eozinofilů vyžaduje pečlivého vyšetření a pokud je rozpoznán patologický podklad tohoto zvýšení, tak i odpovídající léčbu.

2861. NOVÉ POHLEDY NA PREVENCI A LÉČBU ŽILNÍCH TROMBOEMBOLICKÝCH KOMPLIKACÍ U ONKOLOGICKÝCH PACIENTŮ

Hluší A., Krčová V. (HOK, FN, Olomouc)

Žilní tromboembolické komplikace (HŽT - hluboká žilní trombóza, PE - plicní embolie) patří k hlavním komplikacím maligních onemocnění a jsou druhou nejčastější příčinou smrti u této skupiny pacientů. Z celkového počtu pacientů postižených tromboembolickou nemocí (TEN) tvoří nemocní s nádorovým onemocněním asi 20-30 %. Nález TEN při autopsii byl zjištěn u více než 50 % zemřelých pro zhoubné nádorové onemocnění, za života byla přítom diagnóza HŽT či EP potvrzena u 15 % pacientů. Uvedené komplikace vedou nejen ke zkrácení přežívání, ale i k významnému zhoršení kvality života a mají významný vliv na další prognózu nemocných. Riziko TEN komplikací u onkologických pacientů je 7 násobně zvýšeno oproti nemocným bez nádoru, převyšuje tak riziko spojené s nejčastějšími vrozenými trombofilními stavy.

Patofyziologie vzniku TEN komplikací u pacientů s nádory je komplexní. Hyperkoagulační stav je spojen s aktivací endotelu zánětlivými cytokiny (např. TNF-alfa, IL-1, IL-6) uvolňovaných makrofágy po kontaktu s maligními buňkami. Endotel může být poškozován i přímo maligními buňkami. Prokoagulačně působí nadprodukce tkáňového faktoru, zvýšené hladiny FVIII, fibrinogenu, PAI-1. Trombogenně působí některé „cancer procoagulans“ uvolňované samotnými nádorovými elementy (např. tkáňový faktor či mucin u adenokarcinomů). Dále přispívá zvýšená adhezivita a agregabilita trombocytů, může se podílet i sekundární trombocytémie při malignitě. Významně se může podílet spontánní nebo chemo- či radioterapií indukovaný rozpad nádoru. Nezřídka se podílí i mechanický cévní útlak samotným nádorem. Riziko TEN dále navyšuje potřeba operačních zákroků. Trombofilní riziko narůstá při imobilizaci, cytostatické terapii, ozařování, hormonální nebo antiangiogenní léčbě, zavedení centrálního žilního přístupu či septických komplikacích. K vyjmenovaným faktorům se dále mohou přidružovat klasické vrozené i získané trombofilní stavy a působení dalších rizik vyplývajících z případné další komorbidity.

Individuální rizikový profil pacienta s nádorovým onemocněním se odvíjí od typu nádorového onemocnění, jeho pokročilosti (stádium), lokalizace nádoru vzhledem k možnému cévnímu útlaku, charakteru protinádorové léčby a dalších faktorech nesouvisejících s vlastním nádorem (věk, anamnéza prodělané TEN příhody, vrozená trombofilie, komorbidita, obezita, kardiální insuficience). K nejrizikovějším nemocným

patří pacienti s karcinomy pankreatu, plic, žaludku, střeva, tumory mozku, zvláště metastazující, dále lymfomy a myelomy. Postoperační riziko je nejvyšší u rozsáhlých resekcí výkonů, zejména v oblasti břicha a pánve. Vysoké riziko spojené s protinádorovou léčbou představují např. tamoxifen, cisplatina, L-asparagináza, thalidomid, antiangiogenní léky jako bevacizumab, sorafenib aj.

Indikace a kontraindikace antikoagulační terapie u pacientů s nádorovým onemocněním a žilními TEN komplikacemi se shodují s postupy u pacientů bez nádoru. Cílem antikoagulační léčby je zabránit progresi trombózy či embolie, předcházet jejich recidivám při minimalizaci rizika krvácivých komplikací. Oproti běžné populaci je antikoagulační terapie TEN u pacientů s nádory spojena jak se zvýšeným rizikem krvácení, tak s vyšším rizikem recidivy trombóz. Antikoagulační terapie je doporučena u všech pacientů s nádorovým onemocněním s novou i rekurentní HŽT a EP. Neléčená PE má 30% mortalitu, většinou z recidivy embolizace. U neléčené symptomatické HŽT je riziko plicní embolie 50%

Pro iniciační léčbu první epizody TEN u nádorových onemocnění jsou využívány nízkomolekulární hepariny (LMWH), fondaparinux, případně nefrakcionovaný heparin (UFH). Srovnávací studie u uvedených modalit nejsou. Extrapolací dat z klinických studií u neselektovaných pacientů vychází nejlepší poměr účinnosti a bezpečnosti pro LMWH, které jsou tak při iniciační léčbě jednoznačně doporučovány. Další výhody nízkomolekulárních heparinů jsou v příznivějších ekonomických parametrech, jednoduchém dávkování i možnosti ambulantní terapie. Lepší parametry přežívání u pacientů léčených LMWH vyvolaly vědecký zájem o možné přímé antineoplastické vlastnosti LMWH. Data srovnávající jednotlivé druhy LMWH dostupná nejsou, nejrozsáhlejší zkušenosti jsou s enoxaparinem, deltaparinem, tinzaparinem a nadroparinem. UFH bývá v uvedené indikaci využíván pouze okrajově. Použití fondaparinuxu může být výhodné u pacientů s anamnézou heparinem indukované trombocytopenie. Léčba pomocí nových antikoagulancií (NOAC) dabigatranem, rivaroxabanem, apixabanem, není t.č. pro nedostatek klinických dat u TEN a nádorových onemocnění v současnosti doporučována. I přes výrazně menší výskyt lékových interakcí ve srovnání s VKAs může jejich plasmatickou hladinu ve smyslu zvýšení i snížení ovlivňovat řada cytostatik a imunosupresiv.

Pro iniciační použití trombolýzy u pacientů s nádorovým onemocněním a extenzivní EP či HŽT není evidence dostatečná. Neexistují nicméně data, která by její použití vylučovala. Indikace trombolýzy by měla být

pečlivě individuálně zvážena s posouzením benefitu, bezpečnosti a rizik. Není doporučena pro pacienty s CNS postižením a přítomností dalších rizikových faktorů pro krvácení.

V dlouhodobé antikoagulační terapii TEN komplikací asociovaných s nádory a sekundární profylaxi jsou dle konsenzuálních doporučení (ACCP 2012, NCCN 2011, ASCO 2013) rovněž preferovány LMWH před antikoagulační terapií antagonisty vitamínu K (VKAs). Výsledky studií srovnávající uvedené modalitě po 3-6 měsících léčby prokázaly lepší účinnost LMWH v rekurenci HŽT. Meta-analýza 7 studií tyto závěry potvrdila s redukcí relativního rizika o 53 %. Výhody LMWH jsou známy: odpadá nutnost rutinní monitorace, nejsou lékové a potravinové interakce, kratší poločas je rovněž bezpečnostní výhodou. Mezi negativa LMWH patří vyšší ekonomická náročnost a injekční aplikace v porovnání s VKAs. Použití VKAs uvedená doporučení ponechávají pro případy, kde LMWH není dostupný. Doporučená cílová hladina INR je 2-3.

Délka antikoagulační léčby při první epizodě HŽT je minimálně 3-6 měsíců. Přínos dalšího pokračování nad toto období je třeba individuálně zvážit s pečlivým posouzením rizika rekurence TEN a rizika významných krvácivých komplikací. Posuzujeme, zda jde o trombózu provokovanou, výsledky biomarkerů, zobrazovacích metod, toleranci dosavadní léčby i preference pacienta. Pokračování v antikoagulační terapii je přínosné u pacientů s progresivní či metastazující malignitou nebo u pacientů v chemoterapii, u kterých není přítomno vysoké riziko krvácení. Volba antikoagulační léčby vychází ze zkušeností s dosavadní terapií. V případě prolongované terapie LMWH je třeba brát v úvahu i riziko osteoporózy.

Závažným klinickým problémem je rekurence TEN komplikací během antikoagulační léčby. V případě rekurence trombózy při subterapeutické hladině INR během terapie VKAs je možná přemostující léčba plnou dávkou LMWH s návratem k účinné perorální antikoagulační léčbě LMWH. Pokud dojde k recidivě trombózy při léčbě LMWH, eskaluje se dávka nízkomolekulárního heparinu o 20 až 25 %, účinnější může být dávkování LMWH 2 x denně. V případech rekurentních TEN komplikací je častěji využívána monitorace léčby pomocí anti-Xa.

Mezi specifické problémy pacientů s nádorovými chorobami a výskytem trombotických komplikací patří antikoagulační léčba u pacientů s renálním selháním, kteří vyžadují důslednou laboratorní monitoraci biochemických a koagulačních parametrů vč. anti-Xa při léčbě LMWH. Pro část pacientů může být vhodná i terapie UFH. Pro dlouhodobou léčbu je u této skupi-

ny pacientů za bezpečnou považována perorální léčba VKAs. Další specifickou skupinu pacientů představují nemocní s implantovanými kavafiltry. Jednoznačně doporučeny jsou u pacientů s akutní TEN komplikací a kontraindikací antikoagulační léčby. Nelze opomenout ani výskyt katetrových trombóz a žilních trombóz ve splachnickém řečišti, které jsou u pacientů s nádory též častější.

V klinické praxi se poměrně často setkáváme s případy incidentální HŽT, tzn. klinicky asymptomatické trombózy zjištěné při zobrazovacím vyšetření provedeném z jiného důvodu (nejčastěji v rámci stážování nádorové choroby). Výskyt těchto případů je dle některých studií více než 50%. Nález incidentální TEN příhody zhoršuje prognózu i kvalitu života pacientů. Pokud není kontraindikace, měla být i v těchto případech zahájena plná antikoagulační léčba.

Management antikoagulační léčby TEN u nádorových onemocnění u pacientů s vysokým rizikem krvácení patří mezi nejsložitější klinické situace. U těchto nemocných je třeba individuálně zhodnotit míru rizika krvácení se zohledněním stadia a typu malignity, potřebné délky antikoagulační léčby, potřeby invazivních zákroků, přítomnosti či pravděpodobnosti rozvoje trombocytopenie, výchozích koagulačních parametrů, jaterní insuficience, rizika sepse a DIC. Zhodnotit je třeba přítomné i potenciální zdroje krvácení a dle možností je sanovat. V přítomnosti menších krvácivých komplikací lze vést plnou antikoagulační léčbu za její důsledné monitorace. V případě absolutní kontraindikace antikoagulační terapie je doporučeno zvážit implantaci kavální filtru. V případě trombocytopenie je za bezpečnou hranici považován počet Tr nad $50 \times 10^9/l$. U hodnot nižších nebo při významném riziku krvácení z jiných příčin lze léčit sníženou dávkou LMWH. VKAs jsou u vysoce rizikových pacientů nevhodné.

Stejně jako správně vedená antikoagulační léčba u pacientů s nádory a TEN komplikacemi snižuje morbiditu a mortalitu, tak indikované podání antikoagulační profylaktické léčby je pro pacienty obrovským přínosem a jejich kvalitu života i přežívání ovlivňuje ještě výrazněji. K primární profylaxi jsou používány většinou LMWH, své místo má rozhodně i fyzikální prevence. Ke stanovení rizika TEN a indikaci profylaxe jsou k dispozici prediktivní modely; např. Khoranův bodový systém jako rizikové faktory hodnotí tumory pankreatu, žaludku, lymfomy, karcinom plic, gynekologické tumory, počet Tr nad $350 \times 10^9/l$, hemoglobin od 100 g/l, použití léků stimulujících erythropoesou, leukocytozu nad $11 \times 10^9/l$, BMI nad 35. Samozřejmostí je perioperační profylaxe chirurgických zákroků. Běžná doba profylaxe je kolem dvou týdnů nebo do plné mobilizace a do

dimise. U rozsáhlých výkonů v oblasti pánve a břicha se prodlužuje až na 4 týdny i po propuštění pacienta. Rovněž pacienti s malignitou hospitalizovaní z nechirurgického důvodu by profylakticky být zajištěni měli. Paušální profylaxe u ambulantních pacientů v chemoterapii doporučena není. Těžít z ambulantní profylaxe mohou pacienti s metastatickým nebo lokálně pokročilým tumorem v chemoterapii s nízkým rizikem krvácení. Profylaxe je rutinně doporučena pro

pacienty s mnohočetným myelomem léčených IMiDs (thalidomid, lenalidomid). Přínos primární ambulantní profylaxe by měl být individuálně hodnocen opakovaně v průběhu léčby malignity se zohledněním vývoje samotného nádorového onemocnění, komplikací, komorbidit, výskytu přídatných trombofilních stavů či rizikových faktorů a aktuálního rizika krvácení.

Podpořeno grantem IGA- LF 2016-001.

POSTGRADUÁLNÍ SEKCE 1

2975. SOUČASNÉ MOŽNOSTI A NOVÉ PERSPEKTIVY V LÉČBĚ MNOHOČETNÉHO MYELOMU

Špička I., Straub J., Pohlreich D., Klánová M. (I. interní klinika, 1. LF UK a VFN, Praha)

Mnohočetný myelom (MM) musíme i v současné době považovat za většinou nevléčitelné onemocnění. Také se však jedná o malignitu, u které lze vývoj léčby ve 21. století označit za převratný. Historii léčby MM můžeme rozdělit do 4 fází. Téměř 40 let trvala fáze konvenční chemoterapie se „zlatým standardem“ - kombinací melfalanu a prednisonu. Pětileté přežití bylo lehce vyšší než 10% a více než 95% pacientů umíralo během 10 let (1). Fází druhou je zavedení jednoho či dvou cyklů autologní transplantace kmenových buněk (ATKD) v 90. letech, které vedlo k 5-letému přežití u cca 30% pacientů a dlouhodobější kontrole choroby u méně než jedné čtvrtiny (2). ATKD se stala (a zatím zůstává) standardem léčby, použitelným však u méně než poloviny pacientů.

Teprve třetí fáze znamenala podstatnou změnu účinnosti léčby pro všechny nemocné s MM. Díky tzv. novým či cíleným lékům, inhibitoru proteazomu (PI) bortezomibu a imunomodulačním lékům (IMiD) - thalidomidu a lenalidomidu, se MM změnil z jednoho z nejméně prognosticky příznivých hematologických nádorů na potenciálně dlouhodobě kontrolovatelnou malignitu s možností vyléčení alespoň části pacientů (3). Pětiletého přežití (ve velkých klinických studiích) dosahuje až 50% nemocných.

Současnost můžeme označit za 4., opět zřejmě převratnou fázi v historii MM. Kombinované režimy, ať již s preparáty 1. generace nebo novějšími, vedou u mladších pacientů téměř k 100% terapeutické odpovědi s nadpoloviční většinou kompletních remisí (jeden z hlavních prognostických ukazatelů) ještě před provedením ATKD. V současné době je podle některých

autorů doba 10 let nikoli maximální dobou života, ale predikovaným mediánem doby přežití pacientů s MM. Na druhé straně je však nutné uvést, že výsledky léčby v běžné klinické praxi nedosahují těch uváděných v rámci klinických studií. Prokázala to např. nedávná analýza v ČR (4).

SOUČASNÁ SITUACE

Léčba pacientů mladších 65 let (resp. 70 let v dobrém klinickém stavu) zahrnuje režimy s novými léky ve dvoj- či častěji trojkombinacích, přičemž cílem indukční terapie je dosažení co nejrychlejší a nejhlubší odpovědi před ATKD. Základem je režim bortezomib + dexamethason (VD) (5), ke kterému je nejspíše ideální přidat lenalidomid. Mimo klinické studie však tato kombinace zatím není často schválena, proto je nejčastěji jako třetí lék užíván thalidomid či cyklofosfamid (podle různých autorů s rozdílnou i obdobnou účinností). Indukce by měla být krátká (tj. obvykle 4 cykly) a u všech pacientů, kdy je to možné, by měla být provedena ATKD. Léčba na bázi bortezomibu může překonat také nepříznivý vliv některých cytogenetických změn - např. t(4;14).

Pro který postup se rozhodneme po ATKD, záleží na dosažené léčebné odpovědi - pacienty s alespoň velmi dobrou částečnou odpovědí (VGPR) lze dále pouze sledovat, nebo zahájit udržovací léčbu (povolen v ČR je zatím thalidomid), u pacientů s horší léčebnou odpovědí se provádí konsolidační léčba - nejčastěji druhá transplantace či několik cyklů kombinované terapie (v některých protokolech obě varianty). Účelem konsolidace je zvýšení hloubky odpovědi, udržovací léčba pak má vést k dlouhodobé kontrole onemocnění.

U nemocných pro ATKD nevhodných je v 1. linii hlavní kombinací VMP (Velcade, Melfalan, Prednison). Režim VMP se stal součástí standardních doporučení na základě studie VISTA. Medián doby do progresu (TTP, primární cíl studie) byl 24 měsíců ve skupině MPV

proti 16,6 měsíců u kontrol ($P < 0,001$). Výrazné zlepšení efektu terapie bylo nezávislé na všech zkoumaných prognostických faktorech: věku, pohlaví, regionu, úvodní hodnotě beta-1 mikroglobulinu, albuminu, klinickému stádiu dle ISS („International Staging System“) a clearance kreatininu. (6)

Uvedené postupy, standardně používané v ČR (a řadě, nikoli však všech vyspělých zemích) v posledních cca 10 letech vedou u části pacientů k dlouhodobé remisi, zatím je však pro tuto éru tvrzení o trvalém vyléčení problematické. Proto bylo dalším dílčím cílem prodloužení dosažené remise pomocí udržovací terapie. Ta je v případě MM, právě z důvodů dlouhodobě neuspokojivých výsledků, staronovým tématem. Její historii není možné ani nutné představovat, zkráceně lze pouze uvést, že kromě velmi malého přínosu IFN-alfa (při vysokém výskytu nežádoucích účinků) nebyl identifikován efekt jakéhokoli ze zkoušených postupů. I v této oblasti situaci změnila nová léky, v současnosti zejména IMIDy. Zatímco dlouhodobé podávání thalidomidu není z důvodu vysokého rizika vedlejších účinků (hlavně neuropatie) možné, trvalé nebo alespoň několikaleté podávání lenalidomidu (spolu s dexametazonem) již podmínky efektivní udržovací léčby splňuje (signifikantní prodloužení doby remise, relativní bezpečnost, snadná aplikace). Na tuto skutečnost upozornily v krátkém časovém rozmezí (výsledky byly prezentovány během 2 let) tři randomizované klinické studie. Ve studii CALGB 100104 vedla udržovací terapie k významnému snížení rizika úmrtí a prodloužení doby do progresu (48 vs. 30,9 měs.) bez ohledu na to, zda bylo předchozí vysokodávkovanou léčbou dosaženo kompletní remise či nikoli (7). Obdobně ve dvojité slepé studii IFM 2005-02 došlo u transplantovaných pacientů s udržovací léčbou lenalidomidem k prodloužení doby do progresu (PFS) na dvojnásobek proti skupině kontrolní (42 vs. 24 měs.) (8). Ve třetí ze studií, která zkoumala efekt tohoto postupu u nemocných k ATKD nevhodných (MM-015), snížila dlouhodobá léčba riziko progresu o 69% (hazard ratio [HR], 0,314; $p < 0,001$) proti placebo skupině se stejnou indukční léčbou a vedla k prodloužení PFS ve 2 letech (55% vs. 16%) (9). Zatímco téměř dvojnásobné prodloužení PFS prokázaly všechny 3 studie, efekt na celkovou dobu přežití dlouhodobě potvrzují pouze dvě z nich (nikoli francouzská IFM). Z hlediska klinické praxe je nutno upozornit, že udržovací léčba lenalidomidem byla v EU z administrativních důvodů schválena se značným zpožděním proti USA, ale její rutinní užití by mělo být otázkou krátkého času.

Rozbor možností léčby relabující nemoci je samozřejmě samostatná kapitola. Zkráceně můžeme jen konstatovat, že pomocí střídání různých druhů cíle-

ných léků v řadě kombinací lze dosahovat opakovaných remisí (i když podstatně kratšího trvání) a prodloužení celkového přežití s uspokojivou kvalitou života je dosaženo nezářídka více než 5 liniemi terapie.

BLÍŽKÁ BUDOUCNOST

Současná 4. etapa léčby MM souvisí s vývojem dalších léků, ze kterých zmíníme pouze ty, které již prokázaly svoji účinnost v klinických studiích fáze 3 a jsou v různých fázích procesu schvalování regulačními úřady. Lze je rozdělit do 3 skupin: a/ léky nové generace PI a IMIDů, jež vykazují vyšší účinnost, menší toxicitu a zachovávají si efekt i pro nemocné resistantní na první generaci těchto preparátů b/ monoklonální protilátky c/ ostatní. Proteazomový inhibitor 2. generace carfilzomib je schválený pro klinickou praxi v USA a nově i EU. V multicentrické, randomizované studii fáze 3 u relabujících pacientů – ASPIRE – byla doba do progresu ve skupině CRd (carfilzomib, revlimid, dexametazon) významně delší proti skupině Rd (medián, 26,3 měsíců vs. 17,6 měsíců, $P = 0,0001$) (10). Ve studii přímo srovnávající účinnost nového PI a jeho předchůdce došlo k dvojnásobnému prodloužení PFS (18,7 měs. vs 9,4 měs., hazard ratio [HR] 0,53 [95% CI 0,44-0,65]; $p < 0,0001$) (11). Dytfeld et al uvádí dosažení alespoň parciální remise u 100% pacientů s nově diagnostikovaným MM po režimu CRd (12). Na trhu je také první perorální PI – ixazomib (MLN9708). Pomalidomid je IMID třetí generace, účinný u téměř poloviny pacientů rezistentních jak na lenalidomid, tak bortezomib (13). K monoklonálním protilátkám, které zřejmě dále významně změní efektivitu léčby MM (proti nehodgkinským lymfomům se 30-letým zpožděním) patří elotuzumab a daratumumab. Léky z další skupiny – inhibitory histon-deacetylázy (HDACi) či aplidin jsou účinné zejména pro svůj potenciální účinek spolu se jmenovanými dříve (14). HDAC inhibitory mají synergický efekt s PI v indukci apoptózy a autofágie u řady nádorů. Pro klinickou praxi je v USA schválený panobinostat, mnoho se čeká od preparátů nové generace, např. ricolinostat. Výčet perspektivních léčebných postupů musí obsahovat i téma cílené imunoterapie, kde vedle dlouhodobě zkoumané vakcinace se stále častěji zmiňují (jako u NHL či CLL) chimerními antigenními receptory modifikované T buňky (CARs-T).

FILOZOFICKÉ ASPEKTY SOUČASNÉ SITUACE V LÉČBĚ MM

První převratná fáze v moderní léčbě myelomu byla spojena s identifikací 2 skupin léků (PI a IMIDů) se zcela odlišným mechanismem účinku proti do té doby užívané chemoterapii. Současná druhá „revoluce“

je charakterizovaná nejen vývojem nových generací těchto preparátů (které přináší v různé míře zvýšení účinnosti, možnost překonání rezistence na starší varianty, zvýšení bezpečnosti či komfortu léčby), ale hlavně dalším významným rozšířením spektra účinných léků. Při známé více-klonální povaze MM je tento faktor zvláště důležitý. Prvním důsledkem je možnost užití širších kombinací již od úvodních fází terapie bez dřívějšího rizika, že tím vyčerpáme všechny účinné postupy. Druhým je samozřejmě využití v případě rezistence na „standardní“ nové léky. Třetím je pak rozšíření indikací, hlavně do ranějších fází onemocnění – asymptomatického, resp. doutnajícího myelomu.

Odvracenou stranou současné situace je fakt, že vzhledem k vysokým nákladům se po dlouhé době začínají rozevírat nůžky dostupnosti léčby v různých zemích či oblastech podle jejich ekonomické výkonnosti nebo zdravotnického systému. Začátkem tohoto trendu bylo pozdní schválení carfilzomibu a udržovací léčby lenalidomidem v EU proti USA, pokračováním pak schválení 4 nových preparátů zatím jen FDA (daratumumab, elotuzumab, panobinostat, ixazomib). Tato situace je široce diskutována i v ekonomicky nejvyspělejších státech EU. Kromě jiných aspektů tím z vědeckého hlediska roste tlak na přesnější určení místa nových preparátů do klinických standardů, ať ve smyslu fáze léčby či identifikace správných skupin pacientů („tailored therapy“). Tato snaha se jistě bude s rozšiřujícím se spektrem léků dále stupňovat, jasným cílem pak bude léčba individualizovaná. Odráží to například současné snahy o identifikaci přesnějších prognostických systémů (R-ISS a další) (15). Výčet postupů, metodik a jejich přínosu pro individualizaci léčby MM přesahuje rámec tohoto sdělení.

Souhrnem lze říci, že díky zavedení cílených léků v léčbě MM znamená jeden z nejvýznamnějších pokroků v onkologii za posledních 15 let. Zcela se změnilo paradigma léčby této dříve prognosticky velmi nepříznivé malignity a přežití pacientů se nejméně dvojnásobilo. Od současné druhé „vlny“ nových léků se očekává, že myelom bude patřit mezi potenciálně vyléčitelné onemocnění pro významnou část nemocných. Na druhé straně zůstává neřešitelným problémem primárně resistantní forma MM - potvrzením je nedávné doporučení transplantologických společností zvážit (u MM dosti nepopulární) alogenní transplantaci u všech vhodných pacientů s dobou remise méně než 2 roky po ATKD a/nebo nepříznivými prognostickými faktory (cytogenetika, extramedulární choroba, plazmablastická leukémie, vysoká hodnota LD) (16).

LITERATURA:

- 1/ Boyle P, Ferlay J: Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 16:481-488, 2005
- 2/ Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM et al. (1996). A prospective randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med*, 335(2): 91-7.
- 3/ Barlogie B, Mitchell A, van Rhee F, Epstein J, Morgan GJ, Crowley J. Curing myeloma at last: defining criteria and providing the evidence. *Blood*. 2014 Nov 13;124(20):3043-51. doi: 10.1182/blood-2014-07-552059. Epub 2014 Oct 7.
- 4/ Roman Hájek,¹² Jiri Jarkovsky,³ Maisnar V,⁴ Pour L,⁵ Spicka I et al.: Survival and treatment patterns in patients with symptomatic multiple myeloma (MM) in a real-world setting. Bude prezentováno EHA, 2016
- 5/ Harousseau JL., Mathiot C., Attal M. et al.:Velcade/dexamethasone versus VAD as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in newly diagnosed patients:updated results of the IFM 2005/01 (abstract). *Blood*,2007;110, abstr.139
- 6/ San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A, Samoilova OS, Dmoszynska A, Abdulkadyrov KM, Schots R, Jiang B, Mateos MV, Anderson KC, Esseltine DL, Liu K, Cakana A, van de Velde H, Richardson PG; VISTA Trial Investigators: Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2008 Aug 28;359(9):906-17.
- 7/ McCarthy PL, Owzar K, Anderson KC, et al. Phase III intergroup study of lenalidomide versus placebo maintenance therapy following single autologous hematopoietic stem cell transplantation (ahsct) for multiple myeloma: CALGB 100104. *Blood* 2010;116: abstract 37.
- 8/ Attal M, Lauwers-Cances V, Marit G, Caillot D, Moreau P, Facon T, Stoppa AM, Hulin C, Benboubker L, Garderet L, Decaux O, Leyvraz S, Vekemans MC, Voillat L, Michallet M, Pegourie B, Dumontet C, Roussel M, Leleu X, Mathiot C, Payen C, Avet-Loiseau H, Harousseau JL; IFM Investigators. Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2012 May 10;366(19):1782-91. doi: 10.1056/NEJMoa1114138
- 9/ Palumbo A, Hajek R, Delforge, et al. (2012) Continuous lenalidomide treatment for newly diagnosed multiple myeloma. *N Engl J Med* 366: 1759-1769.
- 10/ Stewart AK, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Masszi T, Špička I, Oriol A, Hájek R, Rosiñol L, Siegel DS, Mihaylov GG, Goranova-Marinova V, Rajnics P, Suvorov A, Niesvizky R, Jakubowiak AJ, San-Miguel JF, Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2015 Jan 8;372(2):142-52. doi: 10.1056/NEJMoa1411321. Epub 2014 Dec 6.
- 11/ Dimopoulos, Meletios A.; Moreau, Philippe; Palumbo, Antonio; et al. Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study *LANCET ONCOLOGY* Volume: 17 Issue: 1 Pages: 27-38 Published: JAN 2016
- 12/ Dytfeld D, Jasielc J, Griffith KA, et al. Carfilzomib, lenalidomide, and

- low-dose dexamethasone in elderly patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Haematologica*. 2014;99(9):e162-164.
- 13/ Lacy MQ¹, Allred JB, Gertz MA, Hayman SR, Short KD, Buadi F, Dispenzieri A, Kumar S, Greipp PR, Lust JA, Russell SJ, Dingli D, Zeldenrust S, Fonseca R, Bergsagel PL, Roy V, Stewart AK, Laumann K, Mandrekar SJ, Reeder C, Rajkumar SV, Mikhael JR. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone in myeloma refractory to both bortezomib and lenalidomide: comparison of 2 dosing strategies in dual-refractory disease. *Blood*. 2011 Sep 15;118(11):2970-5. doi: 10.1182/blood-2011-04-348896. Epub 2011 Jun 20.
- 14/ Mitsiades CS, Davies FE, Laubach JP, Joshua D, San Miguel J, Anderson KC, Richardson PG.: Future directions of next-generation novel therapies, combination approaches, and the development of personalized medicine in myeloma. *J Clin Oncol*. 2011 May 10;29(14):1916-23. doi: 10.1200/JCO.2010.34.0760. Epub 2011 Apr 11.
- 15/ Palumbo A¹, Avet-Loiseau H¹, Oliva S¹, Lokhorst HM¹, et al.: Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 10;33(26):2863-9. doi: 10.1200/JCO.2015.61.2267. Epub 2015 Aug 3.
- 16/ Giralt S¹, Garderet L², Durie B³, et al. American Society of Blood and Marrow Transplantation, European Society of Blood and Marrow Transplantation, Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, and International Myeloma Working Group Consensus Conference on Salvage Hematopoietic Cell Transplantation in Patients with Relapsed Multiple Myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Dec;21(12):2039-51. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.09.016. Epub 2015 Sep 30.

2857. STATE OF THE ART 2016: DIAGNOSIS AND TREATMENT OF LIGHT CHAIN AMYLOIDOSIS

Schönland S. (*Medizinische Universitätsklinik, Universitätsklinikum, Heidelberg – D*)

Abstrakt sdělení není k dispozici.

WIEDERMANNOVA PŘEDNÁŠKA

2867. OHLÉDNUTÍ ZA 30 ROČNÍKY OHD, PRAVIDELNÉ HEMATOLOGICKÉ AKCE S NEJDELŠÍ TRADICÍ V ČR V KONTEXTU OLOMOUCKÉ HEMATOLOGIE

Indrák K. (*HOK, FN, Olomouc*)

Abstrakt sdělení není k dispozici.

2990. CHANGING LANDSCAPE OF ALLOGENEIC DONOR HEMATOPOIETIC CELL TRANSPLANTATION: IMPACT OF DONOR CHOICE, CONDITIONING AND DISEASE STATUS ON TRANSPLANT DECISIONS

Bachanová V. (*Division of Hematology, Oncology and Transplantation University of Minnesota, Minnesota – USA*)

The fundamental goal of successful allogeneic transplantation is to deliver potent immune mediated anti-tumor responses while mitigating graft-versus-host disease and infectious complications. Transplant-related mortality and relapse continue to be the largest hurdles facing patients following allograft. Recent advances and controversies using reduced intensity conditioning platform and alternative graft sources such as HLA-haploidentical related donors and umbilical cord blood to treat adult malignancies will be discussed. Disease status and minimal residual disease impacts on relapse and survival and should be considered in decision making particularly for acute leukemia. We will also exploit the evolving use of immunotherapeutic strategies including combinations of allograft with NK cell infusions, pathogen-specific T cells, Treg manipulations, and chimeric antibody receptor T cells.

POSTGRADUÁLNÍ SEKCE 2

2967. MANTLE CELL LYMPHOMA: GOOD TIME FOR A CHANGE

Le Gouill S., Chiron D., Callanan M. (*Service d'hématologie clinique CHU de Nantes, Nantes – F; Team 10, UMR 892, IRCNA INSERM, Nantes – F; Centre de recherche Université Grenoble Alpes / Inserm U1209 / CNRS UMR 5309, Institut Albert Bonniot, Grenoble – F*)

Mantle cell lymphoma (MCL) represents 5–10% of all lymphomas, its annual incidence is 0.45/100,000 persons. Despite major therapeutic progresses, MCL remains incurable. A recent epidemiological national survey showed that median overall survival (OS) of French MCL patients is only 40 months (1). This highlights the need for new therapeutic options but also the need of a change in the way we treat MCL patients.

Induction immuno-chemotherapy including high-dose cytarabine followed by autologous stem cell transplantation (ASCT) consolidation is recommended for young patients while elderly patients should be treated with R-CHOP followed by Rituximab maintenance (2). For elderly, the use of bendamustine upfront is also recommended in some countries. More than 80% of patients reach complete remission (CR) at end of therapy (EOT) but all patients eventually experience iterative relapses and response duration decreases from one salvage therapy to the next. At relapse, a new line of immunochemotherapy or new drugs such as Ibrutinib, bendamustine, Velcade, Temsirolimus alone or in combination with other chemotherapies are proposed. Allogeneic stem cell transplantation for young, fit patients are the only curative procedure. Prospective Phase II-III trials conducted by the LYSA group and or the EU MCL network shows that there are 3 prognostic groups of patients: a high-risk (HR) group of 15–20% of patients having a duration of response <1yr after EOT; an intermediate-risk (IG) group that includes patients remaining in response one year after EOT but with an incidence of relapse of 10–15%/yr thereafter; and a low-risk (LR) group of nearly 30% of patients who reach CR for more than 5 years but that remain at risk of late relapse (2), (Le Gouill ASH 2014, Hermine O et al, *Lancet in revision*). It is not currently possible to classify patients, at the time of diagnosis, into one of these 3 risk-groups and thus to treat patients according to risk factors. The MIPI score and its biological variant (bio-MIPI) are the most widely used prognostic scoring systems. Both classify patients according to clinical (age and disease

stage) and biological (lymphocyte count, LDH level, percentage of KI67 pos cells) parameters (3). These scores have major limitations in clinical practice and were not designed to decide treatment strategy.

New tools in MCL. Minimal residual disease (MRD) detection using qPCR directed to clonogenic V(D)J rearrangements is a powerful tool for prediction of response duration. In line with findings by the EU-MCL network (4), a LYSA work confirms that molecular response is a strong prognostic marker for response duration (Callanan, Abstract 338, ASH 2015). A drawback with current MRD strategies, is that 10% of patients cannot be monitored (no MRD target) and MRD responses are defined according to quantitative criteria without regard to the initial molecular features of the MCL cells. Screening for loss-of-function mutations in DNA repair checkpoint-encoding genes, (ex TP53 and CDKN2A) could identify HR patients (Delfau-Larue, Blood). However, this requires validation in larger independent patient series and is not yet utilized for risk stratification.

[(18)F]Fluorine-Deoxyglucose Positron Emission Tomography (PET) has changed response assessment and therapy strategy in many lymphoma entities, but not in MCL where PET imaging has not been studied (5). PET imaging is also poised to contribute new insights into MCL pathogenesis since increasing evidence points to metabolic cues as key integrators of genetic and epigenetic adaptation in tumours and to identify patients susceptible to respond agents that target metabolic signaling. However, few is known today about how to use PET in MCL.

New drugs in MCL. New drugs that target BCR signaling, Bcl-2 family proteins, the mTOR, PI3K or NFκB pathways are under investigation in phase I/II/III clinical trials in MCL. These drugs are showing promise but treatment resistance is problematic. For example, Ibrutinib a first-in-class BTK inhibitor approved for clinical use in relapse/refractory (R/R) patients, induces response rates of 70% but 30% of patients are refractory to therapy (6). Point mutations in BTK have been described in a subset of MCL patients with acquired resistance to Ibrutinib (7) while activation of the alternative NF-κB pathway may be linked to *de novo* Ibrutinib resistance (8). Targeted therapies may also be responsible for clonal selection that can ultimately jeopardize patient outcome, suggesting that targeting of a single target is probably not the solution to cure patients (Martin, Blood).

MCL represents a challenge for clinicians and researchers. New drugs are already available, new tools (FDG-PET, MRD ..) are ready to use in everyday clinical practice but the complexity of the disease (9) requires to change the treatment dogma. We need to identify theranostic markers, to better predict patients' outcome, to understand resistance of MCL cells etc ... The presentation of Prof. Le Gouill will present the new advances in MCL and discuss how to change the treatment dogma in order to propose a tailored personalized approach.

REFERENCES

1. C. Leux *et al.*, Mantle cell lymphoma epidemiology: a population-based study in France. *Annals of hematology* **93**, 1327 (Aug, 2014).
2. H. C. Kluijn-Nelemans *et al.*, Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma. *The New England journal of medicine* **367**, 520 (Aug 9, 2012).
3. E. Hoster *et al.*, A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* **111**, 558 (Jan 15, 2008).
4. C. Pott *et al.*, Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. *Blood* **115**, 3215 (Apr 22, 2010).
5. S. F. Barrington *et al.*, Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **32**, 3048 (Sep 20, 2014).
6. M. L. Wang *et al.*, Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *The New England journal of medicine* **369**, 507 (Aug 8, 2013).
7. D. Chiron *et al.*, Cell-cycle reprogramming for PI3K inhibition overrides a relapse-specific C481S BTK mutation revealed by longitudinal functional genomics in mantle cell lymphoma. *Cancer discovery* **4**, 1022 (Sep, 2014).
8. R. Rahal *et al.*, Pharmacological and genomic profiling identifies NF-kappaB-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nature medicine* **20**, 87 (Jan, 2014).
9. S. Bea *et al.*, Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 18250 (Nov 5, 2013).

2895. SOUČASNÉ MOŽNOSTI LÉČBY CHRONICKÉ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE

Papajík T., Urbanová R., Turcsányi P., Procházka V. (Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc)

Chronická lymfocytární leukémie (CLL), jedno z nejčastějších nádorových onemocnění krve tvořící tkáň s incidencí zhruba 4 – 5 případů na 100.000 obyvatel

a rok, postihuje převážně muže (poměr mužů a žen - 1,7 – 2,0 : 1). Medián věku při diagnóze činí zhruba 71 let a více jak 2/3 z nemocných je starších 65 let. Převážná většina nově diagnostikovaných je zcela asymptomatická a nachází se v počátečním stádiu onemocnění (stádium A dle Bineta). Tito nemocní jsou dle platných mezinárodních doporučení sledováni (NCI-WG, IWCLL 2008) a léčba je zahajována až v případě symptomatické, aktivní choroby či u pacientů v pokročilém stádiu choroby.

Posouzení biologického stavu nemocného a jeho výkonnosti, zhodnocení genetické podstaty choroby a stanovení prediktivních faktorů představují zásadní faktory pro výběr vhodné a účinné primární terapie. Průměrná doba od diagnózy k zahájení terapie dosahuje 4 – 5 let, a tak většina těch, kteří vyžadují léčbu, je starších 70 let. U značné části pacientů nacházíme nejméně jednu, častěji však více přidružených chorob, tyto jedinci mají věkem snížené funkční kapacity klíčových orgánů (ledviny, játra, srdce, kostní dřeň), omezeny některé z aktivit denního života a někteří mají dokonce přítomen jeden či více závažných geriatrických syndromů. Tyto faktory limitují náš výběr terapie a také cíle, jichž má terapie dosáhnout (remise choroby s prodloužením bezpříznakového období a celkového přežití či jen potlačení symptomů a zajištění kvality zbývajícího života).

Naštěstí revoluce v oblasti výběru účinných léčebných možností v poslední dekádě umožňuje použití pro většinu pacientů a situací, v nichž se nachází, odpovídající typ a intenzitu terapie. U mladších nemocných je standardem iniciální léčby kombinace fludarabinu, cyklofosfamidu a rituximabu (FCR). Tato terapie dokázala významným způsobem zvýšit počet kompletních léčebných odpovědí (CR; 44 % vs 22 %), prodloužit období bez progresu choroby (PFS; 56,8 vs 32,9 měsíce) a celkové přežití (OS; 86 měsíců vs medián nedosažen) sledovaných jedinců (studie CLL8). Z dlouhodobé analýzy studie je patrné, že z léčebné kombinace FCR mají výrazně větší prospěch pacienti s mutovaným stavem genů pro těžké řetězce imunoglobulinů (IGHV), kde křivka OS dosahuje náznaku dlouhodobé stabilizace (plateau) u více než 80% pacientů, zatímco pro nemocné s nemutovaným stavem IGHV je tato léčba významně méně účinná. Také je nutné zmínit, že 26% pacientů léčených FCR nedokončilo plánovanou léčbu a u téměř poloviny nemocných byla intenzita terapie redukována o více než 10%. Infekce se vyskytly u 25% léčené populace, jejich častější výskyt byl pozorován u nemocných starších 65 let. Také výskyt sekundárních nádorů (13,1%) spojený s kombinací FCR není zanedbatelný.

Ve snaze nabídnout širší skupině pacientů účinnou a přitom méně toxickou léčbu byl v řadě studií testován režim zahrnující bendamustin a rituximab (BR), který byl posléze ve fázi III studie porovnán s FCR (CLL 10). I když celkový počet CR (47 % vs 38 %) a délka PFS (85 % vs 78 % ve 2 letech) hovoří ve prospěch kombinace FCR, při detailnější analýze je patrné, že výhoda této léčby oproti BR je vyhrazena pro pacienty mladšího věku s nemutovaným stavem IGHV. Na druhé straně pacienti staršího věku (nad 65 let) a nemocní s mutovaným stavem IGHV dosahují stejných výsledků jak při použití FCR, tak i BR, který má však nižší toxicitu (neutropenie 56,8 % vs 81,7 %; infekce 26,5 % vs 47,4 %) ve srovnání s fludarabinovým režimem.

Nicméně i nežádoucí účinky terapie BR jsou limitujícím faktorem pro jeho použití u starších a komorbidních nemocných s CLL. U této skupiny pacientů prokázalo velmi dobré výsledky spojení anti-CD20 protilátky nové generace s konvenčním alkylačním cytostatikem (obinutuzumab a chlorambucil, GC). Data fáze III studie (CLL 11) potvrdila vyšší účinnost GC oproti léčbě rituximabem a chlorambucilem, a to v parametrech dosažení CR (22,3 % vs 7,3 %) a délky PFS (26,7 vs 16,3 měsíce) při podobném výskytu a tíži infekčních komplikací u obou léčebných možností.

Všechny zmíněné režimy imunochemoterapie (FCR, BR, GC) však mají značně omezenou účinnost u nemocných, jejichž nádorové buňky nesou ve svém genomu delecii 17p- či mutaci genu TP53. Zhruba 5 - 10 % nově diagnostikovaných nemocných s CLL má monoalelickou delecii 17p-, druhá alela genu TP53 bývá mutovaná a nefunkční. Dalších téměř 5 % jedinců má gen TP53 mutovaný, a to bez strukturálních změn oblasti 17p. Navíc je nutné poznamenat, že u 25 % nemocných v počátečních stádiích onemocnění, kteří nejsou léčeni, dochází během 5 let sledování k evoluci leukemického klonu a zhruba 1/3 nově zjištěných genetických změn ovlivňuje dráhu TP53 (17p-, 11q-). Nemocné se změnami 17p-/TP53 můžeme označit jako velmi rizikové (ultra-high-risk) s výrazně omezenou citlivostí k imunochemoterapii, resp. krátkým mediánem do opětovné progresse onemocnění (obvykle kratší než 1 rok). U těchto nemocných je v současné době indikována terapie inhibitory přenosu signálu z B-buněčného receptoru (BCR) - ibrutinibem (blokátor Brutonovy tyrosinkinázy) a idelalisibem (blokátor p 110 delta izoformy fosfatidylinositol 3-kinázy) v kombinaci s rituximabem. Fáze II studií totiž prokázaly vysoce příznivý profil účinnosti jak ibrutinibu, tak idelalisibu v primoléčbě nemocných s CLL a 17p-/mutací TP53, s vysokým počtem léčebných odpovědí a dlouhým intervalem PFS, jehož mediánu zatím nebylo dosaženo. Nicméně malé procento CR

a klesající charakter křivky PFS naznačují, že - zejména pro mladší nemocné - nebude ani tato léčba dostatečnou zárukou dlouhodobého přežití. Naději na zlepšení prognózy či dokonce trvalé vyléčení stále přináší jen alogenní transplantace krvetvorných buněk od HLA-shodného dárce. Alternativním řešením v budoucnosti může být použití nových léků a jejich kombinací či terapie T-lymfocyty namířená proti antigennímu receptoru CD19.

Jak je z výše uvedeného textu patrné, většina nemocných s CLL po iniciální léčbě relabuje a dostává se do fáze aktivního onemocnění, vyžadujícího započítání další linie terapie. Relapsy stran doby vzniku a také jejich závažnosti (rizika) můžeme obecně dělit na časné a pozdní. V obou případech je nutné před započítáním další linie léčby vyšetřit genetický profil nádorových buněk (cytogenetika, fluorescenční in situ hybridizace, stanovení mutací genů TP53, ATM, SF3B1, BIRC3, NOTCH1) a strategii léčby upravit zejména dle přítomnosti 17p-/mutace TP53. Časný relaps choroby po úvodní terapii založené na fludarabinu (trvání remise kratší než 3 roky) byl do nedávné minulosti spojen s velmi špatnou prognózou a krátkým OS (medián 2 roky) bez ohledu na výběr následného typu a intenzity imunochemoterapie. Jen alogenní transplantace dosahovala v dlouhodobé perspektivě povzbudivějších výsledků, nicméně možnost použití této léčebné metody zůstává omezena na úzký okruh mladších nemocných. Naději na zlepšení prognózy přinesly nové léky (inhibitory BCR signalizace - ibrutinib, idelalisib; bcl-2 antagonisté/ BH3 mimetika - venetoclax; nové generace monoklonálních protilátek, buněčná terapie) a zejména jejich podání v kombinacích (např. ibrutinib + benadmustin + rituximab; venetoclax + benadmustin + rituximab, venetoclax + obinutuzumab). I přes nové léčebné možnosti zůstávají nemocní s časným relapsem CLL jednou s nejrizikovějších kohort nemocných s vysoce nepříznivou prognózou. Na druhé straně nemocní s dlouhodobě trvající remisí po iniciální léčbě (trvání delší než 3 roky) bez nových genetických změn mají většinou příznivou prognózu i při opakování totožné léčby, kterou již absolvovali. I pro tuto skupinu nemocných mohou nové léky přinést další zlepšení léčebné odpovědi a doby do opětovného relapsu a progresse choroby. Samostatnou kapitolu s nutností specifického terapeutického algoritmu tvoří nemocní s transformací CLL v agresivní lymfoidní neoplázii (Richterův syndrom). Léčebné výsledky i prognóza zde zůstávají velmi špatné i v éře nových protinádorových léčiv.

Závěrem můžeme konstatovat, že exploze poznatků translačního výzkumu u CLL umožnila zařadit do rutinní léčebné praxe nové skupiny léků, které výrazně

rozšiřují a zlepšují naše terapeutické možnosti ve všech věkových skupinách nemocných.

Podpořeno grantem MZ ČR VES16-32339A a projektem IGA_LF_2016_001.

2959. SOUČASNÉ MOŽNOSTI A NOVÉ PERSPEKTIVY V LÉČBĚ DIFUZNÍHO B-VELKOBUNĚČNÉHO LYMFOMU

Trněný M. (I. interní klinika, VFN a 1.LF UK, Praha)

Difúzní velkobuněčný lymfom (DLBCL) je nejčastějším podtypem Non-Hodgkinova lymfomu (NHL), v České republice tvoří zhruba 40% všech lymfomů (Trněný, Vasova et al. 2007). Od počátku klasifikace založené na morfoloickém a imunohistochemickém vyšetření bylo zřejmé, že se jedná o heterogenní skupinu onemocnění, což je stále potvrzováno dalšími poznatky, založenými zejména na molekulárně biologickém vyšetření genomu. Genový expresní profil (GEP) definuje dva podtypy – ABC a GCB (Alizadeh, Eisen et al. 2000), které mají odlišnou patogenezu (cell of origin, COO) a v řadě prací také odlišnou prognózu (Lenz, Wright et al. 2007, Molina, Canioni et al. 2014). Použití imunohistochemické diskriminace, nejčastěji stále algoritmus Hansové, vede však k různým výsledkům. Hypotéza o rozdílnosti výsledků léčby u těchto dvou podtypů byla zpochybněna některými současnými studiemi (Cunningham, Hawkes et al. 2013, Davies, Caddy et al. 2015, Pfreundschuh 2015). Existují však práce, které předběžně naznačují rozdílný efekt cílené terapie rozdílných podtypů lymfomů (Vitolo, Chiappella et al. 2014, Nowakowski, LaPlant et al. 2015, Wilson, Young et al. 2015). Kromě rozdílů v COO však je však objevena celá řada mutací a molekulárně biologických změn, které definují další podskupiny. Mezi nejvíce diskutované patří tzv. “double-hit” (DH) nebo “double-expression” (DE) DLBCL spočívající v translokacích postihujících gen pro bcl-2 či myc, nebo v jejich overexpresi (Aukema, Siebert et al. 2011, Green, Young et al. 2012). Z klinického pohledu zůstává pro stanovení prognózy nemocných nejvýznamnějším mezinárodní prognostický index (IPI)(Shipp, Harrington et al. 1993). Léčba je v současnosti založena na imunochemoterapii - rituximab v kombinaci režimem CHOP. Tento režim je základem léčebné strategie pro všechny skupiny nemocných, i když existuje řada variací podle rizika, věku, časně léčebné odpovědi, ale žádná z těchto variací není obecně akceptována. Přestože R-CHOP je používán již téměř 15 let, stále existují otázky týkající se jeho optimálního využití, zejména z s ohledem rozdílnou farmakokinetiku rituximabu u mužů a žen a z toho vyplývající možný benefit vyššího a delšího

dávkování u mužů (Pfreundschuh, Müller et al. 2014, Pfreundschuh, Poeschel et al. 2014, Jaeger, Trněný et al. 2015). Přes tuto výhradu je standardním režimem pro mladší nemocné s nízkým a středně nízkým rizikem dle IPI (L a LI IPI) R-CHOP 21 (Pfreundschuh, Trumper et al. 2006). U starších nemocných je standardem R-CHOP 21, žádná z randomizovaných studií neprokázala, že zkrácení cyklu na 14 dní přináší signifikantní benefit (Cunningham, Hawkes et al. 2013, Delarue, Tilly et al. 2013). U nemocných starších 80 let dochází u velké většiny nemocných k redukci dávky chemoterapie, používané jsou například režimy R-miniCHOP (Peyrade, Jardin et al. 2011) nebo další redukce či substituce a signifikantně stoupá počet nemocných, kteří dostávají pouze paliativní chemoterapii (R-COP) nebo pouze symptomatickou podpůrnou léčbu. Věk sám však nemůže být kritériem k redukci terapie, nemocní schopní léčby antracykliny ve věku mezi 80–85 lety profitují z R-CHOP ve srovnání s R-miniCHOP (Trněný, Janikova et al. 2016). Rovněž nemocní, kteří se “nekválifikují” k terapii antracykliny a dostávají redukovanou chemoterapii (například COP) stále profitují z přidání rituximabu (Trněný, Janikova et al. 2016). Největší různorodost v terapii je u mladších nemocných s vyšším rizikem dle IPI. Terapie R-CHOP 21 je stále standardem, přestože je obecně považována za suboptimální. R-CHOP 14 se neukázal jako signifikantně lepší než CHOP21 – ani pro mladší nemocné, nebo pro nemocné s vyšším IPI (Cunningham, Smith et al. 2011, Vidal, Shpilberg et al. 2016). Existuje řada variant chemoterapií přidávaných k rituximabu: ACVBP (Recher, Coiffier et al. 2011), CHOEP (Pfreundschuh, Lorenz et al. 2001), EPOCH (Wilson, Dunleavy et al. 2008), MegaCHOP (Pytlík, Belada et al. 2015), (Vitolo, Chiappella et al. 2011). Jen výjimečně bylo provedeno přímé srovnání s režimem R-CHOP (Recher, Coiffier et al. 2011, Molina, Canioni et al. 2014), u některých dalších je hodnocení významu samotného imunochemoterapeutického režimu komplikováno skutečností, že byla použita i vysokodávkovaná terapie s autologní transplantací (ASCT). Význam vysokodávkované terapie jako součásti léčby první linie nepřineslo v éře rituximabu signifikantní výhodu nad kontrolní standardní terapií jak ukázala německá skupina (R-CHOEP vs R-MegaCHOEP s podporou ASCT)(Schmitz, Nickelsen et al. 2012), stejně tomu bylo i v případě francouzské studie (R-CHOP vs R-CEEP + HDMTX/Ara-C + ASCT) (Milpied, Legouill et al. 2010). Naproti tomu studie italská (R-CHOP nebo R-MegaCHOP s randomizací mezi ASCT a ramenem bez ASCT) naznačovala benefit ASCT (Vitolo, Chiappella et al. 2012), stejně jako studie americká (CHOP+/- R +/-ASCT)(Stiff, Unger et al.

2013), která však je problematicky hodnotitelná, neboť velká část nemocných nebyla léčena rituximabem. Obecně se zdá, napříč studii, že doba do progresu (PFS) se u skupiny nemocných léčených ASCT pohybuje kolem 70% ve 3 resp. v 5 letech a o tom, zda studie je pozitivní či ne, rozhoduje výsledek kontrolního ramene. Intenzifikovaná terapie ať jde o HyperCVAD/HDMTX-AraC, CHOEP či další, případně s ASCT se používá u tzv. double hit lymfomů (Petrich, Gandhi et al. 2014, Howlett, Snedecor et al. 2015). Udržovací terapie u DLBCL zatím neslibuje zlepšení PFS ani při použití rituximabu v 1. linii či relapsu (Habermann, Weller et al. 2006, Gisselbrecht, Schmitz et al. 2012) nebo jinými léky jako je enzastaurin (Crump, Leppä et al. 2013). Výjimkou by mohl být rituximab u mužů (Jaeger, Trneny et al. 2015, Witzens-Harig, Benner et al. 2015). Čeká se na výsledky studie REMARC s udržovací terapií lenalidomidem. Radioterapie ustupuje obecně do pozadí, obzvláště při využití PET hodnocení, jsou zprávy o jejím významu při léčbě double hit lymfomů (Dabaj, Tzankov et al. 2013), nicméně tato analýza nebyla dosud publikována časopisecky.

Významným prognostickým faktorem je odpověď na léčbu. V současné době je založená na hodnocení PET (Cheson, Fisher et al. 2014). Nemocní s dosažením PET negativitu (kompletní remise) na konci léčby mají signifikantně lepší prognózu než nemocní s PET pozitivitou (parciální remise a méně). Otázka, zda lze využít PET k úpravě terapie při časném hodnocení v průběhu léčby je otevřená. Nemocní s PET negativitou mají opět velmi dobrou prognózu, nemocní s PET pozitivitou v řadě studií prognózu horší, ale v řadě prospektivních studií se intenzifikací léčby nepodařilo zlepšit jejich osud (Moskowitz, Schöder et al. 2010, Duehrsen, Hüttmann et al. 2014).

S nadsázkou lze říci, že DLBCL je onemocnění s jedním léčebným pokusem. Výsledky léčby relapsů jsou limitovány, obzvláště v případech časných relapsů. U mladších nemocných je základem použití režimu založeného na platinovém cytostatiku (DHAP, ESHAP, ICE, GDP) s následnou ASCT (Gisselbrecht, Glass et al. 2010, Crump, Kuruvilla et al. 2014). U starších nemocných je možné použít rekudované dávky výše zmíněných režimů, režimy založené na oxaliplatině (Mounier, El Gnaoui et al. 2013), samotný gemcitabin, případně s kortikoidy. Ze „starších“ chemoterapeutických léků, byť (zatím) nemají úhradu, se používají zejména pixantron (Pettengell, Coiffier et al. 2012) a bendamustin (Ohmachi, Niitsu et al. 2013). Použití rituximabu v léčbě relapsů nebylo formálně testováno na populaci dříve předléčené rituximabem, ale na základě zlepšení výsledků při jeho použití v relapsu

u rituximabem nepředléčených nemocných (Vellenga, van Putten et al. 2008) a synergismu s chemoterapií in vitro je rituximab považován za standardní součást léčby.

Z nových léků, které se testují v léčbě DLBCL lze zmínit přidání bortezomibu, kde se však z prvních dat zdá, že nepřinese zlepšení PFS ani ve skupině ABC lymfomů (Davies, Caddy et al. 2015, Leonard, Kolibaba et al. 2015). V roce 2016 se čekají výsledky randomizované studie CHOP s obinutuzumabem vs rituximabem (studie Goya), výsledky již zmíněné studie s udržovacím lenalidomidem (Remarc). Ukončen byl nábor do studie s nonGC DLBCL srovnávající CHOP s inhibitorem Brutonovy kinázy ibrutinibem či bez něj (Phoenix), probíhá nábor do studie srovnávající CHOP s lenalidomidem či bez něj (Robust). Testuje se použití léku blokujícího antiapoptotický protein bcl2 venetoclax (ABT-199) spolu s CHOP (studie Cavalli), použití antiCD79b protilátky konjugované s auristatinem. Slibné jsou výsledky s ovlivněním epigenetických mechanismů, např. inhibice EZH2, testuje se i použití hypometylačních látek azacytidinu a dalších. Kromě cíleného působení na lymfomovou buňku jsou testovány přístupy ovlivňující interakci lymfomu s mikroprostředím a imunitním systémem. Sem v poslední době patří zejména inhibitory tlumivých drah PD1-PDL1/2 a CTLA-4 (nivolumab, ipilimumab) (Lesokhin, Ansell et al. 2014), využití tzv BITE protilátek (blinatumomab) (Viardot, Goebeler et al. 2014) a využití CAR (chimeric antigen receptor) modifikovaných T lymfocytů (Kochenderfer, Dudley et al. 2015).

2958. SOUČASNÉ MOŽNOSTI TERAPIE HODGKINOVA LYMFOMU

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

Hodgkinův lymfom (HL) představuje s incidencí 2-3 případy na 100.000 obyvatel a rok nejčastější nádorové onemocnění adolescentů a mladých dospělých. Je právem považován za symbol úspěchu v léčbě hematologických malignit. Současnými protokoly chemoterapie v kombinaci s lokalizovanou radioterapií lze vyléčit drtivou většinu nemocných s limitovaným stádiem nemoci a až 70-80 % pacientů s pokročilou chorobou.

Současný koncept terapie pacientů s HL je postaven na riziku uzpůsobené terapii za použití režimu ABVD (časná stádia), případně pomocí intenzivní terapie BEACOPPesc (střední a pokročilá stádia). Přes nepopiratelné výsledky je stávající terapie u řady pacientů spojena s akutní (hematologickou a infekční) a nezanedbatelnou pozdní toxicitou. Současná úvodní terapie HL

je proto vedena snahou o maximální léčebný výsledek za cenu co nejmenších následků léčby. Objevují se proto pokusy o změnu terapeutického paradigmatu úvodní terapie prostřednictvím de-eskalace (případně zkrácení) léčby, vysazení (redukce) radioterapie, případně nasazení inovativních léků biologické povahy.

V úvodní terapii limitovaného stádia HL dominuje snaha redukovat, případně vynechat radioterapii (RT), případně snížit počet cyklů chemoterapie ABVD. Standardní terapie časných stádií HL se nyní opírá o podání 2 cyklů ABVD a radioterapii postižení lokality (involved field, IF) v dávce 20Gy. Vynechání RT po chemoterapii (Radford, NEJM 2015) v této populaci bohužel vede k horšímu přežití bez známek lymfomu ve 3 letech (90,8 % vs 94,6%). Nadějí, jak omezit pozdní následky léčby je zmenšení ozařovaného pole na oblast postiženého místa (involved site). Tento postup však zatím čeká na ověření v klinických studiích. V případě nemocných středního stadia HL je s úspěchem používána kombinace 2 cyklů BEACOPPesc a 2 cyklů ABVD s následnou RT IF v dávce 30 Gy, která byla shledána účinnější než podání 4 cyklů ABVD (studie HD14). Recentně probíhající studie HD10 odborných skupin EORTC/LYSA/FIL testovala koncept nahrazení režimu BEACOPPesc režimem ABVD a neprovedením RT u PET negativních případů. I v tomto případě se ukazuje, že nemocní středního stadia neprofitují z redukce léčby.

Nemocní s pokročilým HL jsou populací nejvíce zatíženou toxicitou intenzivní léčby. Současný léčebný standard 6 cyklů režimu BEACOPPesc představuje průsečík efektivity a smysluplné akceptovatelné toxicity. Cestou jak redukovat zátěž nemocných cytostatiky při zachování účinnosti režimu je použití cílené anti-CD30 terapie brentuximab-vedotinem (Br). Byly testovány dvě varianty „imunochemoterapie“ na bázi BEACOPP: první s akronymem BrECAPP vznikla vynecháním vinkristinu a bleomycinu a druhá – BrECADD, kromě vynechání výše uvedených cytostatik přidal náhradu prokarbazinu za dakarbazin a záměnu prednisonu za dexamethason. Celkem bylo dosaženo 88 % (BrECADD) a 86 % kompletních remisí (BrECAPP), což se projevilo v příznivém podílu nemocných bez progresu lymfomu v 18-měsících (89 % u BrECADD a 93 % u BrECAPP). Celkově byla pozorována vyšší hematologická a orgánová toxicita u režimu BrECAPP, což režim BrECADD nominovalo jako režim pro budoucí randomizovanou studii oproti standardu BEACOPP.

U nemocných s relabovaným nebo refrakterním HL (R/R HL) je standardem podání záchranné (salvage) chemoterapie, nejčastěji pomocí platinového nebo

gemcitabinového režimu a provedení autologní transplantace krvetvorných buněk (ASCT). Zlepšení výsledků léčby R/R HL se odvíjí od zlepšení účinnosti salvage terapie. Jako velmi efektivní se jeví kombinace Br s cytostatikem bendamustinem. Tato kombinace dosahuje 74 % kompletních remisí a celkem 93 % nemocných na léčbu odpovídá. Drtivá většina pacientů (93 %) byla schopna nasbírat dostatečný štěp krvetvorných buněk. Další možností je kombinace Br s klasickým platinovým záchranným režimem ESHAP (BRESHAP). Pilotní data ukazují, že procento KR přesahuje 90 %. Klíčovým průlomem v terapii R/R HL je možnost využít molekulu Br jako post-transplantační udržovací terapii. Tento postup byl testován v prospektivní, placebem kontrolované studii (AETHERA) Nemocní léčení udržovací terapií Br dosáhli téměř o 20 % lepší 3-leté přežití bez progresu, než nemocní v rameni s placebem (61 % vs 43 %). Tento poznatek nominuje podání Br v této indikaci jako standardní postup u všech nemocných v riziku selhání léčby po ASCT. Zásadním průlomem v terapii rezistentních forem R/R HL je aplikace molekul obnovujících protinádorové T-lymfocytární funkce pacienta - tzv „immune checkpoint inhibitors“. Příkladem je molekula nivolumab - blokátor dráhy programované buněčné smrti (programmed death, PD), který u těžce předlčených nemocných dosahuje až 87 % léčebných odpovědí (Ansell AM, NEJM 2015). Nadějí je také kombinace Br a preparátu ipilimumabu. Jedná se o monoklonální protilátku proti CTLA-4 (s T-cytotoxickými lymfocyty asociovaný protein 4). Ipilimumab má potenciál obnovit cytotoxickou reakci organismu na nádor. Pilotní data ukazují dobrou toleranci kombinace bez dosažené maximální tolerovatelné dávky a velmi dobrou efektivitu s 67 % celkových a 42 % kompletních remisí.

Terapie HL prodělává v posledních letech dynamické změny. Snaha o redukcii zátěže u nemocných s příznivou prognózou pravděpodobně povede k další úpravě dávek chemoterapie a radioterapie. Nástup nových cílených molekul umožňuje rozvinout koncept imuno-chemoterapie, který má potenciál redukovat chemoterapii i u pokročilých forem onemocnění. Obnovení imunitního dozoru pomocí „immune checkpoint inhibitors“ pak přináší novou naději i pro rezistentní případy nemoci a hypoteticky otevírá i možnost léčby bez podání cytostatik. Aplikace nových léčebných postupů však klade nároky na revalidaci současných prediktivních nástrojů tak, abychom byli schopni identifikovat kandidáty těchto nových léčebných postupů. Podpořeno granty: IGA_LF_2016_001 a Takeda IISR-2015-101289.

SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY 1: LYMPHOMA PATHOGENESIS

2915. ABILITY TO DOWNREGULATE THE LEVEL OF CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR P27KIP1 AFTER DNA DAMAGE IS RETAINED IN CHRONIC LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CELLS WITH FUNCTIONAL ATM/P53 SIGNALING PATHWAY

Rašková Kafková L., Jarošová M., Navrkalová V., Loja T., Chovancová J., Fialová Kučerová J., Šimková D., Procházka V., Pospíšilová Š., Divoký V. (*Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc; Department of Hemato-oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital, Olomouc; Center of Molecular Medicine, CEITEC - Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno*)

DNA-damage response (DDR) plays a key role in sensitivity of CLL to chemotherapy. The activity of the key DDR kinases, ATR and ATM, is largely compromised in CLL cells. Non-cycling CLL cells lack ATR protein expression, and ATM is commonly targeted for inactivation by genetic abnormalities of the ATM gene, such as deletion of 11q22.3-q23.1 chromosome bands involving ATM. Biallelic inactivation of ATM (often a mutation on one allele and a deletion of the other allele, mut/del ATM) results in impaired DDR. In this study, we combined genetic screening of ATM and TP53 with functional assay of DDR and searched for a marker that would enable a rapid evaluation of sensitivity of CLL samples carrying 11q22-q23 deletion to DNA damage. Since decreased p27Kip1 level by caspase cleavage represents a key step in chemotherapy-induced apoptosis in CLL cells, we hypothesized that p27Kip1 function may represent a marker link between functionality of the canonical DDR pathway and non-DDR cell cycle regulatory proteins in CLL, and therefore, can serve as a surrogate marker for ATM/p53 deficiency. We analyzed 18 CLL samples carrying 11q22-q23 deletion for the presence of mutations on the residual ATM allele using next-generation deep sequencing. Based on the results we divided our samples into two groups – a group with samples carrying wild type ATM allele (wt/del ATM samples) and the

second group with samples carrying mutated form of ATM allele (mut/del ATM samples). Next we aimed to unravel the functionality of ATM by analysis of phosphorylation of p53 on Ser15, an ATM target site, in response to ionizing radiation (IR). This screening divided our CLL samples into two groups - with ATM/p53 functional and ATM/p53 non-functional pathway. We found apparent functionality of ATM/p53 pathway in some mut/del ATM samples and on the contrary non-functionality of ATM in some wt/del ATM samples. Apparently, some ATM mutations do not completely abolish ATM activity. On the other hand, we assume the involvement of other factors impacting on the expression and activity of ATM in the wt/del ATM samples with lack of p53-Ser15 phosphorylation. Next we characterized changes in p27Kip1 levels in response to IR in our groups with ATM/p53 functional and ATM/p53 non-functional pathway. To assess degradation or accumulation of p27Kip1 after DNA damage, we used western blotting and flow cytometry (FACS) analyses. Our comparative experiments suggest that retention of ATM kinase activity in CLL cells is essential for downregulation of the level of p27Kip1 after DNA damage, or, in reverse, our data suggest a close association between the non functionality of ATM/p53 pathway and accumulation of p27Kip1 in CLL cells in response to DNA damage. In conclusion, we propose that accumulation of p27Kip1 after DNA damage is a suitable marker for characterization of non-functionality of ATM in CLL cells, i.e. it is associated with lack of ATM/p53-Ser15 activity. Our experiments also highlight importance of functional test assessing ATM activity in CLL as some wt/del ATM CLL B-cell samples lack phosphorylation of p53-Ser15 and accumulate p27Kip1 levels in response to DNA damage, i.e. behave as samples with mut/del ATM genotype. We also provide evidence that multi-color flow cytometry is a powerful tool for p27Kip1 level quantification in B-CLL samples after experimentally induced DNA damage and that such measurement of p27Kip1 degradation or accumulation can serve as a surrogate marker for ATM/p53 functionality in B-CLL cells. Supported by: IGA NT13576 from Ministry of Health, Czech Republic

2858. IBRUTINIB INHIBITS CD20 UP-REGULATION ON CLL B CELLS MEDIATED BY THE CXCR4/SDF-1 AXIS

Pavlasova G., Borsky M., Seda V., Cerna K., Doubek M., Mayer J., Pospisilova S., Davids S. M., Brown R. J., Mraz M. (IHOK FN, LF MU a CEITEC MU, Brno - CZ; FN, Brno - CZ; IHOK, FN, Brno - CZ; IHOK FN a CEITEC MU, Brno - CZ; Dana-Farber Cancer Institute, Boston - USA; FN a CEITEC MU, Brno - CZ)

BACKGROUND: It was shown that BCR inhibitors such as ibrutinib interrupt microenvironmental interactions and mobilize CLL cells from lymph node niches and bone marrow into the blood stream. Therefore, it has been suggested that a combinatorial therapy of BCR-inhibitors with anti-CD20 or other antibodies might be an effective therapeutic combination. **AIMS:** The aim of this study was to test for the effect of ibrutinib on the expression of selected CLL cell-surface molecules that could be potentially targeted by available monoclonal antibodies. **RESULTS:** We performed gene expression profiling in samples obtained from CLL patients treated with ibrutinib as a single agent (pre-ibrutinib vs. day 15 and/or week 5/12) and analyzed changes in >20 cell-surface molecules that could be potentially targeted by different available therapeutic antibodies. Surprisingly, we observed that CD20 mRNA had the most significantly changed expression (down-modulation of 3.4-fold; $P < 0.0001$). This suggested that CD20 expression might be regulated by a yet unknown mechanism in the context of microenvironmental interactions impaired by ibrutinib. The co-culture of primary CLL cells with stromal cell line HS-5 induced higher CD20 surface levels on CLL cells, and ibrutinib inhibited this CD20 up-regulation. Then we assessed the CD20 expression on CLL cell populations defined according to CXCR4 and CD5 levels. CLL cells that have recently exited the lymph node microenvironment to the peripheral blood express lower levels of chemokine receptor CXCR4 and higher levels of activation marker CD5 (CXCR4^{dim}CD5^{bright} cells) than those cells circulating in the blood stream for a long time (CXCR4^{bright}CD5^{dim} cells). The CXCR4^{dim}CD5^{bright} cells had 2-times higher CD20 surface as well as mR-NA expression ($P < 0.01$) suggesting that changes of CD20 levels within immune niches reflect the changes in its transcription. Moreover, CD20 expression gradually decreased with the transition of CLL cells from CXCR4^{dim}CD5^{bright} to CXCR4^{bright}CD5^{dim} ($P < 0.01$). This led us to hypothesize that CXCR4/SDF-1 is directly implicated in CD20 regulation. Indeed, in

vitro treatment of CLL cells with SDF-1 α (ligand for CXCR4 produced by stromal cells) up-regulated CD20 expression ($P < 0.01$). The application of plerixafor (CXCR4 inhibitor) or ibrutinib abolished the SDF-1 mediated CD20 up-regulation ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** We have described the first known mechanism of CD20 regulation in CLL cells. The CXCR4/SDF-1 axis up-regulates CD20 expression in CLL B cells, this is inhibited by ibrutinib. Supported by the MSMT project CEITEC 2020 (LQ1601); GACR (GA16-13334Y); Ministry of Health of the Czech Rep, grant nr. 16-29622A; TACR (TEO2000058/2014-2019); MUNI/A/1028/2015; MSMT COST CZ (LD15144); Horizon 2020 (No. 692298); and G.P. is a city of Ostrava scholarship holder. This publication reflects only the author's views and the Union is not liable for any use that may be made of the information contained therein.

2976. MICROENVIRONMENT-DEPENDENT DRUG RESISTANCE THROUGH BCL2 FAMILY UNBALANCE IN MANTLE CELL LYMPHOMA

Chiron D., Bellanger C., Dousset C., Maiga S., Touzeau C., Le Gouill S., Amiot M., Pellat-Deceunynck C. (INSERMU892 CNRS6299, Université de Nantes, Nantes - F)

Extrinsic signaling from soluble and cellular surrounding environment supports the progression of most cancers, including B-cell lymphomas. Mantle cell lymphoma (MCL), which initially accumulates in lymphoid organs, disseminates early on in extranodal tissues but the nature of pro-tumoral signals resulting from these various microenvironments is still unclear. In the present study, we observed that both survival and cell-cycle progression are strongly dependent on extrinsic signals in MCL. The evaluation of cytokine receptors expressed in situ and comparison of mesenchymal or lymphoid-like interactions allowed us to develop a unique ex-vivo model that supported long-term expansion of primary malignant cells. To identify microenvironment-dependent molecular modulations we have initiated the transcriptomic analysis of primary MCL in coculture. Preliminary results confirmed that our model efficiently mimicked molecular modulations observed in lymphoid tissues, such as proliferation and NF κ B signatures and unbalanced regulation of the Bcl2 family towards survival. The latter led to a decrease in mitochondrial priming and a consequent selective drug resistance to BH3-mimetics or alkylating agents. Integration of extrinsic signals from the multiple components of the microenvironment increases our understanding in drug resistance and

will offer opportunities to develop novel mechanism-based therapeutic strategies in incurable lymphomas.

3001. CRISPR/CAS9-MEDIATED MUTAGENESIS OF MIR-155 REPRESENTS POTENTIALLY EFFICIENT TOOL IN SEARCHING FOR NOVEL MIR-155 PROTEIN TARGETS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Vargová K., Simerský R., Lenobel R., Vargová J., Zikmund T., Savvulidi F., Šebela M., Stopka T. (Depts. Biocev and Pathophysiology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Praha; Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural research, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc)

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is most prevalent B-cell leukemia with lymph node involvement, leukemization and relatively heterogeneous outcome. The CLL pathogenesis involves distinct cytogenetic changes and somatic mutations, however, the understanding of the disease heterogeneity and its aggressiveness is not complete. Therapy of CLL is usually initiated when malignant clone accelerate proliferation or infiltrates bone marrow (to suppress myelopoiesis) or causes un-tolerated enlargement of liver, spleen or lymph nodes. Therapy of CLL is oriented to suppress viability of B-cells using immuno-chemotherapy. MicroRNAs are ~22-nt long hairpin like structures that are posttranscriptional inhibitors of gene expression

via associating with mRNAs within the miRNA-induced silencing complex. miRNAs are transcribed similarly as mRNAs from genes or gene clusters. Among over thousands of miRNAs, there exist miR-155, which has been repeatedly found overexpressed in CLL and other hematologic malignancies. Mouse model of miR-155 overexpression confirmed its role as oncogene. Number of target mRNAs was reported including transcription factor PU.1 or Src homology-2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 (SHIP1). To advance our understanding of CLL pathogenesis we utilized genome-editing technology of clustered regularly-interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and introduced mutations of the miR-155 sequence that is known to inhibit expression of PU.1 and SHIP1 and utilized for this the MEC-1 (CLL-derived) cell line. Individual clones were isolated and the miR-155 level as well as levels of its targets was determined. We asked what other targets than PU.1 and SHIP1 were upregulated (or alternatively downregulated) upon loss of miR-155 and performed a quantitative proteomic analysis. Our data suggest that hundreds of protein targets are differentially expressed upon miR-155 mutagenesis, some of them being not yet predicted on mRNA level using tools such as miRBase or TargetScan. We can conclude that nucleotide-specific CRISPR edited mutations of miR-155 in CLL cells revealed a candidate set of proteins that are potentially important therapeutic targets for developing CLL-specific therapies.

KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ 1

2971. NEPŘÍBUZENSKÉ DOBROVOLNÉ DÁRCOVSTVÍ KOSTNÍ DŘENĚ JE ALTRUISMEM V PRAXI. AKTUÁLNÍ STAV VE SVĚTĚ I V ČR SE ZAMĚŘENÍM NA ČESKÝ NÁRODNÍ REGISTR DÁRCŮ DŘENĚ

Jindra P., Navrátilová J., Pagáč D. (Český Národní Registr Dárců Dřeně, Plzeň)

Program registrů nepřibuzných dobrovolných dárců krevetvorných buněk (KB) vznikl před více než 40 lety v Anglii (v roce 2014) jako výraz snahy maminky nemocného syna bez dárce v rodině nalézt pro něj nějakého dárce. V následujících letech došlo etablování tohoto programu prakticky ve všech vyspělých zemích, takže aktuálně je pro všechny pacienty potřebující transplantaci KB bez dárce v rodině k dispozici téměř 28 miliónů dárců v 53 zemích. V současnosti tento

program zajišťuje 70-80 % celosvětově prováděných alogenních transplantací a ročně je provedeno více než 16 000 nepřibuzných transplantací, což představuje 46 výkonů denně. Přibližně 50% nepřibuzných daruje pro pacienta v zahraničí, který nenalezne dárce v domácím registru, což znamená, že denně 23 štěpů KB překračuje hranice států. Celý program registrů a procedura darování včetně transportů štěpů k pacientovi jsou velmi striktně regulovány a standardizovány tak, aby byla zaručena kvalita KB a zaručena bezpečnost jak dárců, tak transplantovaných pacientů. Tyto standardy jsou zpracovány organizací sdružující všechny registry - tzv. World Marrow Donor Association (WMDA). Registry splňující všechna přísná kritéria a standardy jsou touto organizací akreditovány a je úspěchem, že Český národní registr dárců dřeně tuto akreditaci získal jako 4. registr na světě již v roce 2005 a následně ji 2x úspěšně

obhájil (2010,2014). V ČR byl program nepřibuzenského dárčovství KB zahájen počátkem 90. let, kdy byly současně založeny 2 registry – Registr dárců kmenových buněk (CSCR) fungující při IKEM Praha a Český národní registr dárců dřeně (ČNRDD) v Plzni, který jako non-profitní, nestátní organizaci spolu s rodinami nemocných dětí založil prim. MUDr, Vladimír Koza. Pražský registr má více než 23 000 dárců zatímco mezinárodně akreditovaný ČNRDD více než 63 000. Dohromady je tak pro české pacienty k dispozici takřka 90 000 nepřibuzných dárců. ČNRDD v současnosti zajišťuje nepřibuzné dárce (vlastní i ze zahraničí) pro všechna transplantační centra a celkově tak zabezpečuje cca 2/3 nepřibuzenského transplantačního programu v ČR. ČNRDD je největším a nejkvalitnějším registrem v postkomunistických zemích. Je úspěchem, že takřka 20% nepřibuzenských transplantací pro české pacienty je zajištěno „národním“ dárcem - tj. tímto registrem, což je i ve srovnání s ostatními vyspělými státy mimořádný výsledek (např. Švýcarsko či Nizozemsko mají pouze 3%, respektive 4% dárců z vlastních národních registrů). Vlastní prezentace dále uvede podrobnější údaje týkající se globálních i národních dat a obecné problematiky dobrovolného nepřibuzenského programu dárčovství KB.

2890. DIAGNOSTIKA A LÉČBA AKUTNÍCH LEUKEMIÍ U DOSPĚLÝCH NEMOCNÝCH - HISTORIE, SOUČASNÉ MOŽNOSTI A PERSPEKTIVY

Szotkowski T.

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

Akutní leukemie (AL) jsou velmi různorodou skupinou zhoubných nemocí krvetvorby. Jde o vzácná onemocnění – počet nově diagnostikovaných dospělých nemocných nepřesahuje 4 / 100.000 obyvatel za rok. Jsou však významná svou závažností. V nedávné minulosti (v České republice do začátku 90. let 20. století) šlo o nemoci, které téměř vždy končily smrtí pacienta během několika týdnů či měsíců od zjištění diagnózy. Nebyl znám jejich genetický podklad. Nebyla k dispozici řada diagnostických metod, dnes rutinně využívaných a považovaných za samozřejmost, jako jsou průtoková cytometrie, cytogenetika, molekulární genetika. Velmi omezené byly léčebné možnosti. Během 60. až 80. let minulého století bylo sice do léčby zavedeno několik dodnes široce používaných a ani moderní léčbou nenahrazených cytostatik, jejichž podání v tehdejší Československu však často znemožňovala jejich nedostupnost a také chybění podpůrné léčby. Účinné léky tlumící nevolnost a zvracení, širokospektrá antibiotika, antimykotika a antivirotika, moderní transfuzní přípravky a deriváty,

centrální žilní katetry, transplantace krvetvorných buněk – to vše je ve stále širší míře dostupné až v posledních 20-25 letech. V současnosti je známo několik desítek subtypů AL, které jsou definované svým genetickým podkladem. Získané genetické změny v krvetvorné buňce jsou příčinou změny jejího chování a vzniku leukemického klonu. Konkrétní genetické změny jsou obvykle spojeny s určitým průběhem nemoci a především citlivostí k protinádorové léčbě či naopak odolností vůči ní. V některých případech je přítomnost genetické změny důvodem k úpravě léčby (podání léku cíleně zasahujícího nádorové buňky) a také k účinnému odhalování zbytků nádorových buněk v organismu po proběhlé léčbě. Zcela zásadně se s objevy cílené léčby (transretinová kyselina, arsenik) změnila prognóza akutní promyelocytární leukemie (APL), dnes dokážeme vyléčit 80% nemocných. Pokroky v podpůrné léčbě umožnily podávání vysoko-dávkované chemoterapie a transplantace krvetvorných buněk, které zlepšily výsledky léčby nemocných s mnoha dalšími subtypy AL. Dlouhodobé přežití a snad i vyléčení je dnes dosažitelné u 35-40% všech nemocných. Velkým problémem i dnes zůstávají tyto nemoci u pacientů nad 60-65 let. U těch se častěji než u mladších vyskytují nepříznivé subtypy AL (s nepříznivými cytogenetickými změnami, sekundární leukemie). Jejich přidružené nemoci a celkově horší zdravotní stav často omezují či znemožňují podání intenzivní chemoterapie či provedení transplantace. Pro tyto nemocné je jedinou možností vedoucí ke zlepšení výsledků léčba cílená, zasahující účinně nádorové buňky, bez řady nežádoucích účinků zmiňované intenzivní chemoterapie. Kromě APL je tato léčba již dostupná např. pro nemocné s akutní lymfoblastickou leukemií s přítomností Ph chromozomu či fúzního genu bcr/abl. Tzv. tyrozinkinázové inhibitory (imatinib a další) sice nemoc nevyléčí, ale v kombinaci s kortikoidy či chemoterapií dokáží navodit a řadu měsíců udržet remisi nemoci, která dříve často nereagovala ani na intenzivní chemoterapii. Další cílené léky či léčebné postupy jsou předmětem intenzivního výzkumu a první výsledky jsou přinejmenším slibné. Podpořeno grantem IGA_LF_2016_001.

2919. KONTROLOVANÝ PODTLAK V LÉČBĚ DEHISCENCE RÁNY PO EXSTIRPACI PILONIDÁLNÍHO SINU U PACIENTA S AKUTNÍ LEUKEMIÍ

Vodičková M., Labudíková M., Bébarová L. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc; 1. Chirurgická klinika, FN, Olomouc)

NPWT- Negative Pressure Wound Therapy je mechanická léčebná metoda k podpoře a urychlení hojení kom-

plikovaných chronických a akutních ran. Podtlaková terapie rány je neinvazivní metoda aktivního uzávěru rány, která využívá lokálně působícího negativního tlaku ke zvýšení prokrvení spodiny rány, zvýšení parciálního tlaku O₂ v okolí defektu, zvýšení dostupnosti živin a zmenšení intersticiálního otoku spodiny a okolí rány. Výsledkem je zvýšená tvorba granulační tkáně, podpora autolytického debridementu, snížení bakteriální a toxické zátěže u infikovaných ran, urychlení a zkrácení fáze debridementu. Tato neinvazivní metoda nezatěžuje organismus pacienta, aktivně zmenšuje ranou plochu rány a přispívá k rychlejšímu uzávěru defektu. Příspěvek demonstruje, na naší klinice první, konkrétní případ pacienta s akutní leukémií a dehiscencí infikované operační rány v oblasti sakra, u kterého byla použita podtlaková terapie k urychlení zhojení defektu. Tím bylo umožněno zahájení léčby základního onemocnění a následné zhojení rány pomocí produktů s obsahem mořské vody a singletového kyslíku.

2998. PRÁCE EDUKAČNÍ SESTRY NA HEMATOLOGICKÉ KLINICE

Havrlová M., Pavlicová V., Komárková I., Doležalová M. (IV. interní hematologická klinika, FN, Hradec Králové; FN Hradec Králové)

PRÁCE EDUKAČNÍ SESTRY NA HEMATOLOGICKÉ KLINICE IV. interní hematologická klinika Fakultní nemocnice v Hradci Králové je významným pracovištěm v léčbě hematologických onemocnění. Pacienti přicházejí na kliniku k vyšetření a léčbě hematologických onemocnění cestou hospitalizace nebo ambulantní péče. Mimo podávání chemoterapie zde provádíme i autologní a alogenní transplantace. Na našem separátorovém centru zajišťujeme mimo jiné i terapeutické aferézy. Proces edukace je přirozenou a neoddělitelnou součástí poskytování zdravotnických služeb. Slouží jako podpora a výchova nemocného a jeho blízkých k lepší informovanosti a samostatnější péči o vlastní zdraví. Pacienti a jejich blízcí jsou edukováni o základní diagnóze, diagnostických a terapeutických postupech, potlačené imunitě v průběhu terapie, správné životosprávě a vhodných či méně vhodných potravinách v průběhu léčby. Poskytujeme informace z oblasti nutriční péče, psychologické pomoci v rámci naší kliniky s podporou klinického psychologa, sociální péče, službách nemocnice, právech a povinnostech pacienta. V centru pro poruchy hemostázy vedeme pacienty k samostatné obsluze přístroje na měření INR a aplikaci subkutánních injekcí. Dále edukujeme k obsluze speciální pumpy k podávání imunoglobulinu a správné aplikaci v domácím prostředí. Podáváme

informace o patientských klubech a občanských sdruženích, které pomáhají pacientům s hematologickým onemocněním v různých oblastech jejich života, jako je Občanské sdružení LYMFOM HELP, Klub pacientů s mnohočetným myelomem a Dobrý anděl. Novinkou v rámci edukačního procesu, který je rovněž jako psychologická podpora, jsou zkušenosti jiných klientů s daným onemocněním. Celý projekt jsme nazvali Naděje pro ostatní a je k dispozici k nahlédnutí a přečtení na naší ambulanci. Zahrnuje příběhy pacientů, jejich pocity, obavy, zkušenosti, radosti, vnímání celého období léčby a následného života. Závěrem lze říci, že edukace má velký význam při léčbě nemocných, protože dobře informovaný pacient má důvěru v ošetřující personál a je i lépe spolupracující.

2906. LYMFOM S VÝSKYTEM MALIGNÍ RÁNY – NAŠE PRVNÍ ZKUŠENOST (KAZUISTIKA)

Kalodová Hadačová J., Šebelová H., Jelenová I., Špačková J., Dvořáčková K., Kuběnová Z. (FN, Brno)

Úvod: Maligní rána bývá spojována s nádorovým onemocněním a pro pacienta představuje velkou fyzickou, psychickou, ale také sociální zátěž. Tento typ rány se nejčastěji vyskytuje u pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním a u většiny z nich nelze očekávat úplné zhojení. Společným cílem zdravotníků je zlepšit kvalitu života nemocného, protože rána mnohdy silně zapáchá, secernuje a bolí. Nejčastějším způsobem ošetření je pravidelné převazování a využití moderních materiálů podporujících hojení maligní rány. Metody: V příspěvku je prezentována kazuistika pacienta s Difúzním velkobuněčným B-lymfomem (DLBCL), jehož onemocnění se demonstrovalo v prvotní fázi otokem kotníku levé dolní končetiny s následným zarudnutím bérce a po několika měsících došlo ke vzniku otevřené maligní rány. Přestože pacient od prvních příznaků vyhledal odbornou pomoc a podrobil se opakovaným vyšetřením, došlo ke stanovení základní diagnózy až po vzniku maligní rány. Tedy šest měsíců po prvních příznacích, a to i přes to, že pacient projevoval zvýšené úsilí a samostatně vyhledal odborné zdravotnické zařízení, kde nakonec došlo ke stanovení diagnózy. V této fázi byl pacient přijat na naši kliniku. Jelikož při přijetí pacienta rána silně zapáchala, secernovala a po odstranění obvazového materiálu byla objevena rozsáhlá nekróza, bylo nezbytné ránu ošetřit. Ve sdělení za pomoci fotodokumentace prezentujeme postup při ošetření maligní rány v jednotlivých stádiích a shrnujeme výsledky naší práce. Poukazujeme také na psychiku nemocného, kdy pacient byl vyčerpaný opakovanými návštěvami

odborníků bez výsledného efektu a následnou hrozbou amputace dolní končetiny. Zpočátku s námi pacient moc nekomunikoval, byl uzavřený a smutný. S prvními výsledky naší práce se psychika nemocného zlepšila. Závěr: Cílem příspěvku je vyzdvihnout náročnost péče o maligní ránu a psychiku nemocného u pacienta s DLBCL. Dále příspěvek poukazuje na nezbytnost souhry celého týmu, který se na ošetřování podílel.

2893. EMOCE - JAK S NIMI ZACHÁZET NA ONKOLOGICKÉM PRACoviŠTI

Neudertová H.

(*Oddělení klinické psychologie PMDV, FN, Brno*)

Klinická práce na onkologickém pracovišti je náročná v mnoha směrech. Má vysoké nároky na odbornost, znalosti, zručnost. Kromě výkonových a odborných požadavků se od zdravotníků očekává schopnost adekvátně reagovat a orientovat se v emočně náročných situacích tak, aby onkologického pacienta podporovali při léčbě. Syndrom psychického ohrožení se objevuje v nadlimitní, ohrožující a bezvýhodné situaci, kdy je ohrožena psychická a fyzická jednota člověka. Pacient, ať už s nově sdělenou onkologickou diagnózou či v průběhu léčby samotné, se v takovém stavu psychického ohrožení nachází. Onkologická diagnóza je nepříjemný ortel a je třeba, aby pacient realitu nemoci kognitivně a emočně přijal. Tento stav s sebou nese různé afektivní reakce. Je vhodné, aby se uměl s emocemi zkonfrontovat a odžít je. Nejčastější emoce jsou kromě úzkosti a strachu, také i vztek, bezmoc a smutek. Pokud pacient neumí zrale a adekvátně emoce zpracovat nebo pokud zdravotnický personál nevědomě pacientovi nedovolí emoční reakci

odžít, pak můžeme očekávat neadaptivní, dysfunkční reakci. Ta se může projevit panickou, agresivní reakcí, útěkovým či regresivním chováním nebo až stavy de-realizace. Pokud se tyto emoční a behaviorální projevy zafixují, můžeme očekávat klinické obrazy, které se v MKN 10 diagnostikují jako reakce na závažný stres F43.0, poruchy přizpůsobení F43.2, posttraumatická stresová porucha F43.1. Je tedy s výhodou, pokud pacient na náročné období s onkologickou diagnózou, zareaguje tzv. sympatickou reakcí, která má podobu akutní stresové reakce s veškerou vegetativními a behaviorálními projevy oproti parasympatické. Ta se vyznačuje pasivní reakcí, reakcí tzv. mrtvého brouka, kdy není zřejmá žádná emoční či behaviorální reakce. Pacient jakoby ve svém prožívání „ztuhne“ a svoji situaci bere v klidu a s nadhledem. Z pohledu zdravotníka je takový pacient statečný, bezproblémový a rozumný, ale z psychologického hlediska tato skupina pacientů inklinuje k rozvoji syndromu psychického ohrožení, který může vést až k rozvoji disociativních poruch, posttraumatické poruchy, afektivních poruch či k různým typům somatizace potíží. Proto je více než žádoucí, aby zdravotník si byl vědom těchto rizikových faktorů při snaze tlumit emoční reakce pacienta a při snaze „apelovat“ na dospělé chování. Měl by nabídnout bezpečný prostor pro odžití emocí, měl by mít dovednost pacientovi emoce zrcadlit a měl by nabídnout ujištění o „normalitě“ různě projevených reakcí. Obecné pravidlo zní: Mohu reagovat, nesmím však pacienta zatížit a zahltit vlastní emoční reakcí! Každý zdravotník by měl umět pracovat s vlastními reakcemi a reakcemi pacienta s citem, empatií a autenticitou. Tyto kvality by měly patřit do standardů léčebné péče každé sestry či lékaře.

SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY 2: STRESSED HEMATOPOIESIS

2918. JAK2 V617F PROGENITORS EXHIBIT INTRINSIC INFLAMMATORY SIGNALING AND PROTECTION AGAINST INFLAMMATION INDUCED DNA DAMAGE

Stetka J., Luzna P., Lanikova L., Koralkova P., Hodny Z., 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, v. v. i., Praha - CZ; Laboratory of Genome Integrity, Institute of Molecular*

Genetics of the ASCR, v. v. i., Prague - CZ; Danish Cancer Society Research Center, DK-2100, Copenhagen - DK)

Recent clinical observations recognize chronic inflammation as an essential component of development and progression of oncogenic JAK2 V617F mutation-positive polycythemia vera (PV) and other Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasm (MPNs). However, much remains to be understood about how inflammatory and oncogene-induced signaling interact in disease initiation and clonal evolution into final burn-out state of fibrosis or neoplastic

transformation. Using induced pluripotent stem cell (iPSC) clones with distinct JAK2 genotypes derived from female PV patient and immunohistochemistry staining (IHC) of patients' bone marrow (BM), we show presence of IFN γ and its transcription program to be intrinsic for hematopoietic progenitors with JAK2 V617F mutation. As this potent immunomodulatory cytokine with broad functions has important role in mediating inflammatory response, we hypothesize that IFN γ is the key inflammatory cytokine present at the very beginning of JAK2 V617F transformation and driving BM microenvironment remodeling. Our IHC stainings during the course of disease progression, as well as recently published data show continuously increasing expression of inflammatory cytokines TNF α and TGFB1, suggesting their important role in senescent-associated fibrosis of later disease stages. Such observation prompted us to test the effects of IFN γ in combination with TNF α and/or TGFB1 on the expression of inflammatory signature in JAK2 V617F-positive progenitors. This treatment spurred more than 100 times fold increase in expression of CXCL10 and CXCL9 specifically in JAK2 V617F progenitors, but not in wild-type progenitors. Both of these chemokines have been previously shown to have important roles in fibrogenesis. As pro-inflammatory cytokines are known to induce high levels of reactive oxygen species (ROS) causing DNA damage, we analyzed DNA damage response (DDR) in PV progenitors in vitro and in vivo. We show that both DDR markers, gH2AX and ATMpS1981, were weakly detectable in PV, with increased trend of gH2AX and ATMpS1981 foci accumulation in later disease stages. The same applied for the presence of oxidative-stress marker 8-Oxoguanine, suggesting involvement of protection mechanisms against inflammation-evoked DNA damage, thus allowing rapid propagation of premalignant clone in inflammatory BM microenvironment and creating a barrier that delays transformation of chronic myeloproliferation to senescence-associated fibrosis. As the main source of DNA damage induced by inflammatory cytokines is mediated by ROS, we have measured activity of ROS-buffering anti-oxidative system. We observed significantly increased intrinsic and inflammation-stimulated activity of most of the tested enzymes (G6PD, glutathione reductase, glutathione peroxidase and 6-phosphogluconate dehydrogenase) in V617F cells, compared to wild-type cells, suggesting metabolic protection against inflammation-induced DNA damage in PV, which might be overrun in later disease stages by gradually increasing cytokine storm. If we take into account recently published function of DNA helicase RECQL5, which acts as a suppressor of

replication stress-associated genomic instability in MPNs, addition of our data create a novel model of multi-level protection of premalignant clone in PV, with cooperative interplay between the cell-intrinsic and tissue environment-dependent fail-safe mechanisms that jointly serve as a barrier that delays transformation of chronic myeloproliferation to senescence-like condition in myelofibrosis. Support: GP14-10687P.

2991. GENE VARIANTS OF THE ATM-NFKB-IL6 SIGNALING AXIS: IMPLICATIONS IN PREDICTION OF ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION (HSCT) RELATED COMPLICATIONS

Kuba A., Raida L., Mrázek F., Schneiderová P., Kriegová E., Fürst T., Fürstová J., Faber E., Ambrůzová 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 Acute and chronic Graft-versus-Host Disease (aGVHD/cGVHD) – donor's immunocompetent cells mediated adverse reaction damaging target organs and tissues of HSCT recipients and conditioning regimen-related gastrointestinal toxicity (RR-GIT) as result of chemo(radio)therapy preceding grafting represent the most frequent causes of non-relapse mortality and morbidity in allografted patients. ATM-NFKB-IL6 axis links DNA-damage response (DDR) with inflammatory signaling. We hypothesize that analysis of germline genetic variation of genes implicated in DDR and senescence-associated inflammatory signaling could provide a tool for prediction of HSCT-related complications. Patients and Methods In a single-center study, we analyzed 109 patients allografted between 2009-2015 for: AML (41%), MDS/MPN (19%), ALL (17%), CLL (8%), NHL (6%), CML (4%), and other hematological disorders (5%). The median age of the cohort was 50 (20-63) years. Patients were allografted after myeloablative (14%), non-myeloablative (20%) and reduced intensity/toxicity (66%) conditionings from HLA identical donors (matched-related 40%). GVHD prophylaxis was done by solo cyclosporine-A (76%) or cyclosporine-A and mycophenolate mofetil (20%) or low-dose methotrexate (4%). Patients were genotyped for 5 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) (rs4585 T/G, rs189037 A/G, rs227092 T/G, rs228590 C/T, and rs664677 T/C) of the ATM gene,

2 SNPs (rs3774937 C/T, rs3774959 A/G) of the NFKB1 gene and 1 SNP (rs1800795 G/C) of the IL6 gene. SNP genotyping was performed with Sequenom MassARRAY platform using allele-specific MALDI-TOF mass spectrometry assay (Sequenom, San Diego, USA). Primers were designed using the Sequenom SNP Assay Design software version 3.0 for iPLEX reactions. Logistic regression was used in the study with significance level set to 0.05. Results During the post-transplant neutropenic period 78 recipients (72%) suffered from RR-GIT. Grade I/II and III/IV were documented in 48 (44%) and 30 patients (28%), respectively. Thirty-three patients (30%) developed aGVHD. Grade I/II and III/IV were observed in 20 (18%) and 13 recipients (12%), respectively. Twenty-seven of 91 evaluable patients (30%) developed cGVHD and extensive form was observed in 14 patients (15%). The type of conditioning, ATM gene haplotypes (rs4585*T, rs189037*A, rs227092*T, rs228590*C, and rs664677*T), female sex, and EBMT score were associated with RR-GIT grade III-IV [OR=3.0, 95%CI(1.8-5.1) p=0.004; OR=9.7, 95%CI(2.0-47.0), p=0.006; OR=2.4, 95%CI(1.0-5.6), p=0.05; OR=2.1, 95%CI(1.4-3.2), p=0.0001, respectively]. The effect of the ATM haplotype was maintained after accounting of the above mentioned risk factors in the multivariate analysis (p=0.006). Patients homozygous for NFKB1 gene haplotypes (rs3774937*T, rs3774959*G) were at lower risk for aGVHD (OR=0.12, 95%CI [0.03-0.52], p=0.005). Furthermore, patients homozygous and heterozygous for NFKB1 gene protective haplotype (haplotype carriers) had significantly less cGVHD (OR=0.1, 95%CI [0.02-0.58], p=0.01 and OR=0.13, 95%CI [0.02-0.74], p=0.02, respectively). Moreover, patients homozygous for both protective haplotypes suffered from the extensive form of cGVHD less frequently (p=0.04). We have not confirmed any significant impact of the IL6 gene SNP on aGVHD and/or cGVHD. Conclusions This is the first report addressing ATM-NFkB-IL6 signaling in HSCT setting. Based on our preliminary data ATM-NFkB-IL6 signaling merits further investigation which may bring new information for patients' pre-transplant risk assessment. Supported by IGA_LF_2016_001

3002. A NOVEL MUTATION OF RIBOSOMAL PROTEIN S7 IN THREE FAMILY MEMBERS WITH MARKEDLY DIFFERENT SEVERITY OF DIAMOND-BLACKFAN ANEMIA IN A SINGLE FAMILY

Pospíšilová D., Vojta P., Macečková Z., Koralkova P., Konečný P., Hajduch M., Horvathova M.
(Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University

Hospital, Olomouc; Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc; Department of Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc)

We present here the case of three women suffering from macrocytic anemia with markedly different severity, in whose a new mutation of gene coding for ribosomal protein S7 (RPS7) was identified. However, severe anemia with the need of repeated transfusions was diagnosed in the youngest female patient at newborn age only. She had normal birth weight, no physical anomalies were found. Until one year of age, she was transfusion-dependent. She showed a good response to steroids, and has been steroid-dependent for the last 10 years (intermittent low dose). The mother and older sister were examined within the family genetic counseling. Interestingly, they were diagnosed with mild macrocytic anemia, however, never required any treatment. In all three women, increased erythrocyte adenosine-deaminase (e-ADA) was proved with the highest levels in the patient and lowest in her mother, respectively (5.29±0.340, 4.18±0.150, 3.20±0.218 IU/g Hb, reference range: 0.8-2.5IU/g Hb). So far, only five RPS7 mutations clinically associated with DBA were published, all of them in splice sites. We found novel heterozygous nonsynonymous mutation g[3580153G>T] in exon 6 of the RPS7 gene leading to V134F substitution in all three women. Subsequently, this mutation was confirmed by Sanger sequencing method on both gDNA and cDNA levels. Furthermore, role of the RPS7 V134F mutation was established on the cellular model. MRC-5 fibroblasts (deficient for RPS7) were transiently transfected with plasmid construct carrying WT and V134F RPS7 cDNA. Mutant but not WT transfectants exhibited altered protein synthesis, nucleolar and ribosomal stress, consistent with previously reported cellular phenotypes in DBA patients. Patients described previously for the RPS7 mutations in splice sites showed milder form of DBA compared to our V134F patient and similarly had only minimal physical anomalies. Our DBA patient is to the best of our knowledge the first case identified with pathogenic heterozygous nonsynonymous mutation of RPS7 gene and demonstrates the importance of complex diagnostics and validation of sequence alterations in suspect DBA individuals. Grant support: Czech Science Foundation (GA15-13732S) and Ministry of Health of the Czech Republic (AZV 16-32105A).

2985. CHROMATIN DEFECTS INDUCED UPON KNOCKOUT OF MAJOR CHROMATIN REMODELING FACTOR ISWI ATPASE SMARCA5 IN MOUSE ARE SENSED VIA P53 PATHWAY AND BLOCK CELL CYCLE PROGRESSION

Zikmund T., Kokavec J., Savvulidi F., Turkova T., Paszekova H., Skoultchi A. I., Stopka T. (*Biocev, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague – CZ; Department of Pathological Physiology, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague – CZ; Department of Cell Biology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY – USA*)

Chromatin structure is a major prerequisite of proper developmental processes. Chromatin structure is established, maintained and disrupted by SWI/SNF2

superfamily of ATP-dependent helicases. Sensing of irregularities of chromatin structure is not fully understood. Subfamily of ISWI ATPases has been proposed to regulate developmental processes although the particular mechanisms of its activity were elusive. We herein utilized conditional deletion of major ISWI member, Smarca5, in murine early thymic progenitors. Phenotype of Smarca5 mutants is not indicative of being mediated via defective T-cell receptor (TCR) rearrangement or dysregulation of gene repair. Smarca5 deficiency resulted in proliferation defect together with activation of DNA damage pathway. Production of double Smarca5^{-/-} Trp53^{-/-} mutants partially restored proliferation blockade but neither rescued developmental disruption of the thymocyte development nor aggravated lymphomagenesis in the Trp53^{-/-} mutants.

SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MOLECULAR HEMATOLOGY 3: STATE OF THE ART INVITED LECTURE

3003. DNA DAMAGE RESPONSE, AGING AND CANCER: MECHANISMS AND OPPORTUNITIES FOR TREATMENT

Bartek J. (*Danish Cancer Society Research Center, Copenhagen – DK; Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacky University, Olomouc – CZ*)

Abstrakt sdělení není k dispozici.

KONFERENCE OŠETŘOVATELSTVÍ 2

2983. VÝBĚR OPTIMÁLNÍHO ŽILNÍHO VSTUPU S OHLEDEM NA SPECIFIKA HEMATOLOGICKÉHO A HEMATOONKOLOGICKÉHO PACIENTA

Maňásek V., Ďuraš J., Jelínek T. (*Komplexní onkologické centrum Nový Jičín, Společnost pro porty a permanentní katetry, Nový Jičín; Klinika hematoonkologie, Fakultní nemocnice, Ostrava*)

Hematologie a hematoonkologie jsou obory, které využívají dominantně parenterální formu léčby, a proto je správný výběr žilního přístupu stěžejní pro opti-

mální aplikaci léčiv. Využíváme přitom vstupů krátkodobých, střednědobých i dlouhodobých. Volba žilního přístupu je výsledkem rozvahy, hodnotící charakter a délku podávané léčby, vlastnosti pacienta a stav žilního systému. V případě indikace centrálního přístupu nejčastěji volíme mezi klasickou centrální kanylou (netunelizovanou), tunelizovanou centrální kanylou, PICC (centrální kanylou zaváděnou z periferie) a portem. Každý z těchto druhů vstupů má své výhody i nevýhody, a to nejen při inzerci, ale především při dlouhodobém používání, kdy je pacient obecně vystaven vyššímu riziku komplikací, a to především infekčních a trombo-

tických. Shrnujeme technické potíže, které mohou doprovázet inzerci konkrétních druhů vstupů a uvádíme komplikace v souvislosti s žilním přístupem, specifické právě pro hematologii/hematoonkologii. Presentujeme rovněž vlastní zkušenosti s inzercemi cévních vstupů.

2905. PICC KATÉTRY – NAŠE PRVNÍ ZKUŠENOST

Šebelová H., Špačková J., Kouřilová P. (FN, Brno)

Úvod: PICC katétr je periferií implantovaný centrální katétr, který se zavádí pod ultrazvukovou kontrolou. V posledních letech se začíná častěji využívat i v České republice. V zajištění žilního přístupu ho můžeme zařadit do oblasti střednědobého vstupu, který zajišťuje komfort při léčbě nejen onkologicky nemocným pacientům. Doba zavedení PICC katétru se pohybuje v průměru okolo tří měsíců, ale může být zaveden i déle (až jeden rok). Jelikož při chemoterapeutické léčbě často dochází k devastaci periferního žilního systému, je zavedení PICC katétru jednou z výhodných alternativ, které využíváme na našem pracovišti. Zavedením PICC katétru se snažíme předcházet komplikacím spojeným s léčbou onkologicky nemocných pacientů. Metody: PICC katétrů na našem pracovišti zavádíme od roku 2015 a již byly zavedeny 99 pacientům. Nejčastěji ho zavádíme u pacientů s diagnózou Nonhodgkinský lymfom, karcinom prsu, ale i u ostatních onkologických diagnóz. V případě výskytu komplikací se je snažíme konstruktivně a efektivně řešit. Ke zlepšení kvality ošetrovatelské péče o PICC katétrů jsme vytvořili informační brožuru, která slouží nejen pacientům, ale i ošetřujícímu personálu. Získají zde základní informace, které jsou pro manipulaci s PICC katétre nezbytné. Brožura obsahuje podrobnosti o fungování PICC katétru, popis možných komplikací, jejich předcházení a řešení. Součástí brožury je také Průkaz nositele PICC katétru, záznamy o případných komplikacích, převazech a v neposlední řadě také záznamy o aplikované léčbě. Současně jsme také vytvořili algoritmus práce s PICC katétre, který nám napomáhá při řešení komplikací, jako jsou například trombóza PICC katétru, neprůchodný PICC katétr nebo jeho povytažení. Závěr: Cílem naší práce je zajištění bezpečného žilního přístupu především u onkologicky nemocných pacientů a předcházení komplikací, které mohou vzniknout během podání chemoterapeutické léčby. Za tímto účelem byla vytvořena informační brožura a navržen algoritmus práce při řešení komplikací s PICC katétre. Tato práce vznikla v rámci projektu NIG FN BRNO 4/2014. „Podpořen MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705)“.

2969. AUTOLOGNÍ ODBĚRY NA TRANSFUZNÍM ODDĚLENÍ FAKULTNÍ NEMOCNICE (TO FNOL) V LETECH 2011-2015

Hlávková E., Chmelová S., Koukalová A., Entrová A., Galuszková D. (Transfuzní oddělení, FN, Olomouc)

Autologní odběry na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Olomouc (TO FNOL) v letech 2011-2015 E. Hlávková, S. Chmelová, A. Koukalová, A. Entrová, D. Galuszková Transfuzní oddělení, Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL)

Úvod: Autotransfuze je považována za nedílnou součást hemoterapie u operačních výkonů jako náhrada krevních ztrát při operaci. Ve sledovaném období jsme na Transfuzním oddělení Fakultní nemocnice Olomouc provedli autologní odběry u 1624 pacientů. Nejčastější indikací k autologním odběrům byli pacienti před ortopedickými operacemi v 92%, před urologickými operacemi v 3,60% a před dalšími operačními výkony (např. stomatochirurgickými operacemi) v 4,40%. Cíl: Cílem je zmapovat indikace, kontraindikace k odběru, vlastní provedení autologního odběru u pacienta, druhy komplikací. Odebrané a neaplikované autologní odběry. Metodika: Data v této prezentaci jsou zpracována za období 2011-2015 u autologních odběrů provedených na TO FNOL. Autologní odběry odebrané na odběrových střediscích zpracovávané na našem pracovišti nejsou předmětem prezentace. Dle indikace lékaře jsou pacientům odebírány 1-3 TU plné krve v týdenních intervalech. Standardně je při odběru odebíráno 405 ml plné krve. Odběr plné krve provádíme manuálně pomocí odběrových vah do odběrových vaků s následným zpracováním, nebo pomocí separátorů krevních buněk, kdy jsou odebrány jednotlivé složky krve. Výsledky: Ve sledovaném období jsme provedli 3027 autologních odběrů u 1624 pacientů v zastoupení - muži 809 (49,80 %) a ženy 815 (50,20%). Z uvedených odběrů bylo vyrobeno 2952TU AEBR, 47TU AERD a 2994TU AP. Další odběry byly lékařem zrušeny v 291 (8,77%) případech. Důvodem byly nevyhovující hodnoty krevního obrazu 16,84%, špatný žilní přístup 38,49%, polymorbidita 35,74%, jiné 2,75% (např. pozitivita infekčních markeru, změna termínu operace a pacient bez výsledků nutných před vlastním odběrem). Neaplikováno bylo 640 (21,68%)TU AEBR, 9 (19,14%)TU AERD, 298 (9,95%)TU AP. Komplikací při autologních odběrech ve sledovaném období bylo zaznamenáno 71 (2,34%). Nejčastější komplikací při odběru byl insuficientní žilní přístup 43 (60,56%), nevolnost 26 (36,62%), technické komplikace 2 (2,81%). Autologní odběry jsou skladovány samostatně. Exspirace autologní plazmy na našem pracovišti je z provozních důvodů 3 měsíce. Pacientům nebylo aplikováno 22% odebraných erytrocy-

tárních autologních TP (649TU/2999TU) a 10% odebrané autologní (298TU/2994TU) plazmy. Závěr: Autologní odběry jsou pro pacienty bezpečné, výskyt komplikací je minimální (méně než 2,5%). Podání autologní krevní transfuze snižuje u příjemce riziko potransfuzních reakcí, které by mohly nastat při aplikaci alogenní krevní transfuze. Jde o léčebnou metodu, která má své výhody, je však nutno počítat i s určitými riziky a komplikacemi. U autotransfuzí však výhody převažují.

3008. PROČ DOBROVOLNIČIT - PŘÍKLAD DOBRÉ PRAXE

Chudíková K. (ÚNO, FN, Olomouc)

Dobrovolnický program se osvědčil jako jeden z nástrojů, který prostřednictvím lidského kontaktu dobrovolníka s pacientem napomáhá aktivizaci, motivaci a psychické podpoře hospitalizovaných pacientů, přispívá k efektivnější organizaci práce a času personálu pro odbornou činnost i ke zlepšení celkové atmosféry nemocnice. Tím vším se podílí na zvyšování úrovně kvality péče o pacienta. Činnost dobrovolníků byla v našem zdravotnickém zařízení zahájena koncem roku 2014. V tomto krátkém období se do našeho centra přihlásilo již přes tři desítky zájemců o pravidelnou činnost a přes 40 zájemců o nepravidelnou činnost. Zprvu dobrovolníci začali působit na Dětské klinice a Oddělení geriatric. Na přelomu roku 2015/2016 začali docházet mimo jiné i na Hemato-onkologickou kliniku. Naše Dobrovolnické centrum respektuje legislativní požadavky stanovené zákonem č. 198/2002 Sb. Zákon o dobrovolnické službě a je realizován dle platné metodiky programu doporučené ve Věstníku Ministerstva zdravotnictví ČR č. 6/2009 a č. 11/2011 Metodické doporučení pro zavedení dobrovolnického programu v nemocnicích v souladu s procesy řízení rizik a bezpečnosti pacientů. Závěrem musíme konstatovat, že se jedná o smysluplnou a užitečnou činnost. Návštěvy pacientů přispívají ke zmírnění osamělosti, zlepšení jejich psychosociálního stavu a k urychlení rekonvalescence. Snahou našich dobrovolníků je vyplňovat volný čas hospitalizovaných pacientů a zlepšovat atmosféru nemocničního prostředí. Dobrovolníci navštěvují pacienty ve svém volném čase, nejčastěji si s nimi povídají, předčítají z novin či časopisů nebo luští křížovky.

2974. KLINICKÉ HODNOCENÍ V HEMATOONKOLOGII Z POHLEDU SESTRY

Kajaba V., Sedláčková R., Papajík T. (OVaV a HOK FNOL a LF UP, Olomouc)

Klinická hodnocení nových léčiv patří k nabídce léčebných možností nejen v komplexních onkologických centrech (KOC), ale rovněž v menších centrech a ambulancích. Možnost nabídky zkoušení nového léku pacientů přichází v rámci klinických studií v různých fázích zkoušení (zejména II-III fáze), ve kterých je důležitou součástí týmu výzkumná sestra - zapojená do studií nejčastěji v pozicích studijní koordinátorky (study co-ordinator), manažerky (data manager) či sestry (study nurse). Studijní tým má své přesně definované kompetence, kde každý z týmu zná svou roli, jenž je před začátkem definována a v čase aktualizována hlavním zkoušejícím. Životní cyklus nového léku prochází jasně definovaným postupem (preklinické hodnocení, klinické hodnocení a po registraci uvedení do praxe s případným postmarketingovým sledováním léku), ale pouze malá část vyvíjených a zkoušených preparátů se nakonec objeví v praxi a splní požadavky na něj kladené - vysoká farmakologická aktivita, nízká toxicita, možnost perorální aplikace ad. Cena některých nově zavedených léčiv přesahuje desítky až stovky tisíc Kč, což podporuje snahu koncentrace léčby/omezení preskripce na větší onkologická centra. Vzhledem k ochraně duševního vlastnictví dochází k uvedení generických léčiv (které by měly snížit cenu nových léků) až přibližně po 8, resp. 11 letech po registraci nového léčiva. Zkoušení bioekvivalence - nových léků se stejnou účinnou látkou, je jedna z dalších možností, jak zavést do praxe nové léčivo a snížit cenu původního originálního přípravku. Hematoonkologie patří v oblasti výzkumu mezi nejméně se rozvíjející obory - v posledním desetiletí jsou do praxe zaváděny monoklonální protilátky či inhibitory proteinkinázy. Klinické zkoušení klade na zdravotní sestry specifické požadavky, které jsou nezbytné pro správný průběh zkoušení. Týmová spolupráce a komunikace je jedním z top požadavků kladených na tuto pozici. Prezentace ukazuje obecně význam klinických studií a reflektuje zkušenosti z této oblasti z několikaleté praxe.

2995. CHLAPEC, KTERÝ ČEKAL NA ZELENOU

Medková P., Hůlková E., Karásková E., Jurečková L., Hradilová M., Mihálová H. (DK 21 B FN, Olomouc; Dětská klinika, FN, Olomouc; KARIM, FN, Olomouc; ŠANCE ops.)

Kazuistika je věnována chlapci, který byl přijat na hemato-onkologické oddělení Dětské kliniky v Olomouci v září 2010. Celá kazuistika seznamuje posluchače s komplexní léčbou poskytovanou multidisciplinárním týmem. Chlapec byl léčen dle proto-

kolu EsPhALL s dg. ALL. Prodělal několik závažných komplikací (Aspergilová pneumonie, opakované těžké mukozitidy, febrilní neutropenie, ARDS). Jedné z nejzávažnějších komplikací se věnuje MUDr. Eva Karásková – stenóze jícnu. Seznamuje s diagnostikou a léčbou stenózy jícnu. Pohled anesteziologa přináší MUDr. Lucie Jurečková, pod jejím vedením chlapec absolvoval celkem 65 anestezií (diagnostika onemocnění, implantace CŽK, bronchoskopie, dilatace jícnu, torakotomická resekce plic, exstirpace uzlin atd.). Do multidisciplinárního týmu patří i klinická psycholožka Mgr. Michaela Hradilová, která ve své části prezentace

informuje o dopadu dlouhodobé hospitalizace a vlastním prožívání nemoci jak u samotného chlapce, tak u jeho sourozence a celé rodiny. Tato část je doplněna výpovědí ředitelky obecně prospěšné společnosti ŠANCE - Herty Mihálové o sociální pomoci věnované celé rodině. V červnu 2013 dochází k relapsu onemocnění a příbuzenská transplantace u chlapce probíhá v listopadu 2013. V březnu 2014 dochází u chlapce k druhému hematologickému relapsu a následné paliativní chemoterapii. Poslední část prezentace je věnována kvalitě života chlapce během paliativní léčby.

MNOHOČETNÝ MYELOM

2876. LÉČBA MNOHOČETNÉHO MYELOMU U NETRANSPLANTABILNÍCH NEMOCNÝCH

Minařík J., Pika T., Bačovský J., Krhovská P., Ščudla V. (HOK FN, Olomouc)

V současné době zažíváme jeden z nejzásadnějších posunů v léčbě mnohočetného myelomu (MM). Mezi hlavní příčiny patří jednak přínos nových léků s biologickým mechanismem účinku a současně též lepší pochopení patogeneze onemocnění, umožňující dřívější diagnostiku a časné zahájení léčby. Obě tyto složky jsou vzájemně propojeny, neboť teprve zařazení nových léků do léčby přináší přínos v časných stádiích onemocnění (jako například u rizikového doutnajícího myelomu), časná diagnostika a zahájení léčby ještě před rozvojem orgánového postižení zase napomáhá k plnému využití potenciálu nových působků.

Prognóza starších nemocných neindikovaných k transplantaci periferních kmenových buněk ještě v nedávné době značně zaostávala a pouze díky kvalitní podpůrné péči nedošlo ke stagnaci délky celkového přežití v období od roku 1965 do roku 2000, kdy byl za zlatý standard považován režim melfalan s prednisonem (MP).

Prvním z léků, který prolomil zavedená schémata a nastavil nový směr léčby MM, byl thalidomid, první preparát ze skupiny imunomodulačních léků (IMiDů). Tento lék s pohnutou historií byl znovuobjeven pro nemocné s mnohočetným myelomem v roce 1997 a výsledky následných klinických hodnocení zcela jednoznačně dokladovaly jeho přínos. Velmi rychle se rozšířil a stal se součástí zavedených schémat léčby MM, zejména pro možnost plně ambulantního podání tabletové formy s absencí hematologické toxicity. Jeho hlavní limitací je vznik periferní neuropatie při dlouhodobém podávání a také nedostatečný efekt na onemocnění s rizikovým cytogenetickým profilem. Jiné nežádoucí účinky (zácpa, riziko tromboembolie, riziko fetálních malformací) jsou obvykle účinně eliminovány při dodržování bezpečnostních opatření či řádné profylaxe. V současnosti jsou v rámci České republiky (ČR) preferovány kombinované režimy thalidomidu s bortezumibem, díky značnému rozvoji nových preparátů s vyšší účinností je však thalidomid odsouván do vyšších linií léčby MM. I zde má potenciál k dosažení léčebné odezvy a díky své minimální hematologické toxicitě jej lze s výhodou použít zejména v pozdních fázích onemocnění s vyčerpáním jiných

léčebných možností. Mezi doporučené kombinace patří režimy s cyklofosfamidem (CTD), melfalanem (MPT), doxorubicinem (TAD) nebo jen s dexametazonem (TD).

Klíčovým lékem v léčbě MM je v současnosti bortezumib, první inhibitor proteasomu (PI), který bezprostředně po zavedení do léčebných režimů zcela vyvrátil dosavadní schémata a stal se stěžejní molekulou ve všech fázích onemocnění. Jeho účinek byl dokladován jak v indukční fázi, tak i v léčbě relapsů a dokonce i v udržovací terapii. Navíc má díky časné léčebné odezvě významný potenciál ke zvrácení ledvinného selhání a překonává též některé rizikové faktory, např. t(4;14) či proliferativní index myelomových plazmocytů. Bohužel však, stejně jako thalidomid, působí periferní neuropatii. Ta je sice většinou jen sensitivní a do jisté míry reverzibilní, může však být značně závažná a limitovat pokračování léčby či dokonce zhoršovat kvalitu života. Perspektivní jsou nová léčebná schémata se sníženou intenzitou dávkování „weekly“ (jednou týdně namísto 2x týdně) vedoucí k nižší incidenci i závažnosti neuropatií. Rozporuplné se jeví snížení tíže neuropatie pomocí podkožní aplikace bortezumibu, ta je nicméně výhodná především pro usnadnění aplikačního přístupu (namísto nitrožilního podání) se zachováním stejného léčebného účinku. V našich podmínkách se nejlépe osvědčily režimy s dexametazonem (VD) a dále trojkombinace s cyklofosfamidem (CVD), melfalanem (VMP) či doxorubicinem (BDD). V poslední době začíná nabývat na významu velmi účinný kombinací režim s thalidomidem (VTD), který vhodně kombinuje účinek inhibitorů proteasomu a IMiDů. Jiná léčebná schémata např. v kombinaci s lenalidomidem, užívaná s výtečným účinkem u všech skupin nemocných s MM včetně vysoce rizikových kategorií na předních pracovištích ve Spojených státech, nejsou t.č. v ČR běžně dostupná, stejně jako možnost udržovací léčby. Jejich zavedení jistě přinese další posun v léčebném efektu i prognóze nemocných.

První molekulou cíleně syntetizovanou k léčbě mnohočetného myelomu je lenalidomid. Jedná se o derivát thalidomidu s cílenou snahou o potlačení nežádoucích účinků. Tato 2. generace IMiDů nepůsobí neuropatii a má podstatně vyšší léčebný efekt než thalidomid včetně účinku na některé rizikové prognostické ukazatele. Na rozdíl od thalidomidu však má nezanedbatelnou hematologickou toxicitu s nutností úpravy dávky či podpory růstovými faktory v případě významné

neutropenie, a stejně jako u thalidomidu zůstává zvýšené riziko trombotických komplikací i teratogenity, pro které je nezbytné dodržovat profylaktická a preventivní opatření. Jeho podání s konvenčními cytostatiky se většinou nedoporučuje pro kumulaci hematologické toxicity a také pro zvýšené riziko sekundárních malignit (zejména kombinace s melfalanem), na druhou stranu se jako velmi přínosné jeví kombinace s dalšími novými působky, jako jsou inhibitory proteasomu (bortezomib, carfilzomib, ixazomib), monoklonálními protilátkami (elotuzumab, daratumumab) či dalšími biologickými léky, které však t.č. nejsou schválenými protokoly v rámci ČR, a můžeme se s nimi setkat pouze v rámci klinických hodnocení. Přesto i pouhá dvojkombinace lenalidomidu s dexametazonem má dokladovanou významnou účinnost a zejména dlouhodobé podání do progresu, které snad v nejbližší době bude schváleno i v ČR, signifikantně přispívá k prodloužení parametrů celkového přežití. Aktuálně je možné režim RD použít ve 2. linii léčby a je jen otázkou času, kdy jej budeme moci zařadit i do prvoléčby, ve které dramaticky zlepšuje křivky přežití především v kategorii netransplantabilních nemocných s MM.

Do druhé generace IMiDů zařazujeme rovněž pomalidomid, který je zatím nejnovějším IMiDem v léčbě MM. Má obdobný léčebný profil jako lenalidomid, je však účinnější v *in vitro* podmínkách a má odlišný způsob metabolismu, kdy většina účinné látky podléhá metabolismu v játrech a jen minimum je vylučováno ledvinami, což umožňuje podání plné dávky i u nemocných s porušenou funkcí ledvin. Zatím je možné jej v ČR podávat pouze v dvojkombinaci s dexametazonem a ve vyšších liniích léčby (minimálně dvě předchozí linie včetně bortezomibu a lenalidomidu a musí progredovat na poslední linii léčby), lze ale očekávat posun do časnějších linií i léčbu v kombinovaných režimech.

Nová generace inhibitorů proteasomu zahrnuje carfilzomib a ixazomib. Carfilzomib je prvním PI s absencí periferní neuropatie. Podává se obvykle v nitrožilní infúzi 2x týdně a je účinnější než bortezomib. Má excellentní účinnost v kombinacích a není hematotoxický. V současnosti je diskutována jeho možná kardiotoxicita u predisponovaných jedinců, většina ostatních nežádoucích účinků je spíše mírného rázu, případně kauzistická. V současné době je možné jej v ČR použít pouze při splnění přísných zákonných podmínek v pozdní fázi onemocnění. Ixazomib je prvním perorálním PI, užívaným v jedné tabletě týdně a dosud s absencí neuropatie, hematologické toxicity a minimem jiných nežádoucích účinků. V jednom klinickém hodnocení navíc demonstroval potlačení negativního prognostického

dopadu t(4;14) i del(17p). Zatím byl nicméně schválen pouze FDA a v Evropě na jeho schválení čekáme.

Skupinou léků s největším vkládaným očekáváním jsou monoklonální protilátky. První z nich, která se již chystá i na náš trh, je elotuzumab, protilátka proti povrchovému receptoru SLAMF7 (nebo též CS1). Lék samotný měl nicméně v prvních klinických hodnoceních jen omezenou účinnost, jeho hlavní doménou budou kombinované režimy (dosud dokladovaný efekt v kombinacích s bortezomibem či lenalidomidem). To může být současně i jednou z hlavních překážek jeho širšího uplatnění, zejména s ohledem na farmakoekonomickou otázku. Daratumumab je jiným typem protilátky, namířené proti povrchovému znaku CD38, která navíc prokázala i jako samostatná molekula velmi slibný efekt u tzv. „dvojitě refrakterních“ nemocných (refrakternita na PI a IMiD). Aktuálně je daratumumab zkoušen v rámci kombinačních režimů a stejně jako ixazomib byl již schválen ve Spojených státech, zatímco v Evropě na jeho schválení čekáme. S ohledem na mechanismus účinku a první klinické zkušenosti lze předpokládat jeho brzké uplatnění v rámci našich léčebných protokolů.

Kromě zavádění nových léků do léčby MM lze za revoluční počín považovat též představení nových diagnostických kritérií z roku 2014. Dosud všechna kritéria od roku 1975 indikovala zahájení léčby MM až při přítomnosti zjevných známek orgánového postižení (CRAB - hyperkalcémie, renální nedostatečnost, anémie, kostní léze). V roce 2014 publikovala Mezinárodní myelomová pracovní skupina (International Myeloma Working Group, IMWG) nová kritéria se zavedením tzv. myeloma defining events (MDE), mezi které patří infiltrace kostní dřevě $\geq 60\%$ plazmatických buněk, přítomnost >1 léze (nad 5mm) na magnetické rezonanci a poměr dominantních a nedominantních lehkých řetězců v séru ≥ 100 . Díky MDE začínáme léčit nově skupinu nemocných s dříve doutnajícím myelomem, kteří ještě nemají projevy orgánového postižení, ale jsou již ve vysokém riziku transformace do aktivního onemocnění. Časná léčba vede k lepším výsledkům, neboť cílí onemocnění, které je vulnerabilnější, brání rozvoji rozsáhlejších změn v DNA spojovaných s transformací myelomu a současně brání rozvoji dalšího orgánového postižení. Již nyní jsou zkoumány další rizikové faktory, které by léčbu posunuly dále k časnějším stádiím a některé léčebné protokoly potvrzují správnost indikace léčby v raných stádiích nemoci. Cílem zřejmě bude skloubení řádné rizikové stratifikace a volba režimů s maximálním léčebným účinkem a minimální toxicitou, která může vést v důsledku i k vyléčení podstatné části nemocných s MM.

2900. SOUČASNÉ POSTAVENÍ TRANSPLANTACE KRVETVORNÝCH BUNĚK V TERAPII MNOHOČETNÉHO MYELOMU

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

Autologní transplantace periferních krvetvorných buněk (auto-HCT)

Aplikace vysokodávkované chemoterapie a následné podání vlastních, tedy autologních periferních krvetvorných buněk u vhodných nemocných s nově diagnostikovaným symptomatickým mnohočetným myelomem (MM) v rámci první léčebné linie je používána již od 90. let dvacátého století. Auto-HCT lze obvykle provést u nemocných s MM do 65-70 let bez přítomnosti závažných komorbidit. Cílem této terapie je zlepšit léčebné výsledky a zvláště prodloužit celkové přežití (1). Dle výsledků různých mezinárodních klinických studií byly po provedení auto-HCT počty dosažených kompletních remisí (CR) 30-40%, celkové léčebné odpovědi 80-90%, mediány doby do progresu (PFS) 25-30 měsíců a mediány celkového přežití (OS) 50-56 měsíců (1). Provedení auto-HCT u MM je bezpečné pro většinu nemocných, peritransplantační mortalita (NRM) je nízká, nepřesahuje 2-3% (1). U většiny pacientů s MM dochází po čase i přes provedení auto-HCT k relapsu/progresi MM (2).

I v dnešní době (rok 2016), kdy máme k dispozici celou řadu nových cílených léků v terapii MM (inhibitory proteasomu, imunomodulační léky, monoklonální protilátky a další), je auto-HCT nadále považována za velmi účinnou léčebnou metodu u všech vhodných nemocných s nově diagnostikovaným MM. Provedení auto-HCT u MM v rámci terapie první linie patří stále mezi standardní léčebné indikace (2).

Nejvíce účinným postupem v současnosti (rok 2016) v rámci terapie první linie u MM (z hlediska četnosti CR, prodloužení PFS a prodloužení OS) je úvodní kombinace zahrnující 1-2 nové léky (inhibitor proteasomu a/nebo imunomodulační lék spolu s dexamethasonem) v indukční fázi, následně mobilizace periferních krvetvorných buněk (PBSC) a poté provedení 1-2 autologních HCT (1). Vysokodávkovaná chemoterapie s auto-HCT by měla být součástí primární léčebné strategie u vhodných pacientů s nově diagnostikovaným MM do věku 70 let či vhodného biologického věku. Nejlepší výsledky jsou dosahovány u pacientů s chemosenzitivním onemocněním, nicméně i ostatní nemocní s MM mohou profitovat z transplantační léčby (2).

Opakovaná (tandemová) autologní HCT může být použita jako konsolidace u všech nemocných s MM, kteří nedosáhli maximální léčebné odpovědi po první

auto-HCT (1). Tato terapeutická strategie vede k dosažení vyššího počtu léčebných odpovědí a prodloužení PFS (1). Na druhé straně je spojena s mírně vyšší peritransplantační mortalitou a nebyl prokázán zcela jednoznačný benefit pro celkové přežití (3).

Optimálním přípravným předtransplantačním režimem pro auto-HCT je melfalan 200 mg/m². Vysokodávkovaná chemoterapie u pacientů s těžkým poškozením ledvin (clearance pod 50 ml/min) vyžaduje vždy redukci dávky melfalanu, obvykle na 100-140 mg/m² (1).

Autologní HCT lze úspěšně využít také jako součást léčby relapsu/progrese MM (4). Provedení další auto-HCT po předchozí reindukční terapii je léčebná možnost, která je efektivní zejména u nemocných s relapsem/progresí MM po více než 18 měsících od první auto-HCT (3,4).

Alogenní transplantace periferních krvetvorných buněk (alo-HCT)

Alogenní transplantace krvetvorných buněk (alo-HCT) je terapeutická metoda s možným kurativním potenciálem pro nemocné s MM, je však zatížena významnou peritransplantační mortalitou, která se pohybuje mezi 20-30% a je výsledkem kombinace několika faktorů, které tvoří toxicita přípravného režimu, těžké formy reakce štěpu proti hostiteli a závažné infekce (1, 2). I po provedení alo-HCT může dojít k relapsu MM.

Alogenní HCT u MM lze individuálně indikovat u mladších nemocných s relabujícím onemocněním bez přítomnosti závažných komorbidit, u kterých je však účinné i opakování auto-HCT. Za možnou individuální indikaci k provedení alo-HCT lze považovat první chemosenzitivní relaps MM u vysoce rizikových nemocných s časnou progresí (do 12 měsíců) po vstupní léčbě (1,2).

Závěr

Transplantace krvetvorných buněk u mnohočetného myelomu zůstává i v současné době (rok 2016) důležitou terapeutickou modalitou, dle recentní analýzy Evropské skupiny pro transplantace krvetvorných buněk (EBMT) je ročně v Evropě provedeno celkem 39 000 HCT (5), z toho HCT u myelomu představuje kolem 10 000 případů (26% všech HCT, přes 9500 auto-HCT a přes 500 alo-HCT). Mnohočetný myelom je jednou z nejčastějších indikací pro provedení auto-HCT. Optimální léčebný přístup u vhodných pacientů s MM do 70 let je kombinovaná terapie obsahující 1-2 nové léky s následným provedením auto-HCT v rámci léčby první linie. Využití nových léků v rámci konsolidační a udržovací terapie po auto-HCT je testováno v rámci

řady klinických studií, je obvykle dosahováno prodloužení PFS, výsledky prozatím nejsou zcela jednoznačné stran prodloužení OS (2,3). V případě relapsu/progrese MM po první auto-HCT je jedna z léčebných alternativ provedení druhé auto-HCT obvykle po předchozí reindukční terapii. Alogenní HCT u MM lze individuálně indikovat u mladších nemocných s relabujícím chemosenzitivním onemocněním bez přítomnosti závažných komorbidit, limitací provedení alo-HCT je vyšší peritransplantační mortalita.

LITERATURA:

1. Hájek R, Adam Z, Ščudla V et al. Diagnostika a léčba mnohočetného myelomu. Doporučení vypracované Českou myelomovou skupinou, Myelomovou sekcí ČHS a Slovenskou Myelomovou Společností pro diagnostiku a léčbu mnohočetného myelomu. *Transfuzie a hematologie dnes* 2012; 18(Supplementum): 1-92.
2. Sureda A, Bader P, Cesaro S et al. Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2015. *Bone Marrow Transplant* 2015; 50: 1037-1056.
3. Bruno B, Auner HW, Gahrton G et al. Stem cell transplantation in multiple myeloma and other plasma cell disorders (report from an EBMT preceptorship meeting). *Leukemia Lymphoma* 2016, Epub ahead of print.
4. Jimenez-Zepeda VH, Mikhael J, Winter A et al. Second autologous stem cell transplantation as salvage therapy for multiple myeloma: impact on progression-free and overall survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18: 773-779.
5. Passweg JR, Baldomero H, Bader P et al. Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. *Bone Marrow Transplant* 2015; 50: 476-482.

2881. PODPŮRNÁ PÉČE U PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM

Radocha J. (IV. interní hematologická klinika, LFUK a FN, Hradec Králové)

Pacienti s mnohočetným myelomem jsou v průběhu dlouhého průběhu svého onemocnění vystaveni celé řadě infekčních i neinfekčních komplikací spojených jak s povahou jejich onemocnění, tak s často opakovanou terapií.

Infekční komplikace jsou zdrojem významné morbidity a mortality pacientů s mnohočetným myelomem. Při tvorbě tohoto sdělení byly jako základní premisy využity NCCN guidelines, ECIL guidelines, doporučení vytvořená skupinou CELL pro Českou republiku a v neposlední řadě doporučení EBMT pro pacienty po transplantacích. Pro poznání dalších detailů a zákoutí

infekčních komplikací doporučuji prostudování těchto základních textů. Důvody pro vysokou incidenci infekcí u pacientů s mnohočetným myelomem jsou mnohočetné. Na úrovni humorální imunity existuje dysfunkce B lymfocytů, která je manifestovaná hypogamaglobulinémií, jsou přítomny funkční abnormality dendritických antigen prezentujících buněk a v neposlední řadě také dysfunkce T lymfocytů charakterizovaná inverzí CD4:CD8 poměru T lymfocytů, abnormální poměr Th1/Th2 lymfocytů a celkově globální porucha diverzity T lymfocytů. Přítomen může být i funkční deficit NK buněk. Ačkoli není zcela jasné, který z uvedených defektů je nejvíce relevantním rizikovým faktorem pro vznik infekcí u pacientů s myelomem, nejčastěji přítomná hypogamaglobulinémie je nejčastěji spojována s rozvojem infekcí způsobených opouzdřenými bakteriemi, jako je *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*.

Nejčastějšími infekcemi, které postihují pacienty s MM, jsou infekce bakteriální. Nejčastěji jde o infekce respiračního traktu, především pneumonii. Antibakteriální profylaxe se proto nabízí jako jedno ze základních opatření. U pacientů s MM však rutinní antibakteriální profylaxe není indikována, s výjimkou pacientů po autologní transplantaci (ACST), kdy je očekávané období neutropenie delší než 7 dní. Zde je pak možné podat profylaxi chinolonovými antibiotiky, i když od této praxe se v poslední době upouští. Zcela zásadní je přihlédnout k aktuální epidemiologické situaci na daném pracovišti. S rostoucím množstvím polyrezistentních gramnegativních kmenů je pravděpodobné, že význam chinolonové profylaxe bude do budoucna dále ještě klesat. Výběr správné empirické antibiotické léčby je mnohdy tím zásadním krokem k úspěšnému vyléčení infekcí imunosuprimovaných nemocných. Naopak chybný výběr antibiotika může mít pro pacienta dopad na zvýšení mortality. Při výběru antibiotika je kromě spektra účinku nutné přihlédnout k jeho orgánové dostupnosti a farmakokinetice. Pečlivě je nutné také upravovat dávkování především s ohledem na možné poddávkování antibiotika. Spolupráce s klinickým mikrobiologem bývá pro rozhodování v klinické praxi velkým přínosem.

Antimykotická profylaxe je opět v případě MM vyloučena pouze pro pacienty, kteří podstupují ASCT. Zde při očekávané neutropenii a mukosiditě je standardně doporučována profylaxe flukonazolem. Preventivní podání antimykotik lze v případech mimo ASCT zvážit u pacientů se slizniční mykózou při podávaných steroidech. Profylaxe pneumocystové pneumonie má své místo zejména u pacientů léčených dlouhodobě vyššími dávkami steroidů (nad 20mg prednisonu po déle než 4 týdny nebo ekvivalent dle NCCN guidelines)

a u pacientů po ASCT, kde NCCN doporučuje profylaxi 3-6 měsíců po ASCT. Individuálně lze samozřejmě tuto profylaxi zvážit i u jiných pacientů s MM.

Protivirová profylaxe se týká především pacientů léčených bortezomibem, carfilzomibem a ixazomibem a pacientů po ASCT. Při léčbě inhibitory proteazomu je nutná profylaxe acyklovirem či valacyklovirem s ohledem na vysoký výskyt herpes zoster, který je udáván až u 13 % pacientů. Dávkování acykloviru je v tomto případě předmětem výzkumu, dle prací z brněnského pracoviště lze efektivně snížit dávku acykloviru až na 200-400mg 1x denně. Po autologní transplantaci je dle doporučení NCCN doporučena profylaxe acyklovirem po dobu minimálně 1 měsíce, dle EBMT minimálně do engraftmentu. Na našem pracovišti dodržujeme podávání acykloviru po ASCT minimálně 3 měsíce po ASCT, zejména s ohledem na možnost vzniku herpes zoster.

Doporučení pro vakcinaci pacientů jsou velmi podrobně shrnuta v doporučeních EBMT. V ČR se rutinně uplatňuje standardní očkovací schéma pro dospělé (tetanus, ...). Je možná vakcinace kterýmikoli neživými vakcínami, nicméně vzhledem k četnosti výskytu jednotlivých infekcí v populaci se současně kloníme k názoru, že očkování nad rámec běžného je individuální věcí každého pacienta. S ohledem na každoročně se opakující epidemie respiračních nákaz s dominancí viru chřipky H1N1 je nutná vysoká obezřetnost v době těchto epidemií. Mortalita na pneumonii H1N1 dosahuje u imunokompromitovaných nemocných zhruba 40 %, proto jsou nutná preventivní opatření. Jednoznačně nejúčinnější je každoroční očkování proti sezónní chřipce. Nutné je zdůraznit, že je třeba očkovat nejenom pacienty, u nichž může být účinnost očkování významně snížena, ale také rodinné příslušníky a všechny pečující osoby, zdravotní personál nevyjímaje.

Komplexní přístup, mezioborová spolupráce, agresivní diagnostika a léčba jsou nezbytné pro úspěšné léčení infekčních komplikací hematologicky léčených pacientů.

2902. MOŽNÉ VYUŽITÍ STANOVENÍ HEVYLITE PRO STANOVENÍ PROGNÓZY U NEMOCNÝCH SE SMOLDERING MNOHOČETNÝM MYELOMEM – VÝSLEDKY SPOLEČNÉHO VÝZKUMNÉHO PROJEKTU CMG

Maisnar V., Pika T., Pour L., Straub J., Machálová K., Walterová L., Kessler P., Jarkovský J., Hájek R. (IV. interní hematologická klinika, FN a LF UK, Hradec Králové; FN a LF UP, Olomouc; FN a LF MU, Brno; VFN a LF UK, Praha; Krajská nemocnice, Liberec; Nemocnice, Pelhřimov; Institut biostatistiky a analýz MU, Brno; FN a LF OU, Ostrava)

Úvod: Hledáním dalších prognostických faktorů se u nemocných s mnohočetným myelomem (MM) zabývá řada pracovišť po celém světě. Cílem je nalezení pokud možno jednoduchých laboratorních vyšetření, která by umožnila identifikovat skupiny nemocných s různým stupněm rizika. Mezi taková vyšetření patří i stanovení imunoparézy, kterou můžeme posoudit pomocí vyšetření koncentrací polyklonálních imunoglobulinů (Ig) nebo nově určením míry suprese alternativního páru monoklonálního imunoglobulinu (MIG) pomocí metody HevyLite. Cíl: Cílem společného výzkumného projektu CMG bylo posouzení významu stanovení imunoparézy pomocí metody HevyLite u nemocných se smoldering formou (dříve asymptomatickým) MM pro určení míry rizika jejich přechodu do formy symptomatické, současně bylo naším cílem i porovnání přínosu této nové metody hodnocení stupně imunoparézy oproti klasickému stanovení koncentrací polyklonálních Ig. Metody: Poslední analyzovaná sestava v rámci této pilotní studie zahrnovala vzorky séra již 96 nemocných se smoldering MM (51 mužů a 45 žen; 71 nemocných s IgG typem a 25 nemocných s IgA typem MIG). V době konání OHD již budeme mít k dispozici výsledky konečné analýzy u téměř 150 nemocných. K stanovení koncentrací párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu a následné stanovení míry imunoparézy bylo využito metody HevyLite na platformě turbidimetru SPA Plus. Projekt je podporován výzkumným grantem výrobce metody, firmou The Binding Site, UK. Statistické zpracování výsledků a základních parametrů analyzovaných nemocných z registru CMG pro nás dlouhodobě zajišťuje Institut biostatistiky a analýz MU Brno. Výsledky: Z 96 nemocných došlo v době zpracování výsledků již u 41 (42,7%) k progresi onemocnění do symptomatické formy. Metoda HevyLite byla statisticky významně spojena s rizikem progresu pouze u nemocných s IgG typem MIG, kdy prokázána statistická významnost ($p = 0,026$) zde byla o něco lepší než při posuzování stupně imunoparézy pomocí klasické metody stanovení koncentrací polyklonálních Ig ($p = 0,043$). Naopak u nemocných s IgA typem MIG se při použití metody HevyLite žádnou statisticky významnou závislost prokázat nepodařilo. Závěr: Zhodnocení stupně imunoparézy patří k významným prognostickým faktorům MM. Jako takový se dnes objevuje i v některých stážovacích prognostických systémech včetně nově navrženého systému CMG pro nemocné se smoldering, dříve asymptomatickým MM. Výsledky naší pilotní studie zatím potvrdily přínos metody HevyLite jako nového prostředku pro posouzení imunoparézy pouze u nemocných s IgG typem MIG, což je ve shodě s dosud publikovanými daty. Projekt byl

podporován výzkumným grantem firmy The Binding Site a grantem IGA MZ NT 12215/3.

2870. LÉČBA 14 PŘÍPADŮ CASTLEMANOVY NEMOCI

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

Castlemanova choroba je termín pro reaktivní lymfocytární a plazmocytární proliferaci, která se vyskytuje buď ve formě lokalizované, unicevrické, obvykle bez systémových příznaků, nebo ve formě generalizované, multicentrické, obvykle se systémovými příznaky. Vysoká koncentrace celkové bílkoviny, případně plazmocytární infiltrace odebrané lymfatické uzliny tyto pacienty často přivede na ambulanci pro mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie. V posledních 25 letech jsme diagnostikovali, léčili a sledovali celkem 14 histologicky jednoznačně prokázaných případů Castlemanovy nemoci. Sedm pacientů mělo lokalizovanou formu nemoci. V pěti ze sedmi případů bylo patologické ložisko uloženo intrathorakálně či intraabdominálně a pouze u dvou bylo na povrchu těla. U žádného nemocného s unicevrickou formou nemoci nebyly přítomny klinické příznaky a u všech těchto osob vedla operační léčba k totálnímu odstranění nemoci. Naproti tomu u všech sedmi pacientů s multicentrickou formou Castlemanovy nemoci se vyskytovaly febrilie nebo subfebrilie. Tři z těchto sedmi pacientů si stěžovali na výrazné a obtěžující noční pocení. Klinické projevy vaskulitidy, která byla příčinou cévní mozkové příhody, byly přítomny u 1 ze 7 pacientů. Osteosklerotické změny na skeletu jsme detekovali u jednoho nemocného, u něhož byla i retence tekutin,

pravděpodobně související s touto nemocí. Polyklonální zmnožení imunoglobulinů, dominantně imunoglobulinu typu IgG, bylo přítomno u pěti ze sedmi pacientů s multicentrickou formou. V jednom případě byla navíc přítomna kompletní molekula monoklonálního imunoglobulinu a v jednom případě byly zvýšené volné lehké řetězce kappa. Pro diagnostiku multicentrické formy nemoci bylo třeba u šesti ze sedmi pacientů více než jednoho odběru materiálu pro histologické vyšetření zvětšených lymfatických uzlin. Pro diagnostiku této nemoci se ukázalo přínosné provést operační odstranění a histologické vyšetření těch uzlin, které nejvíce akumulovaly fluorodeoxyglukózu při PET-CT vyšetření. Základem léčby byla v posledních letech monoklonální protilátka antiCD20 rituximab, anebo thalidomid či lenalidomid, případně jejich kombinace. Nejnovějším lékem pro tyto nemocné je protilátka proti interleukinu-6 zvaná siltuximab (Sylvant), s ní však zatím vlastní zkušenosti nemáme. Z našich sedmi pacientů s multicentrickou formou bylo léčeno pět, jeden pacient léčbu odmítl a u jednoho nejsou známky aktivity nemoci natolik vyjádřené, že by vyžadovaly léčbu. Léčba obsahující rituximab docílila kompletní remise u dvou pacientů a léčba obsahující thalidomid a lenalidomid dovedla tři pacienty do kompletní remise nemoci. V jednom z těchto případů nemoc nereagovala na iniciační léčbu rituximabem a remisi navodil thalidomid a lenalidomid a v jednom z těchto případů nemoc nereagovala na iniciační léčbu thalidomidem a kompletní remise bylo dosaženo rituximabem. Zatím došlo k recidivě jen u jednoho pacienta s multicentrickou formou Castlemanovy nemoci po ukončené léčbě a u něj probíhá léčba obsahující bortezomib po schválení revizním lékařem.

AKUTNÍ LEUKEMIE/CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE

2885. TOWARDS ERADICATING STEM CELLS AND ACHIEVING CURE IN CML

Burchert A. (Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Marburg - D)

Abstrakt sdělení není k dispozici.

2865. ALTERNATIVNÍ DÁRCI U TRANSPLANTACÍ AKUTNÍCH LEUKÉMIÍ

Jindra P. (HOO, FN, Plzeň)

U akutních leukémií (AL), především myeloidních, je alogenní transplantace krvetvorných buněk (aloTKB) je stále léčbou s největším protileukemickým potenciálem, pro řadu typů pak jedinou kurativní léčbou. Na rozdíl od ostatních hematologických malignit, především lymfoidních, je konvenční léčba postavena nadále na klasických, po desetiletí známých cytostatických schématech, protože moderní cílená ne cytotoxická léčba (protilátky, inhibitory kináz apod. .) zatím prakticky neexistuje. Tudíž aloTKB zprostředkovaný graft-versus leukemia (GVL) efekt je stále pilířem nejen záchranné

(tedy mimo 1. remisi), ale i postremisní (konsolidační) léčby AL (Cornelissen a kol 2016). Historicky byla aloTKB omezena toxicitou vlastní procedury, která limitovala její aplikaci pouze na mladší nemocné, nicméně nástup tzv. nemyeloablativních režimů (nebo také režimů s redukcovanou intenzitou přípravy) umožnil její uplatnění i u starších leukemických pacientů, kteří tvoří většinu. Dalším dříve limitujícím faktorem byla častá absence vhodného dárce, nicméně rozvojem registrů nepřibuzných dárců, bank pupečnickové krve a možností využít částečně shodné příbuzné dárce (haploidentické) bylo toto eliminováno a AL se tak v posledním desetiletí staly hlavní indikací k aloTKB. Dle dat EBMT i CIBMTR z roku 2012 představují AML shodně přibližně 35% a ALL 15%, lze tedy říci, že globálně je 50% provedených aloTKB indikováno pro diagnózu akutní leukémie.

Úspěšnost aloTKB v současnosti determinují 2 hlavní faktory - vlastní toxicita procedury (transplantační mortalita) a relaps. Oba tyto faktory jsou přitom výrazně ovlivněny výběrem dárce a optimálním načasováním transplantace. Jinými slovy lze říci, že včasná identifikace a výběr optimálního dárce zásadně ovlivňuje jak transplantační mortalitu, tak riziko relapsu a je tedy pro aloTKB zásadní.

Historicky byl za jediného možného dárce považován HLA-genoidentický sourozenec. Bohužel na základě dědičnosti HLA systému je tento dostupný pouze pro 25-30% pacientů, navíc u typického pacienta s AML jde často o sourozence pokročilejšího věku a tedy s komorbiditami kontraindikujícími odběr krvevorných buněk. Tato omezená dostupnost dárců byla důvodem založení registrů dobrovolných nepřibuzných dárců a v současnosti je v těchto registrech k dispozici více než 28 milionů dobrovolných dárců (viz www.bmdw.org), takže 9-10/10 HLA shodného dárce nalezneme pro >80% „kavkazoidních“ pacientů. Problémem zůstávají etnické minority, které nejsou v registrech zastoupeny. To vedlo k etablování bank pupečnickové krve, neboť pupečnicková krev může být díky menší imunogenicitě štěpu transplantována i s výrazně menší HLA shodou. V současnosti je takto k dispozici takřka 700 000 pupečnickových kreví (www.bmdw.org). Dalším problémem byla rychlost nalezení shodného nepřibuzného dárce, neboť pro optimální výsledek aloTKB je třeba transplantovat v 1. či jiné remisi a zdlouhavé vyhledávání shodného dárce v registrech může výsledek transplantace kompromitovat. To vedlo od 90. let k intenzivní snaze využít jako dárce i pouze částečně HLA shodné příbuzné - tzv. haploidentické dárce. Počáteční náročné manipulace se štěpem (CD34 selekce, in vivo T-deplece), které vedly k opožděné imunitní rekonstituci, vysoké transplantační mortalitě s vysokým rizikem relapsu a neumožňovaly

masívnější rozšíření metody, byly v posledních 10 letech nahrazeny jednoduchou a elegantní imunosupresí postransplantačním cyklofosfamidem. To umožnilo rutinní zavedení haploidentických transplantací do běžné klinické praxe.

V současnosti tedy pro pacienty s AL máme celkem 4 základní typy dárců či zdrojů krvevorných buněk: (1) HLA genoidentický sourozenec, (2) nepřibuzný 10/10 či 9/10 shodný, (3) pupečnickovou krev a (4) haploidentický příbuzný (částečně HLA shodný). Historické rozdělení označovalo všechny dárce kromě HLA identického sourozence (tedy dárce skupiny 2-4) jako dárce alternativní. Nicméně od této klasifikace je v současnosti již upouštěno jak doloženo dále v textu. Jednotlivé typy dárců, jejich hlavní výhody a nevýhody lze stručně shrnout následovně:

HLA genoidentický sourozenec je historicky považován za primárního a preferovaného dárce. Výhodou je garance imunogenetické kompatibility v klasických HLA genech. Na druhou stranu polymorfismus v non-HLA genech (mHA, cytokiny, apod.) zajišťuje žádoucí GVL efekt, který chybí u syngenních sourozenců. Nevýhodou je limitovaná dostupnost - maximálně pro 25-30% pacientů, která je dále kompromitována klesajícím počtem sourozenců v populaci a rostoucím věkem transplantovaných leukemiků, kdy logicky roste i věk sourozenců a tím i přítomnost kontraindikací odběru krvevorných buněk. Potenciálně negativní efekt vyššího věku shodných sourozenců oproti mladším, HLA shodným nepřibuzným dárům nebyl přesvědčivě doložen a v současnosti je proto dostupný HLA identický sourozenec nadále považován za dárce první volby (první preferovaný dárce).

Nepřibuzný 10/10 shodný dárce je v současnosti považován za zcela rovnocennou alternativu oproti příbuzným HLA shodným sourozencům. Řada studií doložila v podstatě identické výsledky aloTKB u obou typů dárců, kdy mírně zvýšenou TRM u nepřibuzného dárce vyrovnává díky výraznější GVL reakci menší riziko relapsu. Výhodou je (alespoň u běžných „kavkazoidních“ genotypů) obvykle přítomnost několika 10/10 shodných dárců. Tak je možno optimalizovat výběr toho nejlepšího dárce i dle tzv. non-HLA faktorů (věk, pohlaví, KIR genotyp, CMV, DPBI kompatibilita...). Tímto je možno do značné míry personalizovat výběr dárce pro specifického pacienta s leukémií dle relativního rizika relaps versus TRM, což u sourozenců obvykle možné není. Nevýhodou je kromě finanční náročnosti především časová náročnost. Celá procedura vyhledávání a organizace vlastního odběru nepřibuzného dárce totiž trvá průměrně 2-3 měsíce, což u rizikových

leukémií může znamenat transplantaci mimo 1. CR a tím i zhoršení prognózy transplantace. Pokud jde o transplantaci s 9/10 HLA shodnými nepříbuznými dárci, tak ty je spojena s vyšším rizikem TRM v důsledku GVHD a tedy s cca o 10% horším celkovým přežitím po aloTKB, nicméně u vysoce rizikových leukémií (rezistentní, monosomální karyotyp u AML, Ph+ALL) při nedostupnosti příbuzného či 10/10 shodného nepříbuzného dárce jsou i tito dárce obecně akceptovatelnou a doporučovanou alternativou.

Transplantace s pupečnickovou krví bylo primárně využíváno u pacientů etnických minorit, kteří neměli dárce v rodině ani nepříbuzné dárce v registrech. Centra se zkušeností v tomto typu transplantací zaznamenala výsledky srovnatelné s transplantacemi s dospělými nepříbuznými dárci. Principem a hlavní výhodou byla kromě okamžité dostupnosti, nižší imunogenicitu štěpu pupečnickové krve, která umožnila transplantovat i přes několik HLA neshod. Nevýhodou byla výrazná finanční náročnost, malý obsah krvetvorných buněk limitující využití u dospělých a v neposlední řadě i nemožnost případné další adoptivní imunoterapie (např. DLI). V současnosti díky rozvoji haploidentických transplantací dochází globálně k ústupu od pupečnickových krví, data EBMT i CIBMTR zaznamenávají v posledních 2 letech jejich signifikantní pokles a stejně tak systematicky klesá počet nově zařazených pupečnickových krví. V ČR je tento typ transplantací okrajovou záležitostí omezenou prakticky jen na pediatrické transplantací centrum v Praze-Motole.

Transplantace s haploidentickými dárci jsou intenzivně zkoumány již od 90. let 20. století, kdy se této problematice začala věnovat italská skupina dr. Velardiho a Ruggeriho. Nicméně jejich postup spočívající v extenzivní in vivo a ex vivo T-buněčné depleci byl jednak velmi komplikovaný, jednak spojený s opožděnou imunitní rekonstitucí a z toho plynoucí vysokou incidencí oportunních infekcí a relapsu, takže se nedočkal obecného rozšíření. Průlom znamenalo až zavedení potransplantačního cyklofosfamidu bostonskou skupinou (Luznik, Brunstein a kol.), což díky jednoduchosti, finanční nenáročnosti a především efektivity tohoto postupu vedlo k jeho celosvětovému rozšíření a v současnosti zaznamenáváme až explozivní vzestup provedených výkonů. Další zásadní výhodou je především okamžitá dostupnost dárce prakticky pro každého pacienta s AL, přičemž TRM (respektive GVHD) je srovnatelná s HLA shodnými sourozeneckými či nepříbuzenskými transplantacemi. Nevýhodou oproti transplantacím s nepříbuzným dárce je vyšší riziko relapsů a mírně vyšší riziko oportunních infekcí. Celkově se dle recentních dat (Ciurea a kol, 2015) zdají

být výsledky srovnatelné jak s 10/10 shodnými nepříbuznými dárci.

Je stále zjevnější, že termín „alternativní dárce“ nabývá v roce 2016 zcela jiný význam než v letech minulých. V současnosti již prakticky neexistuje pacient s akutní leukémií, který by neměl vůbec žádného dárce, obvykle dokonce máme k dispozici různé typy dárce (např. nepříbuzenský 10/10 shodný a haploidentický). Přestože zlatým standardem a primární volbou zůstává shodný sourozenec, všechny výše uvedené typy dárce je víceméně možno považovat za standardní dárce a současně jsou všechny i alternativními. A to alternativními ve smyslu možnosti výběru nejlepšího dárce pro daného pacienta se specifickým typem leukémie, tj. dle specifického rizika relapsu či naopak TRM. S určitou mírou nadsázky lze říci, že podobně jako v léčebných protokolech vstupujeme do éry „personalizovaných“ dárce.

Práce byla podpořena grantem MZ ČR-RVO (Fakultní nemocnice Plzeň-FNPI, 00669806), granty MZ 15-30661A, 15-25809A, grantem TA-ČR TA04010727 a grantem Nadace pro transplantaci kostní dřeně.

2863. MODERNÍ DIAGNOSTIKA A RIZIKOVÁ STRATIFIKACE ALL POMOCÍ GENOMICKÝCH METOD

Trka J., Kubričanová Žaliová M., Froňková E. (CLIP, Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha)

Během posledních několika let umožnil rychlý rozvoj „high-throughput“ metod kompletní genomickou charakterizaci leukemických buněk i genetického pozadí pacienta. Masivně paralelní sekvenování (známé jako sekvenování nové generace – NGS) umožňuje číst sekvenci celého genomu, exomu, transkriptomu nebo provádět velmi hlubokou sekvenční analýzu vybraných amplikonů. Výsledkem je identifikace bodových mutací, malých insercí a delecí, genových přestaveb, fúzních genů a genového expresního profilu. Sekvenční metody mohou být dále komplementovány metodou detekce jednonukleotidových polymorfismů (SNP arrays), která identifikuje rozsáhlejší amplifikace či delecce. Identifikace genetických změn může být využita pro přesnější stratifikaci pacientů do rizikových skupin či přímo pro cílení terapie - např. kinasovými či jinými inhibitory, monoklonálními protilátkami nebo dalšími novými léky. Přestože se objevují jednotlivé kasuistiky či malé studie dokumentující takové využití genomických informací v léčbě, v oboru akutních leukémií dosud neexistuje jednotný přístup k algoritmu vyšetřování ani aplikaci získaných informací.

Akutní lymfoblastická leukemie (ALL) je nejčastějším maligním onemocněním u dětí. Během posledních desetiletí dosahuje šance na přežití dětských pacientů léčených moderními protokoly až 90%. Posledním velkým kvalitativním skokem v léčbě nově diagnostikované dětské ALL bylo zavedení metod detekce minimální residuální nemoci (MRN) pomocí molekulárních technik – průtokové cytometrie a kvantitativní PCR. Přes tento pokrok a dokonalejší stratifikaci pacientů stále 15% pacientů prodělá relaps nemoci, který významně snižuje jejich šanci na celkové vyléčení. Část těchto pacientů pochází ze skupiny dětí identifikovaných jako vysoce rizikové již v průběhu iniciální fáze léčby, početně větší skupinu relapsů však tvoří děti ze skupiny středního rizika bez přítomnosti známých vysoce rizikových genetických znaků a s průměrnou odpovědí na léčbu měřenou pomocí MRN. Vytipovat tyto děti a nabídnout jim intensivnější nebo alternativní léčbu je tedy naším hlavním současným úkolem.

V poslední dekádě byly popsány zajímavé nové rizikové znaky, např. delece genu IKZF1, vysoká exprese genu CRLF2 či mutace genů JAK1/2 vedoucí k aktivaci dráhy JAK/STAT. Při využití stratifikace založené na MRN je však jejich význam oslabený a samy o sobě nemohou být využity k rizikové stratifikaci. Nicméně širší aplikace genetických, případně genomických metod odhaluje další, lépe definované podskupiny – např. pacienti s delecí v genu ERG mají dobrou prognosu bez ohledu na přítomnost aberací genu IKZF1, a naopak přítomnost některých dalších aberací společně s delecí IKZF1 definuje prognosticky velmi špatné leukemie nazývané „IKZF1plus“.

Expresní profilování zase odhalilo podskupinu pacientů s expresním profilem podobným Ph pozitivním ALL, část z nich s velmi špatnou prognosou. Tvoří cca 15% ze všech pacientů s B prekursorovou ALL a až polovinu z pacientů označovaných v anglické literatuře jako „B-others“, neboli ALL z prekursorů B buněk bez přítomnosti známé translokace nebo jiné klasické genetické aberace. Navazující genomické studie u některých z těchto „Ph-like“ ALL odhalily přítomnost fúzních genů s aberantní kinasovou aktivitou, resp. mutace genů v kinasových drahách. Tyto aberace jsou potenciálně cílitelné JAK inhibitory nebo kinasovými inhibitory. Bohužel, metodika expresního profilování je jako diagnostická metoda obtížně standardisovatelná a identifikace „Ph-like“ pacientů tímto způsobem není možná. Alternativou je tedy zahrnout do genomického screeningu širší skupinu pacientů, ideálně všechny pacienty s „B-other“ ALL, nebo šířeji využít metody založené na PCR nebo FISH pro prescreening dosud známých kinasových translokací.

Postupy NGS se postupně uplatňují i ve sledování MRN. Mezinárodní konsorcium EuroClonality NGS dokončuje standardisaci amplikonových sekvenčních panelů cílených na přestavby imunoreceptorových genů pro použití při screeningu cílů i kvantifikaci MRN v průběhu léčby. První publikované výsledky ukazují, že NGS je minimálně stejně citlivou, rychlejší a méně pracnou alternativou klasického postupu založeného na individuálních qPCR systémech pro jednotlivé pacienty.

V laboratořích CLIP jsme zavedli vyšetřování pomocí SNP arrays u všech nově diagnostikovaných dětských pacientů a pacientů s relapsem ALL. Tímto vyšetřením komplementujeme tradiční screening prognosticky významných fúzních genů a spolehlivě určujeme ploidii a přítomnost rozsáhlejších amplifikací či delecí, včetně např. delecí genu IKZF1 či ERG. Další genomická vyšetření – tedy NGS analysu exomu a transkriptomu – rezervujeme pro pacienty kategorie „B-other“, pacienty velmi vysokého rizika relapsu (s přetrvávajícími vysokými hladinami MRN i v průběhu blokové léčby ve vysoce rizikovém rameni protokolu) a pacienty s relapsem. V současné době pracujeme pomocí genomických přístupů na zmapování výskytu dosud popsaných i nepopsaných aberací v těchto skupinách pacientů a testujeme možnosti validace nových nálezů – ať už na genetické úrovni, nebo pomocí funkčních přístupů, např. průtokové cytometrie zaměřené na fosforylaci proteinů v signálních drahách. Podle nálezu cílitelných aberací pak hodláme směřovat pacienty ke specifické léčbě, v případě nálezu necílitelných aberací či velmi vysoce rizikových znaků k alternativní léčbě založené na bispecifických protilátkách či genetických modifikovaných T buňkách. Pokud se prokáže praktická proveditelnost tohoto postupu a možný benefit pro pacienty, je tento přístup cestou k individualisované a účinnější léčbě pacientů s ALL.

Podpořeno granty NV15-30626A a GBP302/12/G101.

2981. INFEKČNÍ KOMPLIKACE INDUKČNÍ LÉČBY AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIE BEZ POUŽITÍ ANTIBIOTICKÉ PROFYLAXE: 10 LET ZKUŠENOSTÍ JEDNOHO CENTRA

Čerňan M., Szotkowski T., Kolář M., Hubáček J., Faber E., Indrák K., Papajík T., Fürst T., Fürstová J. (Hemato-onkologická klinika, LF UP a FN, Olomouc; Ústav mikrobiologie, LF UP a FN, Olomouc; Katedra matematické analýzy a aplikací matematiky, Přírodovědecká fakulta UP, Olomouc)

Indukční léčba představuje jednu z nejrizikovějších fází terapie akutní myeloidní leukemie (AML). Výskyt

infekčních komplikací je v důsledku těžce redukované normální krvetvorby velmi častý. Infekce představují významný rizikový faktor mortality primárního onemocnění. Cílem práce bylo komplexně popsat a vyhodnotit výskyt infekčních komplikací v průběhu prvního cyklu indukční chemoterapie. Soubor reprezentuje 168 nemocných s akutní myeloidní leukemií (non-M3 AML) léčených na Hemato-onkologické klinice LF UP a FN v Olomouci v letech 2006-2015. V souboru nebyla u žádného z nemocných použita antibiotická profylaxe. Indukční léčbu podle protokolu 7+3 s mitoxantronem podstoupilo 88 (52,4%) a indukci 7+3 s daunorubicinem 80 (47,6%) nemocných. Celkem bylo dokumentováno 249 febrilních epizod (FE). Febrilní epizoda byla definována jako období začínající prvním dnem s febriliemi a končící dnem, kdy teploty byly nejméně 3 po sobě následující dny pod 37,5°C bez medikace antipyretik či kortikosteroidů. Ze 168 pacientů mělo 157 (93,5%) v průběhu indukční chemoterapie febrilní epizodu. Jedna FE byla zaznamenána u 78 (46,4%), dvě u 67 (39,9%) a tři u 11 (6,5%) nemocných. Jeden pacient měl 4 FE. Klinicky a/nebo mikrobiologicky dokumentovaná infekce byla přítomna u 140 (56,2%) FE. Seps byla příčinou u 44 (17,7%) FE a seps provázející jinou lokalizovanou infekci byla přítomna u 25 (10,0%) febrilních epizod. G+ agens bylo zachyceno u 44/69 (63,8%) a G- agens u 31/69 (45,0%) sepsí. 12 (17,4%) sepsí bylo provázeno septickým šokem. Klinicky definované infekce byly přítomny u 71 (28,5%) FE. Zánětlivý plicní infiltrát byl nejčastější klinicky definovanou infekcí, přítomnou u 52 (20,9%) FE. Jako horečka nejasného původu (FUO) bylo uzavřeno 109 (43,8%) FE. Prokázané invazivní mykotické infekce byly popsány u 2 (0,8%), pravděpodobné u 11 (4,4%) a možné u 49 (19,7%) FE. 13 (7,7%) nemocných mělo v průběhu indukce virovou (suspektně herpetickou) kožní či slizniční infekci a 5 (3,0%) klostridiovou enterokolitidu. Bez známek infekce proběhla indukční chemoterapie u 11 (6,3%) pacientů. Infekční komplikace byly příčinou úmrtí u 9 (5,4%) nemocných ve sledovaném souboru. Dosažení hematologické remise onemocnění mělo významný pozitivní vliv na délku neutropenie (23,2 vs. 27,0 dní, $p=0,0002$), počet FE v průběhu indukce (1,4 vs. 1,6 FE, $p=0,01$) a celkovou délku trvání febrilních epizod (6 vs. 9 dní, $p=0,025$). Složení indukční chemoterapie (mitoxantron vs. daunorubicin) ani dávka daunorubicinu (45 vs. 60/90 mg/m²) neměly významný vliv na počet FE v průběhu indukce (1,4 vs. 1,6 FE, $p=0,52$, resp. 1,4 vs. 1,6 FE, $p=0,2$). Dosažení remise, složení indukční chemoterapie ani dávka daunorubicinu obecně neměly významný vliv na rozdíly v zastoupení jednotlivých příčin FE v příslušných podsouborech nemocných. Výskyt infekčních komplikací u paci-

entů léčených na Hemato-onkologické klinice LF UP a FN Olomouc bez antibiotické profylaxe se významně nelišil v porovnání se skupinami pacientů uváděnými v literatuře, kteří dostávali antibiotickou profylaxi. Podání indukční chemoterapie bez antibiotické profylaxe obecně vede k nižšímu selekčnímu tlaku a pomalejšímu vývoji antibiotické rezistence se zachováním účinnosti iniciální antibiotické terapie febrilní neutropenie. Kontrola vývoje rezistence, monitorování nežádoucích účinků a sledování klinické účinnosti by mělo být podmínkou používání antibiotické léčby v průběhu indukční chemoterapie AML. Práce byla zpracována s grantovou podporou IGA_LF_2016_001.

2883. JEDNOTNÝ LÉČEBNÝ PROTOKOL A VČASNÁ INDIKACE K TRANSPLANTACI KRVETVORNÝCH BUNĚK VÝZNAMNĚ ZLEPŠILY VÝSLEDKY LÉČBY DĚTÍ A DOSPÍVAJÍCÍCH S RELAPSEM AKUTNÍ LYMFOLASTICKÉ LEUKÉMIE V ČESKÉ REPUBLICE

Šrámková L., Sedláček P., Froňková E., Janotová I., Štěrba J., Bernatíková H., Mihál V., Novák Z., Blažek B., Kuhn T., Hak J., Procházková D., Votava T., Tímr P., Suková M., Smíšek P., Keslová P., Houdková A., Mejstříková E., Hrušák O., Zuna J., Trka J., Starý J. (Klinika dětské hematologie a onkologie, 2.LF UK a FN Motol, Praha; FN, Brno; FN, Olomouc; FN, Ostrava; FN, Hradec Králové; Masarykova nemocnice, Ústí nad Labem; FN, Plzeň; Nemocnice, České Budějovice)

Relaps akutní lymfoblastické leukémie (ALL) znamenal po dlouhou dobu konec nadějí na vyléčení pro většinu dětí i dospívajících. V devadesátých letech proběhlo v České republice sjednocení léčby relapsu dle intenzivních německých BFM protokolů, byl zahájen program transplantace krvetvorných buněk (HCT) od příbuzných i nepříbuzných dárců, optimalizovalo se časování transplantace v léčebném schématu. 10letý EFS/OS 97 dětí s relapsem ALL v období 1992-2002 byl 18,6/22,7%. V 12-letém období 7/2002 – 6/2014 postihl první relaps 94 pacientů (11 starších 18 let), jejichž iniciální léčba proběhla dle pediatrických protokolů. 88 z nich bylo léčeno ve studii ALL-REZ BFM 2002 a jsou předmětem analýzy. Léčba ve studii byla stratifikována dle intervalu mezi iniciální diagnózou a relapsem, místem relapsu a dle imunofenotypu. Do nízkého rizika (skupina S1) byly řazeny pozdní izolované mimodřeňové relapsy, do středního rizika (S2) časné izolované relapsy, pozdní izolované a všechny kombinované relapsy BCP-ALL, vysoké riziko (S3+S4) tvořily všechny dřeňové relapsy T-ALL a časné izolované dřeňové relapsy

BCP-ALL. Děti v S1 skupině byly léčeny pouze chemoterapií, pacienti středního rizika byli indikováni k HCT dle výše minimální residuální nemoci po skončení indukce a pacienti vysokého rizika byli k HCT indikováni všichni. Izolovaný dřeňový relaps prodělalo 61 dětí, kombinovaný dřeňový relaps 11 pacientů, izolovaný extramedulární relaps 16 (testikulární 7, CNS 9). Remisi dosáhlo 92% (81) pacientů souboru, k HCT v druhé remisi bylo indikováno 54 dětí a 51 ji podstoupilo (2 prodělaly druhý relaps před HCT a zemřely a 1 rodiče odmítli transplantaci). Osm dětí (15%) zemřelo na potransplantační komplikace a 9 prodělalo relaps. 5letý EFS/OS transplantovaných je 66,7±6,6%/69,7±6,6%. Dvacet osm dětí bylo indikováno pouze k chemoterapii, žádné nezemřelo v remisi, 11 prodělalo druhý relaps. Jejich EFS/OS je 59,4±9,5%/81,5±7,5%. Deset dětí podstoupilo HCT v třetí remisi, 2 zemřely na potransplantační komplikace, 4 prodělaly relaps. Celkem žije 59 dětí (67%) souboru (v CR2: 48, CR3: 6, CR4: 1, floridní relaps: 1). Tři děti žijí

po léčbě sekundární malignity. S mediánem sledování 8,3 r (1,5 - 13,5r) je 8 letý EFS/OS celé skupiny 88 dětí 57,0±5,4%/66,1±5,2%. Analýza výsledků podle stupně rizika relapsu: relaps nízkého rizika (testikulární: 3, CNS: 1) prodělaly čtyři děti (5% souboru) a všechny žijí. Z 56 dětí středního rizika (63% souboru) dosáhly všechny druhou remisi, 33 z nich (59%) bylo indikováno k HCT v 2. remisi a 32 ji podstoupilo, EFS/OS této skupiny je 66,2±6,5%/81,0±5,4%. Z 28 dětí vysokého rizika (32% souboru) dosáhlo druhou remisi 75% (21) pacientů, 19 podstoupilo HCT v 2. remisi a EFS/OS této skupiny je 32,1±8,8%/31,0±8,9%. Závěr: Výsledky léčby relapsu ALL v České republice jsou lepší než publikované výsledky většiny předních leukemických pracovních skupin. Jsou důsledkem volby optimálního léčebného protokolu, velmi dobré spolupráce leukemických center, časného hledání dárce k transplantaci ihned po diagnóze relapsu, optimálního časování HCT. Pro děti s relapsem vysokého rizika je nutné hledat nové léčebné postupy.

PSYCHOLOGIE

2874. UMĚNÍ KOMUNIKOVAT - ÚŽASNÝ LÉČEBNÝ NÁSTROJ

Kalvodová L., Škrobánková A. (*Psychoonkologická sekce ČOS ČLS JEP, Brno; Hematoonkologická klinika, FN, Olomouc*)

Budoucí pacient onkologické kliniky přichází domů po komplexním vyšetření a všichni jemu blízcí se ptají: „Tak co, jak to dopadlo, CO TI ŘÍKAL PAN DOKTOR?“ A zmatený budoucí pacient nedokáže odpovědět, nevzpomíná si na lékařova slova, bylo jich tolik, mnohá zněla cize, v paměti si podržel jedinou ucelenou informaci, ŽE MÁ RAKOVINU.

Rozmluva pacienta s jeho lékařem je v každém okamžiku léčby téměř stejně důležitá jako postupy a léky samotné. A přece umění vést dialog s pacientem může často být pro lékaře nepříjemná, zrádná a čas beroucí disciplína. Pokud nemá v sobě dar řeči, škola jej na ni nepřipravila, zvládá rozhovor jak nejlépe umí/neumí.

Psychologům se to dobře mluví, jazyk a řeč je jejich léčebný nástroj, umí s ním zacházet, poznají, jak v každé chvíli užít nejen slova, ale také mimoslovní techniky. Poznají, kdy s pacientem mlčet, kdy informaci opakovat, kde zvýšit hlas, kdy nabídnout odpočinek s douškem vody. Oni se to také museli naučit, i když dokážou odhadnout, jakou mají před sebou osobnost pacienta a v jakém psychickém rozpoložení se nachází.

Chceme posluchačům kombinací obecného poznatku a konkrétního příběhu ukázat, jak psycholog řeší slovem každou možnou situaci, ve které se pacient octne v léčbě i po ní.

Užijeme šablonu, kterou jistě všichni zdravotníci znají, která je všeplatná pro chování a prožívání všech lidí, kteří se dostanou do těžké, krizové, život ohrožující situace.

E. Kubler - Ross postulovala zákonitě lidské psychické reakce na závažnou zprávu, událost.

ŠOK

Jak se chovat k člověku, který si právě vyslechl šokující informaci. Co vidíme? Obrannou pozici těla schoulením do fetální polohy a ztuhnutí v ní, nechápavá mimika, odvrácení zraku, zrychlené dýchání, pocení, zoufalá snaha porozumět informaci, kterou dostává.

PŘÍBĚH p. Věry, která téměř ze dne na den začala „bojovat“ o život - „... všechno začalo začátkem března, kdy jsem vyrazila se svými dětmi na kolečkových bruslích na výlet. Při cestě domů jsem se střetla s pejskem ... byla z toho zlomená ruka. Rána se nehojila, postupně se můj zdravotní stav zhoršoval ...“

POPŘENÍ - ODMÍTÁNÍ

Po odeznění šoku nastupuje otázka PROČ JÁ? CO JSEM UDĚLAL/A ŠPATNĚ? a vzápětí popření TO NEJSOU MÉ VÝSLEDKY, SPLETLI JSTE SE, ODCHÁZÍM OVĚŘIT SI INFORMACI K TĚM, KTERÝM VĚŘÍM. Je to většinou

bojový postoj s užitím jasných neverbálních prostředků odmítání, narovnaní těla, klopení zraku, odvrácení se, hlasitá jasná řeč, opakování negativních argumentů proti informaci.

PŘÍBĚH p. Marie, která musela ujít dlouhou cestu, aby dokázala nazývat věci pravým jménem - „ ... mám nějaké problémy s krví, ale nemyslím si, že je to rakovina. Tím, že mi vyšetřují krev, musím být tady, ale nic to nebude a zase půjdu domů ...“

AGRESE

Tak přece je to pravda, mám rakovinu. A znovu zpočátku sebeobviňování, co bylo v životě pacienta špatně, že dostal nemoc se velmi brzy překlápí v zlostnou, až nenávistnou reakci jak verbální, tak nonverbální. Psychickým zpracováním pravdy o nemoci je lítost nad zradou svého těla a samotnou neschopností s tím něco sám aktivně udělat. Smutek se tu překlápí do razantního odmítání všech zdravých lidí ve svém okolí - blízkých - NECHOĎTE ZA MNOU A NIC MI NENOSTE, sester - CO MI TO DĚLÁTE? NIC NECHCI, svého těla - NEBUDU NIC JÍST NEMÁM HLAD, DEJTE MI POKOJ. Nemluví nebo když mluví, tak nadává, kritizuje, je nenávistný a je připraven k boji se všemi.

PŘÍBĚH p. Marka, který s úsměvem dokázal ublížit a nějakou dobu trvalo, než si přiznal proč - „ ... vždyť to sama vidíte! To fakt nemá cenu! ...“

SMLOUVÁNÍ

Pacient vyčerpaný předešlými agresivními výpady se ve svém psychickém nastavení mění v pokorného prosebníka, který se obrací k veškeré moci světské i božské a prosí. O možnost dokončení svého životního poslání, o čas, ve kterém bude moci přivítat narození vnoučat, o prodloužení života za pokoru a usmíření. Prosby adresuje všem kolem sebe, často se sepjatýma rukama a s očekáváním magického dětského zázraku, dychtivě, upřímně.

PŘÍBĚH p. Líby, která zvládla rubínovou svatbu a ještě o dost víc - „ ... jsem s jedním chlapem 55 let a když nic jiného tak to s těmi chemoterapiemi do července zvládnou ...“

DEPRESE

Vysvobození nepřichází, pacientova psychika se prudce propadá do bezmoci a beznaděje, úzkost přináší intenzivní pocity blízkosti smrti, VŠE JE ZTRACENO, NENÍ MI POMOCI a v bezesných nocích v hlavě koluje emoční smyčka o pár slovech MÁM RAKOVINU, BUDU UMÍRAT V BOLESTECH, NEMÁM ŠANCI ŽÍT. Hluboká sebelítost, nekonečná frustrace, zmarnění životních přání a tužeb, obrovská, nekonečná únava. Patologický stav těžké deprese. Tento stav by měl být včasné rozpoznán a léčen.

PŘÍBĚH p. Ivana, který se znovu začal usmívat - „ ... vždycky jsem byl spíše smutný muž, ale až teď si s tím moc nevím rady, zvlášť když je to nejen nemoc, co mne trápí ...“

SMÍŘENÍ

Překonáním deprese se završuje celý cyklus martyrií, psychických krizí, provázejících pacienta v léčbě. Potřeba blízkých se stává nezbytností, dokáže se i zasmát se sestrami, mluví, konečně mluví o tom, že chce žít a věří, že se mu to spolu s lékaři podaří. Pohlíží na nemoc jako na nutné zlo, kterého je nutno se zbavit. Kooperuje s porozuměním.

PŘÍBĚH sl. Šárky, která měla krásné oči a v sobě obrovskou sílu - „ ... Přijde mi, že je to pro mne jednodušší než pro ostatní. Já jsem připravená, oni ne ...“

Psycholog si sice oddechne, ale stále je na stráž, protože velmi dobře ví, že křehkost pacientovy psychiky je v léčbě i dlouho po ní rozvratitelná a náchylná krizovým selháním. Psycholog svého pacienta provází nejen u lůžka, ale je mu nablízku, je mu k dispozici, kdykoliv pacient potřebuje najít rovnováhu v novém životě. Největší poctou práci psychologa je, když bývalý pacient po kontrole u onkologa jde si povídat se SVÝM psychologem.

LITERATURA

- DeVito, J.A.: Základy mezilidské komunikace, Grada 2001
Tschutschke, V.: Psychoonkologie, Portál 2004
Tate, P.: Příručka komunikace pro lékaře, Grada Publishing, a.s. 2005
Kubler - Ross, E.: Otázky a odpovědi o smrti a umírání, Arita, Turnov 1993
Adam, Z., Vorlíček, J. a spol.: Obecná onkologie, LFMU 2004

2916. ROZHOVORY LÉKAŘŮ A OŠETŘUJÍCÍHO PERSONÁLU S RODINOU

Kynkorová H. (KOC, Krajská nemocnice, Liberec)

Rozhovory s rodinou (jak se postarat o sebe i o ně) V přednášce se snažím popsat jednoduchou strukturu rozhovoru lékařů a ošetřujícího personálu s rodinou pacienta. Zaměřím se na jednoduchá doporučení, konkrétní kroky. Pokud to lze, komunikujte s rodinou spolu s pacientem (pokud pacient vysloví souhlas o jejich informování). Vyhněte se tak většině (ne všem) „informačních šumů“, nedorozumění a případnému zamlčování mezi členy rodiny a pacientem. Plánované rozhovory (seznámení s diagnózou, seznámení s průběhem léčby, s výsledky kontroly apod.) 1. postarejte se o své vlastní pohodlí (žízeň, hlad, wc) 2. mějte po ruce kapesníky, sklenici vody 3. představení, přiví-

tání (důležité z hlediska „usazení“, získání důvěry) Přivítejte podáním ruky (případným představením). 4. strukturování času a obsahu - sdělte, kolik zhruba na sebe máte času a co bude obsahem sdělení. 5. obsah a forma - Používejte co nejméně odborných výrazů (i ty pro Vás běžné většina pacientů nezná), mějte po ruce brožurky, nákresy, snímky apod. - Počítejte s tím, že mnoho věcí si pacient ani rodina nezapamatují (vliv emocí, stresu) - I vzhledem k tomu, že si mnoho věcí nezapamatují, hledají pak informace na internetu - dejte rodině i pacientovi tip na weby, kterým důvěřujete a informační brožury 6. práce s emocemi rodiny a pacienta: - Pláč (smutek, šok) - podejte pacientovi kapesníky, dejte najevo, že taková reakce k tomuto rozhovoru patří. Zeptejte se, zda můžete pokračovat (i když pokračovat musíte v každém případě). - Zlost - projeďte pochopení, ale obraťte pozornost k tady a teď (Chápu, že máte vztek, že se nemoc Vašeho tatínka nepoznala dříve, ale jsme tady a teď proto, abych Vás informoval, co lze dělat nyní, jaké jsou možnosti) - Strnulost (šok) - pacient nebo příbuzný nereaguje nebo reaguje zpomalně - popište, co vidíte (vidím z výrazu Vaší tváře a z Vašich reakcí, že Vás tento rozhovor asi zaskočil - jste schopni pokračovat?), pokud to lze, navrhněte další schůzku (může být i ten samý den odpoledne). 7. závěr hovoru - je dobré stručně shrnout, co jste řekli, dát prostor otázkám. Doporučte schůzku s psychologem, sociální pracovníci apod. - s kým je potřeba, ideální je mít po ruce konkrétní kontakty a ty rodině dát do ruky (až odezní emoce, mohou využít). 8. práce s vlastními emocemi (po skončení hovoru) - Uvědomit si, co „to se mnou udělalo“ - Vyvětrání, prodýchání, napítí (= zastavení se, ukončení, uzavření). - Při opakování nebo narůstání intenzity nepříjemných pocitů to řešit (např. na balintovské skupině) - prevence vyhoření Neplánované rozhovory - Pokusit se dodržet výše uvedené hlavní body - Když nemůžete zrovna mluvit, asertivně odmítněte a navrhněte hodinu, kdy má zavolat telefonovat nebo přijít (mám tu pacienta, zavolejte po 13 hodině). - Řadu živelných a neplánovaných hovorů lze omezit plánovanými rozhovory

2922. PSYCHOLOG V TÝMU

Lhotová P., Jirsová K., Garnolová P.
(*Nemocnice Na Pleši, Nová Ves pod Pleší*)

V péči o onkologicky (i jinak nemocné) pacienty se dlouhodobě hovoří o pozitivním vlivu tzv. celostního přístupu, tj. rozšíření medicínské péče o psychologické a sociální faktory. Prospěšnosti tohoto přístupu bylo již věnováno mnoho výzkumů, přednášek a odborných publikací. Většina z nich se zaměřuje na monitorování

potřeb pacienta a možností, jak tyto potřeby uspokojit. Jen málo statí se však zabývá tím, jak přístup realizovat v praxi. Na našem mateřském pracovišti, Nemocnici Na Pleši, se o to snažíme již několik let. K diskuzi v této oblasti bychom tak rádi přispěli představením našeho modelu spolupráce a ukázali, co se daří a zmínili i problémy, se kterými se potýkáme.

V naší nemocnici má onkologie dlouholetou tradici, jsou zde dvě oddělení, která čítají dohromady padesát lůžek, dalších 50 pacientů týdně projde onkologickou ambulancí. Spektrum diagnóz je velmi široké, péči u nás najdou všichni pacienti se solidními nádory. Naši lékaři pracují s pacienty ve všech klinických stádiích onemocnění, léčbu provádí chemoterapií, ozařováním, symptomaticky. K takto širokému spektru pacientů nelze přistupovat pouze podle jednoho vzorce, individuální je přístup je nezbytný.

Zdravotní tým tvoří lékaři, sestry, ošetřovatelé, fyzioterapeutka, sociální pracovníce, nutriční terapeutka a psychologka, do širšího týmu patří i duchovní a dobrovolníci. Tento široký tým pracuje podle vnitřních pravidel a zvyklostí, u jednotlivých pacientů má vždy hlavní slovo lékař, který indikuje další péči a u něž se schází všechny informace o pacientovi. V ojedinělých případech je psychologická konzultace iniciována pacientem, jeho rodinou nebo někým dalším z týmu. I v takové chvíli však konziliu předchází schůzka psychologa s lékařem, kde si předáme informace a přidáváme mezi cíle setkání i jeho potřeby. Jednotliví členové týmu se setkávají volně dle potřeby, všichni společně pak při týdenní velké vizitě, kde se tvoří cílený plán pro každého pacienta a výsledky práce se pravidelně hodnotí. Kromě toho má velká vizita funkci i psychohygienickou a supervizní, diskuze v týmu pomáhá lépe reflektovat vnitřní pohnutky a pocity, které mají členové týmu ve vztahu k pacientovi.

Práce psychologa na oddělení je pestrá, pracuje s pacienty, poskytuje podporu rodinám, diskutuje s lékaři. Nejpodstatnější část práce na oddělení tráví psycholog s pacienty. Povaha této práce se odvíjí od mnoha činitelů (aktuální kondice, psychický stav, ochota spolupracovat). K pacientovi by však psycholog měl jít vždy se zadáním, které je rozlišeno minimálně v typu práce - krizová intervence, psychoterapeutická práce, psychodiagnostika. Zadání se může v průběhu spolupráce s pacientem měnit, rozšiřovat nebo naopak zužovat, vždy s ohledem na aktuální potřeby pacienta, resp. ošetřujícího lékaře.

Role psychologa má být odlehčující. Lékař, ev. další zdravotní personál, na něj přeneše činnost týkající se psychické pohody pacienta a jeho rodiny. Už z podstaty není vztah pacienta k lékaři rovnocenný, pacient od

něj očekává odborné vedení léčby a čerpá z jeho „autoritativní“ pozice jistotu a klid. To samo často stačí pro zvládnutí léčby, další podporu potřebují jen někteří pacienti. A právě zde je role psychologa, jehož pozice je někde mezi zdravotníkem a laikem, odborníkem a blízkou osobou. Pohybuje se na oddělení, hovoří s pacienty i příbuznými, je blízko lékařům a sestřám, ale pomáhá „pouze“ slovem. Právě psycholog tak může být osobou, se kterou je pro mnohé pacienty snazší hovořit o svých pocitech a o nemoci. Někdy je to proto právě psycholog, komu pacienti svěří i více o svých obtížích. Kromě podpůrné role pro pacienta (o té někdy jindy) se tak může dozvědět, jak pacient své nemoci rozumí, co si pamatuje z rozhovorů s lékaři, jak chápe léčebný plán, jaká má ještě tělesná trápení atd., a může tak v roli prostředníka podpořit komunikaci mezi pacientem a lékařem. Je velmi zajímavé, že tento proces funguje, i když pacient ví o blízké spolupráci lékaře s psychologem.

Aby vše výše uvedené mohlo fungovat, je třeba – aby všichni v týmu vzájemně znali své role a odborné možnosti, respektovali práci ostatních a nepřekračovali vlastní kompetence. Vše zastřešuje podpora vedení, která práci týmu fakticky umožňuje. Třešinkou na dortu je pak vzájemná souhra a důvěra, která se tvoří postupně, se společnými úspěchy i neúspěchy.

I na našem oddělení máme mnohé starosti, jako tým nás nejvíce tíží pracovní vypětí. Říkáme si, jaké by to bylo, kdybychom měli více času – na pacienty, na svou práci, na rozhovory s kolegy, na vzdělávání. Můžeme však říct, že všichni přikládají ruku ke společnému dílu, k realizaci komplexního bio-psycho-sociálního přístupu a komplexní pomoci a podpoře těch, které potkala onkologická diagnóza. Ve svém důsledku se domníváme, že práce v týmu přispívá nejen ke kvalitnější a efektivnější péči o pacienty, ale také k větší spokojenosti těch, co péči poskytují.

KONFERENCE ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ 1

2868. Z HISTORIE HEMATOLOGICKÝCH LABORATOŘÍ HOK OLOMOUC

Indrák K., Jarošová M. (HOK, FN, Olomouc)

Abstrakt sdělení není k dispozici.

2986. HISTORIE VÝVOJE LABORATORNÍCH METOD V HEMATOLOGII V POSLEDNÍCH 30 LETECH

Slavík L., Juráňová J., Pikalová Z., Sýkorová M., Zadražilová V., Lapčíková A. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

V posledních 30 letech došlo k bouřlivému vývoji hematologie, kdy řada metod našla velké využití v diagnostice mnoha chorobných stavů ať už maligních či nemaligních. Jak oblast analýzy krevních buněk, tak oblast srážení krve procházela velmi bouřlivým vývojem z důvodu rozšiřování počtu a využití tohoto vyšetření. Laboratoř cytomorfologie už před 30 lety využívala prvních poloautomatických počítačů krvinek. V našich laboratořích, které se nacházely v suterénu 1. interní kliniky, byl prvním analyzátozem Coulter S. Ten přináší zásadní zefektivnění práce v hematologické laboratoři a zkrácení času vyšetření. Následovalo mnoho dalších hematologických analyzátořů, které postup-

ně přinášely další parametry včetně prvních modelů pro tří- a pěti-populační diferenciál leukocytů. V druhé polovině 80. let byla analýza leukocytů doplněna o fluorescenční mikroskopii jako předstupeň pro zavedení průtokové cytometrie, která je dnes nedílnou součástí diagnostiky hematologických malignit. Vývoj na poli koagulace byl neméně zajímavý. Rozvoj koagulačních metod přinesl až nástup automatizace, která odstranila v provedení vyšetření, který odstranil manuální detekci fibrinového vlákna (detekce háčkem ve vodní lázni). První poloautomatické přístroje Schnitzer und Gross přicházejí v roce 1970 a stejně jako na poli krevních obrazů přináší revoluci v dostupnosti vyšetření. Další rozvoj laboratoře přichází v 80. letech s rozvojem péče o hemofiliky, kdy byla zavedena vyšetření F VIII a F IX a zejména ruku v ruce s rozvojem diagnostiky trombofilních stavů v 90. letech minulého století. Prvním plně automatickým koagulometrem je ACL 100 s centrifugačním systémem detekce a kapacitou dosud neuvěřitelných 100 testů za hodinu. Přichází éra velkého rozvoje řady testů a nutnost statimové dostupnosti řady vyšetření, kdy na koagulační pole vstupují random access analyzátoři dosud dostupné pouze pro biochemii. U nás je to přístroj ACL Futura a Advance, což jsou předchůdci dnes využívaných přístrojů ACL Top, které přinášejí plnou automatizaci do koagulačních vyšetření včetně cap piercingu a preanalytických modulů.

2931. LABORATOŘE TRANSFUZNÍHO ODDĚLENÍ FAKULTNÍ NEMOCNICE OLOMOUC- HISTORICKÉ OHLÉDNUTÍ

Galuszková D. (Transfuzní oddělení, FN, Olomouc)

Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Olomouc má více než šedesátiletou tradici. Svoji činnost zahájilo v dubnu roku 1949. Imunohematologické laboratoře transfuzního oddělení tvoří základ pro rozvoj řady oborů, které se bez hemoterapie neobejdou. Patří k nim určité chirurgické obory, zejména traumatologie, kardiokirurgie, ale i interní obory jako hematologie, gastroenterologie. Samostatný obor transfuzního lékařství vznikl po objevení krevních skupin, jednoho z nejvýznamnějších objevů v historii medicíny. Samotné počátky imunohematologie jsou spojeny se jménem českého psychiatra Jana Jánského, který v roce 1907 publikoval práci, v níž představil systém čtyř krevních skupin I-IV. V současné době známe již přes 300 erytrocytárních antigenů, jejichž klinický význam je dán jejich protilátkami. Významné klinické protilátky jsou ty, které jsou schopné způsobit destrukci erytrocytů nesoucích daný antigen a tím zhoršit zdravotní stav pacienta. Naše laboratoře se věnují diagnostice erytrocytárních antigenů a jejich protilátek k přípravě bezpečné hemoterapie, ale i erytrocytární aloimunizaci v těhotenství. Při svém vzniku se prováděly serologické testy ve zkumavkách, vizuálně se hodnotila síla reakce, která vznikla mezi antigeny na červených krvinkách a protilátkami v séru. Novinkou byly mikrotitrační destičky, na které se ručně kapalo ... sérum pacienta. V roce 1998 se nainstaloval rozplňovací automat KEMBLE Guardian SP II, který umožnil automatické rozplnění diagnostických sér a krevních vzorků. Součástí byla

jednotka k odečítání krevních skupin na mikrotitračních plotnách. Od roku 2001 používáme k serologickým testům metodu sloupcové aglutinace. Plná automatizace diagnostických procesů byla zahájena v roce 2007, kdy oddělení získalo analyzátor WADiana Compact firmy Grifols. Analyzátor, využívající systém sloupcové aglutinace DG gel, samostatně rozkapával vzorky i diagnostika za použití čárových kódů, analyzoval, vyhodnocoval, dokumentoval a on-line přesouval výsledky do informačního systému transfuzního oddělení. Maximální kapacita byla 48 krevních vzorků a vyšetřovací cyklus trval při maximálním zatížení 1,5 hodiny. Spektrum vyšetření, které se provádělo na analyzátoru, obsahovalo vyšetření krevních skupin, screening protilátek, zkoušky kompatibility a identifikace protilátek. V dubnu 2008 byl pořízen na oddělení plně automatizovaný imunohematologický analyzátor Techno Twin Station. Analyzátor využívá současně ID-karty a tři mikrotitrační destičky. Zavedením analyzátorů do rutinního provozu laboratoří došlo k redukci manuální práce, odpadlo popisování zkumavek a karet a tím se významně omezila psaná dokumentace, minimalizoval se vliv lidského faktoru na proces vlastního zpracování; vyhodnocení a přenos dat probíhá on-line. Celý proces se významně standardizoval. Zároveň došlo ke zvýšení bezpečnosti personálu, jelikož se významně omezil kontakt zaměstnanců s potenciálně infekčním materiálem. Mezi významná omezení serologických vyšetřovacích metod patří výsledky u polytransfundovaných, silně pozitivních PAT pacientů a diagnostika zeslabených, variantních a vzácných antigenů. Novým trendem je genetická analýza erytrocytárních a destičkových antigenů, která je ale mnohem náročnější finančně i časově.

MYELOUDYSPLASTICKÝ SYNDROM/ MYELOPROLIFERATIVNÍ ONEMOCNĚNÍ

2951. LÉČBA PH NEGATIVNÍCH MYELOPROLIFERATIVNÍCH NEOPLÁZIÍ V ROCE 2016

Weinbergerová B., Bělohlávková P., Ráčil Z., Mayer J. (Interní hematologická a onkologická klinika, LF MU a FN, Brno; IV. Interní hematologická klinika, LF UK a FN, Hradec Králové)

Úvod: Ph negativní myeloproliferativní neoplázie je skupina onemocnění hematopoetické kmenové buňky charakterizovaná následnou aberantní proliferací gra-

nulocytární a/nebo erytrocytární a/nebo megakaryocytární linie a zvýšeným rizikem kardiovaskulárních komplikací, progresí do myelofibrózy nebo leukémie. Mezi nejčastější, tzv. klasické, Ph negativní myeloproliferativní neoplázie patří 3 klinické jednotky: pravá polycytémie, esenciální trombocytémie a primární myelofibróza. V roce 2011 vydala Evropská leukemická síť doporučení pro jejich diagnostiku a léčbu. Cílem léčby Ph negativních myeloproliferativních neoplázií je primárně snížení rizika trombotických komplikací bez navýšení rizika krvácení a hematologické progresie.

Sekundárním cílem je zmírnění ostatních průvodních příznaků (manifestace vazomotorických poruch, splenomegalie a jiných). Mezi obecná doporučení patří redukce nadváhy, abstinence kouření, tělesný pohyb, kontrola krevního tlaku, glykémie a metabolismu tuků. Léčba pravé polycytémie a esenciální trombocytémie: Věk > 60 let a trombotická událost v anamnéze tvoří kritéria rozdělující pacienty s pravou polycytémií a esenciální trombocytémií do nízko- a vysokorizikové skupiny pro rozvoj trombotických komplikací. Mezi další rizikové faktory někteří autoři řadí přítomnost mutace v Janusově kináze 2 (JAK2), kardiovaskulární rizikové faktory a jiné vrozené či získané trombofilní stavy (např. faktor V Leiden, mutace protrombinu 20210A a jiné). Základní doporučení pro léčbu nízkorizikových pacientů s pravou polycytémií jsou nízkodávkovaná acetylsalicylová kyselina (LD ASA) a venepunkce a pro vysokorizikové pacienty navíc cytoredukční léčba hydroxyureou a/nebo interferonem alfa v 1. linii. V poslední době je možno vysokorizikové pacienty s pravou polycytémií neodpovídající na léčbu hydroxyureou nebo netolerující tento přípravek léčit JAK2 inhibítorem, ruxolitibem, s vysokou efektivitou ve zmírnění konstitučních symptomů (event. splenomegalie). Pro léčbu nízkorizikových pacientů s esenciální trombocytémií je indikována LD ASA a pro vysokorizikové pacienty navíc cytoredukční léčba hydroxyureou v 1. linii. Pacienti s esenciální trombocytémií ve vysokém riziku neodpovídající na léčbu hydroxyureou nebo netolerující tento přípravek mohou být v 2. linii léčeni anagrelidem. V České Republice je možné použít anagrelid u vysokorizikových pacientů s esenciální trombocytémií již v 1. linii. Léčba myelofibrózy: Jedinou léčbu s kurativním potenciálem představuje u pacientů s myelofibrózou (primární myelofibrózou a myelofibrózou po pravé polycytémii nebo esenciální trombocytémii) v současnosti pouze alogenní transplantace krvetvorných buněk, nicméně vzhledem k vysokému riziku komplikací s ní spojených je nutná pečlivá selekce vhodných kandidátů. Obecně je alogenní transplantace krvetvorných buněk rezervována pro pacienty ve středním-2 a vysokém riziku podle tzv. prognostických skórovacích systémů založených na přítomnosti negativních rizikových faktorů. V poslední době se nabízí také možnost léčby JAK2 inhibítorem, ruxolitibem, s dobrým efektem na zmenšení splenomegalie a zmírnění konstitučních symptomů u pacientů s myelofibrózou. Ostatní léčebné modalit (hydroxyurea, busulfan, interferon alfa, erytropoézu stimulující léky, androgeny, imunomodulační léky, ozáření sleziny a splenektomie) jsou převážně paliativní, většinou pouze přechodně zmírňující symptomy onemocnění.

2907. ŽILNÍ TROMBOTICKÉ KOMPLIKACE PH NEGATIVNÍCH MYELOPROLIFERATIVNÍCH CHOROB

Palová M., Hluší A., Indrák K., Szotkowski T., Papajík T. (Hemato-onkologická klinika, Olomouc)

Úvod:

Do skupiny Ph negativních myeloproliferativních nemocí (Ph- MPN) patří pravá polycytémie (PV), esenciální trombocytémie (ET) a primární myelofibróza (PMF). Žilní trombózy jsou jedny z nejzávažnějších komplikací, které nepříznivě ovlivňují kvalitu i délku života těchto nemocných.

Epidemiologie:

Reálný výskyt významných trombotických komplikací je těžko stanovitelný díky heterogenitě metodiky a výběru pacientů jednotlivých studií. Popisovaná celková incidence trombotických příhod (arteriálních i venózních) je 5,5/100 pacientoroků u PV, 1-3/100 pacientoroků u ET a 2/100 pacientoroků u PMF. Ve třetině případů se jedná o trombózy venózní s incidencí 0,7% - 1,3% pacientoroků u PV a 0,5% - 1,2% pacientoroků u ET. Pro srovnání roční incidence žilního tromboembolismu (TEN) v obecné populaci se udává mezi 0,1% až 0,2%. Riziko rekurence trombózy u Ph- MPN po ukončení antikoagulační léčby je vysoké, pohybuje se mezi 33-42% a ve věku nad 60 let je riziko rekurence 1,7 krát vyšší než u mladších nemocných. Hlavním terapeutickým cílem u PV a ET je snížení rizika trombózy či krvácení. U PMF je tato problematika poněkud zastíněna rizikem leukemické transformace a komplikacemi vyplývajícími z cytopenie, nicméně frekvence trombotických komplikací je minimálně srovnatelná s ET.

Patogeneze:

Patogeneze trombóz u pacientů s Ph- MPN je komplexní a souvisí nejen s kvantitativními, ale také s kvalitativními změnami klonálních buněk. Jedním z hlavních faktorů v patogenezi trombózy je trvale zvýšená aktivace trombocytů, vyúsťující ve vyšší expresi P selektinů, tkáňového faktoru, vyšší generaci trombinu, zvýšeným uvolňováním trombocytárních a endoteliálních mikropartikulí – protrombogenních fragmentů buněčných membrán uvolněných po aktivaci buněk. Také zvýšené množství tzv. retikulárních (nezralých) trombocytů u ET v krvi je asociováno s vyšším rizikem trombózy. U PV zvyšují riziko trombózy hyperviskozita krve a kvalitativní změny membrány erytrocytů vedoucí k tvorbě jejich agregátů. V neposlední řadě se může na patogenezi podílet přítomnost přídatných vrozených a získaných trombofilních stavů (Leidenské mutace ge-

nu faktoru V (G1691A), mutace protrombinového genu G20210A, deficitu antitrombinu, proteinu C a proteinu S). Získaný trombofilní stav asociovaný s Ph-MPN je multifaktoriální etiologie. Vyplývá nejen z protrombogenního fenotypu cirkulujících buněk MPN klonu, ale také z imunitní odpovědi hostitele na přítomnost nádorového klonu se zvýšenou produkcí zánětlivých cytokinů s následnou aktivací leukocytů a endotelu.

Riziková stratifikace a léčba:

Riziková stratifikace nemocných s PV a ET se opírá o přítomnost nebo chybění rizikových faktorů pro trombózu. Jednoznačnými nezávislými rizikovými faktory jsou věk nad 60 let a pozitivní anamnéza trombózy, dále obecné kardiovaskulární rizikové faktory (kouření, diabetes, hypertenze), pozitivní mutační stav JAK2V617F. Význam leukocytózy je třeba validovat v prospektivních studiích. Samotná trombocytémie je jako rizikový faktor stále kontroverzní.

Naproti tomu extrémní trombocytóza (nad 1000 až 1500x10⁹/l) je spojována s vyšším rizikem krvácení, zejména při současné medikaci kyselinou acetylsalicylovou (ASA). Tento fenomén je vysvětlován získaným von Willebrandovým syndromem.

Hlavním léčebným cílem u PV a ET je minimalizace výskytu dlouhodobých s chorobou spojených komplikací, především trombotických, které jsou například nejčastější příčinou smrti u PV. V rámci primární prevence trombotických komplikací je u všech pacientů s PV indikována nízce dávkovaná ASA spolu s kontrolou hematokritu pomocí venepunkce nebo erytrocytaferézy s cílovou hodnotou hematokritu $\leq 45\%$ u mužů a $\leq 42\%$ u žen. Podkladem účinnosti venepunkce je navozený relativní či absolutní deficit železa - jeho suplementace v těchto případech je kontraproduktivní. U vysoce rizikových pacientů (starší 60-ti let, anamnéza trombózy) je indikována také cytoredukční léčba.

Trombotické komplikace u nízce rizikových pacientů s WHO definovanou ET jsou poměrně vzácné, srovnatelné s jejich výskytem v obecné populaci. Přínos ASA je u této skupiny nejasný, s výjimkou nemocných s přítomností kardiovaskulárních rizik, gravidity či přítomností vasomotorických symptomů (bolesti hlavy, vertigo, erytromelalgie, livedo reticularis, akrální parestezie atd.), v jejichž prevenci a léčbě je nízce dávkovaný aspirin efektivní. U vysoce rizikových pacientů s ET je indikována cytoredukce spolu s antiagregační léčbou. U všech nemocných s Ph-MPN je kladen důraz na redukci nadváhy, abstinenci kouření, kontrolu krevního tlaku, glykémie a metabolismu lipidů.

Optimální dávkovací režim ASA u ET není zcela přesně znám. Zatímco u zdravých jedinců nízce dávkovaný

aspirin jednou denně dostatečně inhibuje trombocytární cyklooxygenázu-1 (COX-1) a tím syntézu tromboxanu A₂ (TXA₂), tak stejný dávkovací režim není schopen plně inhibovat produkci TXA₂ u asi 80% pacientů s ET. Důvodem může být rychlejší obnova COX-1 díky zvýšenému obratu trombocytů u ET se vznikem mladých trombocytů s intaktní aktivitou COX-1 během 24hodinového dávkovacího intervalu. Tento předpoklad je podporován průkazem zlepšení odpovědi na ASA při dávkovacím intervalu dva krát denně, klinický benefit zatím ale nebyl ve studiích dostatečně testován. V případě zjištěné aspirinové rezistence je možno zvážit právě užití dávkovacího intervalu dva krát denně či změnu za alternativní antiagregans (např. clopidogrel).

Pacienti s Ph-MPN a prodělanou žilní trombózou jsou indikováni k dlouhodobé antikoagulační léčbě snižující riziko rekurence žilní trombózy. Optimální délka antikoagulační léčby není zatím jednoznačně stanovena a u některých nemocných bude nutno uvažovat i o doživotní antikoagulační léčbě. Na druhou stranu je potřeba brát v úvahu také zvýšené riziko krvácivých komplikací u nemocných s Ph-MPN, což mnohdy činí takové rozhodnutí v klinické praxi obtížným. V této souvislosti jsme realizovali retrospektivní analýzu 16 pacientů s diagnózou Ph-MPN (dle kritérií WHO 2008) sledovaných na naší klinice, u nichž byla objektivně verifikovaná žilní trombóza v letech 2004-2015. V devíti případech se jednalo o trombózu v atypické lokalizaci včetně splachnických žil (n=7). V době trombotické komplikace 11 nemocných splňovalo diagnostická kritéria pro PV, pět pro primární myelofibrózu. Medián věku pacientů v době příhody byl 57,5 let (26 - 72), medián počtu leukocytů 11,2x10⁹/l (6,9 - 30,9), medián počtu trombocytů 415x10⁹/l (142 - 1892), mutační stav JAK2V617F pozitivní (n=13), mutace v exonu 12 (n=1), CALR pozitivní (n=2). Přídavný trombofilní stav (kombinovaný vrozený trombofilní stav, přítomnost lupus antikoagulans) byl zjištěn u tří pacientů. Rekurence žilní trombózy po ukončení antikoagulační léčby byla prokázána u čtyř z šesti pacientů v mediánu 2 let. U nemocných s trvalou antikoagulační léčbou warfarinem byla zaznamenána recidiva ve dvou případech při neúčinném INR. Ve dvou případech vznikla žilní trombóza během účinné antikoagulační léčby, a to dabigatranem a LMWH. Výše popsaná skupina pacientů byla součástí recentní multicentrické studie s 206 pacienty s Ph-MPN a prodělanou žilní trombózou, jež ukázala, že riziko rekurence žilní trombózy po ukončení antikoagulační léčby v pěti letech bylo 42%, což je ve srovnání s non-MPN populací signifikantně vyšší. V 80% případů vznikla recidiva žilní trombózy ve stejné lokalizaci jako iniciální příhoda. Taktéž výskyt významných krváci-

vých komplikací během léčby antagonisty vitamínu K byl ve studiové kohortě pacientů mírně vyšší (2,4%) oproti non-MPN populaci.

Závěr:

V souladu s publikovanými daty je dlouhodobá anti-koagulace antagonisty vitamínu K efektivní ve snížení rizika rekurence trombotických komplikací. Avšak i přes dostupné léčebné možnosti zůstává riziko vzniku a rekurence trombózy relativně vysoké a je třeba dalších klinických studií s cílem zlepšení efektivity primární a sekundární prevence trombózy a přesnější identifikace rizikových nemocných. Vzhledem ke krvácivým komplikacím při medikaci warfarinem se otevírá možnost uplatnění, ale také potřeba ověření účinnosti a bezpečnosti nových antikoagulantů v této indikaci.

Podporováno grantem IGA-LF-2016-001.

2880. SYSTÉMOVÁ MASTOCYTÓZA, ZKUŠENOSTI JEDNOHO PRACOVIŠTĚ

Kozák T., Černá O., Gahérová L., Ticháková P., Vrbková K., Vernerová Z. (IHK, 3. LF UK a FN Královské Vinohrady, Praha; Ústav patologie, 3. LF UK a FN Královské Vinohrady, Praha)

Mastocyty bylo poprvé jako mezenchymální buňky popsány na konci 19. století Paulem Ehrlichem. WHO rozlišuje dle kliniky a laboratorních projevů 4 základní typy SM: indolentní SM, SM-AHNMD (s mastocytózou spojené hematologické klonální nemastocytární onemocnění), agresivní SM (ASM) a mastocytární leukémii (MaCL). Suspekce na diagnózu SM vzniká u pacientů s alergickými epizodami při trvale zvýšené hladině tryptázy a současnou UP a/nebo u pacientů s nejasnými kostními ložisky, UP a organomegalii nebo lymfadenopatií. Potvrzení diagnózy SM se opírá o histologický průkaz infiltrace tkáně atypickými mastocyty (nejčastěji kostní dřev - KD), podpořenou FACS a průkazem mutace c-kit D816V, event. cytogenetickým vyšetřením. Kromě parametrů krevního obrazu je k posouzení agresivity onemocnění vhodné provést RTG skeletu a zobrazovací vyšetření hrudníku a břicha (CT) k odhalení organomegalie. V našem souboru je 36 pacientů s touto vzácnou diagnózou, z toho 16 mužů, věkový medián v době stanovení diagnózy je 57 let (25 - 84). V osmi případech jde o agresivní formu SM, u 3 pacientů probíhalo současně jiné hematologické onemocnění (AML, ET, HL), u 25 pacientů se jedná o indolentní formu SM. Medián sledování je 49 měsíců (2 - 263), hladinu tryptázy měli v době diagnózy zvýšenou všichni pacienti, fúzní gen FIP1L1/PDGFR α byl vyšetřen u 20 pacientů, u žádného pacienta nebyl na-

lezen. Přítomnost mutace D816V v c-kit byla vyšetřena v KD u 23 pacientů, pozitivní byla u 19 pacientů (83%). U osmi pacientů byly vyšetřeny na mutaci D816V c-kit jak periferní krev, tak kostní dřev. Všichni tito pacienti měli pozitivitu zachycenou v KD, ale pouze 5 z nich ji mělo prokazatelnou v krvi (63%). Urticaria pigmentosa byla přítomna celkem u 22 pacientů (61%), v případě ASM byla UP přítomna u 3 pacientů z 8. Anafylaktické reakce spojené s vyplavením vasoaktivních mediátorů byly projevem nemoci u 16 pacientů (44%). Osteolytická ložiska nebo těžká osteoporóza s patol. frakturami byly přítomny u 4 pacientů (11%). Za dobu sledování zemřeli v souboru 2 pacienti: 1 na progresi agresivní formy onemocnění, jeden na relaps AHNMD (AML). Terapie interferonem alfa (IFN- α) byla zahájena v 1. linii u 13 pacientů, z toho u 3 pacientů byla indikována pro opakované těžké anafylaktické záchvaty. U dvou z těchto pacientů léčba IFN- α snížila frekvenci anafylaktických epizod a vedla k ústupu infiltrace kostní dřev. IFN- α dále vedl k navození parciální remise (PR) u 3 ze 7 pacientů s ASM, u žádného pacienta nevedl k ústupu UP. Pacienti se SM-AHNMD byli léčeni primárně pro jiné hematologické onemocnění. Léčba kladribinem byla indikována celkem u 3 pacientů s ASM v 1. linii, u jednoho z nich vedla k navození kompletní remise (CR). Ve 2. linii léčby byl kladribin použit u 9 pacientů, k navození CR došlo ve 2 a PR také ve 2 případech. Závěr: SM je svým klinickým průběhem pestré myeloproliferativní onemocnění, na něž je třeba pomýšlet zejména u pacientů s opakovanými anafylaktickými záchvaty a trvale zvýšenou hladinou tryptázy. Jak uvolnění vasoaktivních mediátorů, tak nádorový syndrom mohou být život ohrožující. U agresivních forem je indikována protinádorová terapie, u indolentních zejména protialergická profylaxe a interferon- α s kortikosteroidy. Slibné do budoucna mohou být molekuly v klinickém vývoji: masatinib nebo midostaurin.

2911. MDS 2016

Jonášová A. (I. interní klinika VFN a I. LF UK, Praha)

Myelodysplastický syndrom (MDS) představuje heterogenní skupinu klonálních chorob hemopoetické kmenové buňky charakterizovaných inefektivní hemopoézou, periferní cytopenií, morfológickou dysplazií a nebezpečím transformace do akutní myeloidní leukemie (AML). MDS, zvláště v raných fázích je vlastně premaligním (preleukemickým) onemocněním. **Incidence**, která se obecně pohybuje kolem 3,5-4/100 000 za rok, s věkem významně stoupá. U osob nad 60 let je pak 30/100 000, což činí MDS jednu z nejčastějších hematologických malignit v této věkové kategorii a bo-

hužel vede k významnému zkrácení přežívání u těchto nemocných. MDS se s malou převahou vyskytuje častěji u mužů. **Klasifikace.** S vývojem znalostí a kumulací dat o tomto onemocnění se rozvíjí i klasifikace od FAB (French, American, British) k WHO (World Health Organization) klasifikaci 1999 a 2008 a nově navržené 2015 dělíci onemocnění do více podskupin. Jednotlivé podskupiny se liší svojí klinikou, prognózou, celkovým přežíváním a četností transformací do AML.

Co se týče rizika progresu a přežívání, je onemocnění stratifikováno do několika skupin podle IPSS (International Prognostic Scoring System) a nověji IPSS-R (revised) (Obrázek č.1) (1,2,3). Skórovací systémy jsou stěžejní pro rozhodování o volbě terapie. V současné době používáme oba systémy. Revidovaný systém, ale lépe odhaduje přežívání hraničních nemocných a pomáhá zvláště k rozhodování kdy nemocného dle původního IPSS níže rizikového indikovat k transplantaci. V dnešní době se stále více obrací pozornost k výsledkům molekulární genetiky a nálezů mutací specifických genů, které mají, jak se zdá také nezanedbatelný prognostický význam (například: TP53, ASXL1, EZH2, TET2, SF3B1, RUNX1, CBL, NRAS) (Obrázek č.2) (4,5). Kruciólní stran prognózy je například mutace tumor supresorického genu TP53 (6). Ačkoli MDS je závažné onemocnění známé několik dekád jeho molekulární **patogeneze** a otázka proč dochází k vývoji do AML zůstávají neznámé. V patogenезi MDS nejspíše hrají roli genetické faktory, epigenetické a imunopatologické mechanismy (7,8,9). Globálně zmíněné poruchy vedou k dysplastické křetvorbě. Protože jsou v podstatě nádorového charakteru, dávají patologickému klonu růstovou výhodu, takže postupně patologická křetvorba nahradí normální polyklonální hemopoézu. U níže rizikových skupin (rané fáze choroby) je periferní cytopenie pravděpodobně následek akcelerované apoptózy dřevných prekursorů. Imunitní disregulace, metabolické změny, vliv prozánětlivých cytokinů, porucha mikroprostředí a také například abnormální biogeneze ribosomálních proteinů v této fázi hrají pravděpodobně též důležitou roli v narušení integrity hemopoézy a možnosti vzniku patologického klonu. K jeho plné malignizaci a vzniku leukemické populace buněk, ale nejspíše přispívají ještě další faktory. Nebyla prokázána žádná jednotlivá genetická léze, která by mohla vést k vzniku onemocnění. Mezi genetickými defekty, které jsou významné v patogenезi MDS, patří zvláště důležité nebalancované ztráty genetického materiálu (méně často reciproké translokace) (11). Klonální vývoj u MDS je charakterizován vývojem somatických mutací, které vznikají v kmenových buňkách a jejich dceřiných populacích. Sekvenování nové generace“

s vysokou citlivostí pod 0,1% v posledních pěti letech odhalilo sadu mutací které mohou hrát roli ve vzniku onemocnění (12,13). Většina mutovaných genů ovlivňuje nastavení genetického programu umožňující diferenciaci krevních buněk, dále jde o mutace genů, které mají význam jako tumor supresorické geny, geny signálních soustav, geny s rolí v epigenetických procesech, geny pro apoptotické a anti-apoptotické faktory, geny s rolí v reparaci DNA, geny pro ribosomální proteiny a další. Zajímavé právě u MDS je, že mnoho často mutovaných genů u MDS kóduje proteiny, které jsou důležité v epigenetických mechanismech, což naznačuje specifický vztah genetických a epigenetických změn. Poslední práce dokládají, že u MDS nalezneme minimálně jednu z mnoha známých onkogenních mutací u zhruba 70-90% nemocných. Role jednotlivých mutací v etiopatogenezi onemocnění není ještě zcela objasněn a je předmětem současného výzkumu. Studium mutací stojí v posledních letech ve středu zájmu výzkumu týkajícího se patogenезe MDS. Výskyt mutací u nemocných je velmi variabilní, většina nemocných sice má nějakou mutaci, ale výskyt specifické mutace v rámci celé MDS skupiny nepřesahuje 20% (obrázek č.3). Výjimečné jsou jenom mutace sestřihového mechanismu (spliceosom). Ty se vztahují k jednomu podtypu MDS RARS a RARS-T (tedy refrakterní anemie s věnečkovitými sideroblasty ev. s trombocytémií) u těchto podskupin se vyskytuje minimálně jedna mutace spliceosomu téměř ve 100% nemocných a tak se de facto stávají diagnostické pro tyto podskupiny.

Ve středu pozornosti stran patogenезe onemocnění v současné době stojí samostatná podskupina MDS, což jsou nemocní s 5q- aberací (delece dlouhého raménka 5. chromosomu). V roce 2008 B. Ebert dokázal, že haploinsuficience genu kódujícího ribosomální protein RPS14, ležícího v CDR (common deleted region) způsobuje specifický blok maturace červené řady (14). Následovali další práce identifikující další haploinsuficentní geny z deletovaného úseku a jejich vztah k patogenезi onemocnění (15).

Terapie. I přes stálý intenzivní výzkum je MDS jednou z nejobtížněji řešitelných hematologických malignit. Prognóza asi poloviny nemocných s primárním a většiny nemocných se sekundárním MDS je relativně špatná.

V posledních letech se objevily nové terapeutické možnosti v podobě imunomodulační terapie a epigenetické-demetylační terapie. Obě tyto nové skupiny léků znamenaly pro MDS doslova revoluci a to nejen stran šancí pro nemocné, ale i zájmem o tuto chorobu. Hrály proto i roli v intenzivnějším výzkumu patogenезe onemocnění. Právě u první skupiny imunomodulační

terapie reprezentované u MDS lenalidomidem byly zcela recentně udělány podstatné kroky v poodhalení vysoké selektivní efektivity tohoto preparátu u nemocných s MDS s 5q- aberací (16,17). V první řadě byl identifikován centrální intracelulární cíl imunomodulačních látek- cereblon (CRBN). Nermalou měrou k tomu přispěla právě u MDS i naše práce (18). CRBN je součástí ubiquitin E3 ligázy. Po vazbě na lenalidomid jsou do tohoto komplexu rekrutovány specifické proteiny, které podléhají ubiquitinaci a jsou následně degradovány v proteasomu. Naše práce popisuje statisticky významně vyšší expresi CRBN u nemocných právě s 5q- oproti MDS bez 5q- aberace a zdravým kontrolám, což by mohlo podpořit vysvětlení proč právě nemocní s 5q- jsou tak citliví na terapii lenalidomidem. Nepublikovaná data analýzy nemocných z I. Interní kliniky VFN léčených lenalidomidem ukazují též, že nemocní, kteří jsou dobrými respondenty mají vysokou hladinu mRNA CRBN ve srovnání s nemocnými, kteří neodpovídají na lenalidomid. V loňském roce byla v časopise Nature publikována velice elegantní práce identifikující kasein kinázu 1a1 (CK1α), jejíž gen je na CDR a která je tudíž haploinsuficientní, jakožto cílový protein rekrutovaný do E3 ligázového komplexu právě po navázání lenalidomidu na CRBN. CK1α v haploinsuficientní formě vede k růstové výhodě a proliferaci takto postižené buňky/klonu tedy v tomto případě klonu s 5q- (19). Avšak při její degradaci (v proteasomu) a dalším podstatném snížení hladiny, buňka takto postižená propadá apoptóze. Tak je vysvětlen efekt lenalidomidu specificky u 5q-. Kdy jistě dochází k potlačení růstu patologického klonu s 5q- aberací. Mezi zásadnější novinky v terapii nízké rizikových nemocných patří dva příbuzné preparáty pro anemické nemocné ovlivňující pozdní fáze erythropoézy s účinností cca 50 a více procent podle tíže transfusní dependence a to Sotatercept a Luspatercept. Oba léky jsou ale stále ještě ve fázi klinického zkoušení. Stále diskutabilní u MDS je použití trombopoetinových agonistů Romiplostimu a Eltrombopagu pro jejich možnou potenciaci progresu onemocnění. Klinické studie s oběma preparáty byly z tohoto důvodu předčasně ukončeny. Co se týče terapie vysoce rizikových nemocných není zatím překonán azacitidin (20, 21). Jasnou předností azacitidinu je prodloužení OS (overall survival) v porovnání se standartní terapií nicméně s narůstajícími zkušenostmi s tímto preparátem je zřejmé, že stěžejní problém je dosažení skutečně dlouhotrvající remise onemocnění. Je třeba se orientovat na potenciaci efektů léčby vhodnými kombinacemi a hledání dalších terapeutických možností po selhání azacitidinu. Transplantace tak jednoznačně hraje stá-

le nejdůležitější roli v dosažení dlouhodobě trvajících remisí (22). Azacitidin se v souvislosti s transplantací používá čím dále tím více jako přemostující terapie. V současné době je v klinickém zkoušení asi 50 nových preparátů. Nezbývá než doufat, že aspoň některé z nich přinesou prospěch pro MDS nemocné.

Práce vznikla za podpory výzkumného záměru I. LF UK Prvok 27 a Výzkumného úkolu MZ ČR UHKT No 00023736.

LITERATURA

1. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997; 89: 2079–2088 (erratum, *Blood* 1998, 91: 1100).
2. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012 Sep 20, 120(12): 2454–2465.
3. Schanz J, Tüchler H, Solé F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10, 30(8): 820–829.
4. Bejar R, Stevenson KE, Caughey BA, et al. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2012; 30(27): 3376–3382.
5. Bejar et al. Somatic mutations in MDS patients are associated with clinical features and predict prognosis independent of the IPSS-R, analysis of combined datasets from the international working group for prognosis in MDS-molecular committee. *Blood* 2015, 126 (23) p 907.
6. Kulasekararaj AG, Smith AE, Mufti GJ, et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. *Br J Haematol*. 2013, 160: 660–672.
7. Cazola M, DellaPorta MG, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia its clinical relevance. *Blood*. 2013 Dec 12, 122(25): 4021–4034.
8. Itzykson R, Fenaux P. Epigenetics of myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014 Mar, 28(3): 497–506.
9. Figueroa ME, Skrabanek L, Li Y, et al. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood*. 2009, 114(16): 3448–3458.
10. Mollndrem JJ, Jiang YZ, Barrett AJ, et al. Haematological response of patients with myelodysplastic syndrome to antithymocyte globulin is associated with a loss of lymphocyte-mediated inhibition of CFU-GM and alterations in T-cell receptor Vbeta profiles. *Br J Haematol*. 1998 Sep, 102(5): 1314–1322.
11. Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007, 110: 4385–4395.
12. Haferlach T, Nagata Y, Grsmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014 Feb, 28(2): 241–247.
13. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biologi-

- cal implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013 Sep 12, (122): 3616-3627.
14. Ebert BL, Pretz J, Golub TR, et al. Identification of RPS14 as a 5q-syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008 Jan 17, 451(7176): 335-339.
 15. Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Karsan A, et al. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q-syndrome phenotype. *Nat Med*. 2010 Jan, 16(1): 49-58.
 16. List A, Dewald G, Bennett J, Giagounidis A, Raza A, et al. Myelodysplastic Syndrome-003 Study Investigators. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med*. 2006 Oct 5, 355(14): 1456-1465.
 17. Jonášová et al. Lenalidomid v terapii MDS nemocných s 5q- aberací, zkušenosti české MDS skupiny. *Vnitr Lek*. 2015 Dec;61(12):1028-33. Czech.
 18. Jonášová A, Fuchs O et al. High level of full-length cereblon mRNA in low risk myelodysplastic syndrome with isolated 5q deletion is implicated in the efficacy of lenalidomide. *European J Haematol*. 2015 Jul;95(1):27-34.
 19. Krönke et al. Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1 α in del(5q) MDS. *Nature* 2015 Jul 9;523(7559):183-8
 20. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. 2009, 10(3): 223-232.
 21. Jonášová A, Čermák J, Červínek L, et al. První zkušenosti České MDS skupiny s terapií 5-azacytidinem u nemocných s myelodysplastickým syndromem s vyšším rizikem (IPSS střední 2 a vysoké riziko), akutní myeloidní leukemií do 30 % myeloblastů a chronickou myelomonocytární leukemií II. Jonášová A. a kolektiv, *Tranfuse hematologie dnes*, 2013, 19: 125-133.
 22. Zeidan E, Gore SD et al. Should elderly patients with higher-risk myelodysplastic syndromes undergo allogeneic hematopoietic stem cell transplantation? *Expert Rev Hematol*. 2013 Oct;6(5): 539-42

3005. SOMATIC MUTATIONS IN HIGH-RISK MDS PATIENTS TREATED WITH AZACITIDINE AND LENALIDOMIDE

Polgárová K., Kulvait V., Vargová K., Minařík L., Jonášová A., Stopka T. (1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, 1st Clinic - Haematology, General Faculty Hospital, Prague; 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague)

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a clonal stem cell disorder with dysplastic and ineffective haematopoiesis with variable risk of progression to acute myeloid leukaemia (AML). MDS stem cells produce clonal progeny marked with somatic variants in previously characterized MDS/AML associated genes in 70% of patients that undergo additional mutation events during course of the disease such as mutation of TP53. Accumulation of somatic mutations leads to progression in myeloblast accumulation as well as lineage differentiation suppression. To stratify the prognosis of patients several scoring systems have been developed with IPSS-R being currently mostly used. Although the detection of somatic mutations in oncogenic drivers has been proposed to be included into the patient prognostic stratification, only limited guidelines for detecting and scoring these somatic variants were recommended. Using Illumina Myeloid TruSight panel we analysed amplicons of 54 MDS/AML-linked genes in 65 MDS patients, 5 MDS/AML cell lines and controls including cord bloods and normal individuals. The MDS patients were either high risk (N=39) treated with Azacitidine or low risk (N=16) mostly treated with Lenalidomide (N=13). Most of the patients were sequenced before and during therapy. In order to increase proportion of tumour cells we separated out the CD3+ T-cell fractions using magnetic sorting and sequenced these two fractions in parallel. In addition, we analysed effect of repeating the sequencing step as well as duplicate library-preparation step. While duplicating the sequencing step provided only decent changes in variant allele frequency (VAF) within one library without having to much of impact on number and type of somatic variants, the duplicate library experiment for 8 patient samples led to striking differences on number and type of variants suggesting presence of PCR artefacts during library preparation. Indeed validations using Sanger sequencing provided important information of how reliable were the individual sequencing runs and how effective was to use duplicate library experiment and focus on those variants that overlap between the two libraries per one patient. Our results suggest caution is needed when assuming somatic mutations for prognostic purpose to prevent (pre)analytical sources of bias especially using single library-sequencing experiment.

TRANSPLANTACE

2896. HISTOPATOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA AKUTNÍ NEMOCI ŠTĚPU PROTI HOSTITELI

Voska L., Marková M. (IKEM, Praha; ÚHKT, Praha)

Problémem alogenních transplantací krvetvorných buněk, jež zásadním způsobem ovlivňuje jejich výsledky a mortalitu, je nemoc štěpu proti hostiteli (GvHD). Diagnostika její akutní formy, zejména v časném po-transplantačním období, může být složitá, vzhledem k dalším možným komplikacím (infekce, polékové změny atd.), které se klinicky mohou manifestovat podobně nebo s akutní GvHD probíhají současně. Zásadní místo zde má biopsie postiženého orgánu nebo tkáně s histologickým vyšetřením. Akutní GvHD je multisystémový klinicko-patologický syndrom, který se klinicky projevuje nejčastěji v kůži, v horním i dolním gastrointestinálním traktu (GIT) a v játrech. Klinické příznaky jako kožní vyrážka, průjmy, zvracení nebo cholestatická jaterní porucha, mají zpravidla své histomorfologické koreláty, které lze v biopsiích adekvátně odebrané tkáni obvykle dobře rozpoznat, a to buď přímo z histologie, nebo za použití pomocných metodik, jakou je například imunohistochemie. Neméně důležitá je přitom klinicko-patologická korelace histologických nálezů, neboť reakce tkáně na různé etiologické podněty mohou mít v řadě případů velmi podobnou morfologii. Účelem tohoto sdělení je souhrnný přehled aktuálně používaných klasifikací pro histopatologickou diagnostiku akutní GvHD kůže, GIT a jater, včetně diferenciací diagnostické rozvahy z pohledu patologa, doplněné ilustrativními ukázkami histologických nálezů u konkrétních pacientů z více jak patnáctileté spolupráce s ÚHKT Praha.

2854. INFÚZE DÁRCOVSKÝCH T LYMFOCYTŮ JAKO ČASNÁ INTERVENCE PO ALOGENNÍ TRANSPLANTACI KRVETVORNÝCH BUNĚK U 20 PACIENTŮ S RŮZNÝMI HEMATOLOGICKÝMI MALIGNITAMI: ZKUŠENOST JEDNOHO CENTRA

Krejčí M., Ráčil Z., Semerád L., Weinbergerová B., Robešová B., Procházková J., Kšeňáková K., Mayer J. (Interní hematologická a onkologická klinika, LF MU a FN, Brno)

Úvod: Infúze dárcovských T lymfocytů (donor lymphocyte infusions, DLI) jsou aplikovány u některých

pacientů s hematologickými malignitami po provedení alogenní transplantace krvetvorných buněk (HCT). Hlavní terapeutické indikace DLI jsou především korekce nestabilního smíšeného chimerismu (SC), dále se DLI používají jako součást léčby relapsu po HCT. DLI jsou aplikovány rovněž preemptivně s cílem minimalizovat návrat nemoci. Optimální terapeutická strategie ohledně dávky a časování DLI prozatím nebyla stanovena, tato topika zůstává velmi heterogenní. Zde prezentujeme naše zkušenosti s časnou aplikací DLI u 20 pacientů (pac.) s různými hematologickými malignitami po provedení HCT. Pacienti a metody: Bylo analyzováno 9 pac. s lymfoidními malignitami a 11 pac. s myeloidními malignitami. Indikace pro podání DLI byly následující: nestabilní smíšený chimerismus (12 pac., 60%), molekulární relaps nemoci po HCT (6 pac., 30%) a přetrvávající pozitivita minimální zbytkové nemoci (MRN) po HCT (2 pac., 10%). Medián doby od provedení HCT do podání DLI byl 6 měsíců. Všichni pacienti byli v době podání první dávky DLI v hematologické remisi základního onemocnění, neměli známky reakce štěpu proti hostiteli (GvHD) a nebyli léčeni imunosupresivní terapií. Pacienti dostali DLI v eskalovaných dávkách v intervalu 6-8 týdnů. Patnáct pac. obdrželo jednu dávku DLI, tři pac. dvě dávky DLI a dva pac. tři dávky DLI. První dávka DLI byla 5x10E6/kg CD3+ buněk, druhá 1x10E7/kg CD3+ buněk a třetí 5x10E7/kg CD3+ buněk. Výsledky: Léčebná odpověď po podání DLI byla dosažena u 16 z 20 pac. (80%). Kompletní dárcovský chimerismus byl dosažen u 11 z 12 pac. (92%), molekulární remise byla dosažena u 3 z 6 pac. (50%) a MRN negativita metodou PCR byla dosažena u 2 z 2 pac. (100%). Incidence akutní GvHD byla hodnocena u 20 pac., 65% (13/20) mělo GvHD (stupeň I+II u 9 pac., stupeň III+IV u 4 pac.) Žádná další signifikantní toxicita nebyla pozorována. S mediánem sledování 24 měsíců od první dávky DLI (rozpětí 5-41 měsíců) žije 70% pac. (14/20), všech 14 je v remisi hematologické malignity, 6 pac. zemřelo (4x progresse, 1x plicní embolie, 1x infekce). Závěr: Podání DLI jako časné intervence po alogenní HCT se jeví jako nadějný přístup především v navození kompletního chimerismu, celková odpověď je 92%. V některých případech může být aplikace DLI efektivní terapie molekulárního relapsu nebo přetrvávající positivity zbytkové nemoci po HCT. Časně podání DLI může zabránit relapsu hematologické malignity po alogenní HCT.

2853. REDUCED-INTENSITY TRANSPLANTATION (RIT) IN PATIENTS WITH HIGH-RISK OR ADVANCED CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (CLL) IN PERIOD 2011-2015: DECREASE TRANSPLANT-RELATED MORTALITY (TRM) IMPROVES TREATMENT RESULTS - SINGLE CENTRE EXPERIENCE

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

Background: RIT can improve treatment results in patients (pts) with high-risk or advanced CLL but with risk of transplant-related morbidity and mortality especially in older pts. New therapeutic agents and cellular therapies for CLL are investigated and inhibitors of BCR signalling show promising results in the treatment of high-risk CLL. On the other hand over time transplantation results have also improved but published recent transplant results missing. To evaluate current transplant results in CLL we retrospectively analysed results of RIT for high-risk or advanced CLL in our centre during last 5 years Patients and methods: from 1/2011 to 12/2015 20 consecutive pts with median of age 61 years (range: 36-65 years) with high-risk or advanced CLL (15% 17p-/p53 mutation, 50% 11q-, 70% unmutated IgVH, 55% chemoresistant CLL, 50% relapse within 24 months, 55% more than 2 treatment lines) underwent RIT (25% related, 75% unrelated). HCT-CI was lower than 2 in 16 (80%) pts. Source of stem cells was peripheral blood and the conditioning regimen consisted of fludarabine and melphalan (in 35% with ATG). Cyclosporine A and methotrexate were used as GVHD prophylaxis. Results: all patients engrafted. 14 pts (70%) developed acute GVHD (10% grade III-IV) and among 18 evaluable pts 10 (56%) of them developed chronic GVHD (17% extensive). With median follow-up 29 months (range 9-55 months) 13pts (65%) are alive and 12 (55%) in CR. 4 pts (20%) relapsed or progressed with median time to progression 20 months (range 3-25 months) and 3 (15%) of them died with median time after progression 9 months (range 2-17 months). 4 pts (20%) died due to NRM (3 cases of infections, 1 case heart failure). NRM till day +100 after RIT was 10%. The estimated probabilities of 3-years PFS and OS are 57% and 69%. The estimated probabilities of 3-years PFS and OS for patients younger and older than 60 years were without statistical significance. Conclusion: in spite of relatively small number of evaluated pts and retrospective type of analysis our data show that in last 5 years TRM in CLL transplanted pts decreased (20%) in comparison with our previous

results (2006-2010 with TRM 44%). Our data also show that RIT even in case of using unrelated donor and in pts over 60 years of age achieves in about two thirds of them long lasting disease control of high-risk or advanced CLL with probability of 3-years PFS and OS 57% and 69%. These results are “comparable” with published results of new therapeutic agents in treatment of high-risk CLL. However, due to lack of information about the long-term effectiveness of new drugs, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation should still remain a treatment option for patients with high-risk CLL and low-risk of transplant procedure.

2855. TRENDY V TRANSPLANTÁCIÍ KRVOTVORNÝCH BUNIEK NA SLOVENSKU

Mistrík M., Bojtárová E., Guman T., Horáková J., Hudeček J., Masáková L., Šimančíková I., Sopko L., Vranovský A., Štecová N., Wild A., Bátorová A. (KHaT LF UK, SZU a UN, Bratislava – SK, KHaOH UN LP, Košice – SK; II. DK DFNSP, Bratislava – SK; KHaT MUN a JLF UK, Martin – SK, NOŮ, Bratislava – SK; HO NsP F.D.R., Banská Bystrica – SK)

Úvod: Informácie o transplantáciách krvotvorných kmeňových buniek na Slovensku sme si začali vymieňať a zbierať s etablovaním transplantáčného programu od roku 1989. V ďalších rokoch rozšírilo s cieľom získať validné informácie o vývoji a trendoch v oblasti klinickej transplantácie krvotvorných kmeňových buniek. Všetky transplantáčne centrá v SR sa zapojili a novo zriadené centrá sa pripojili ku každoročnému referovaniu transplantáčnej aktivity -počtu transplantovaných chorých podľa indikácie, zdroja krvotvorných buniek a typu darcu. Metódy: V rokoch 1989 - 1997 sa evidoval ročný počet transplantovaných pacientov podľa typu transplantácie. Od roku 1998 sa používajú na zbieranie informácií o transplantáčnej aktivite na jednotlivých pracoviskách v SR údaje z aktuálnej verzie štandardného formuláru Európskej skupiny pre transplantáciu krvotvorných buniek (EBMT). Výsledky: V rokoch 1989 - 2015 sa v SR uskutočnilo 3 297 transplantácií krvotvorných kmeňových buniek (autológne 2424, alogénne 873), z toho v rokoch 1998 - 2015 spolu 2986 transplantácií: krvotvorné bunky periférnej krvi sa použili 2 801 krát (autológne 2176 a alogénne 625 krát), dreňová krv 175 krát (18; 157), 5 pacientov dostalo naraz autológne krvotvorné bunky z periférnej krvi a z kostnej drene, 5 alogénnu pupočníkovú krv. Spomedzi 2896 chorých lymfóm malo 1004 (autoTx 921; aloTx 83), mnohopočetný myelóm 856 (850; 6), akútnu leukémiu 694 (186; 508), solídny nádor 230 (214; 16), chronickú myelocytovú leukémiu 97 (23; 74), aplastickú anémiu 58 (0; 58)

a vzácné indikácie pre TKB 47 pacientov (5; 42). V roku 2015 ročný počet chorých s TKB od nepríbuzného darcu (42; u dospelých 31 a u detí 11) prekročil počet TKB od súrodenca (31; u dospelých 25 a u detí 6), a urobilo sa viac autotransplantácií pre mnohopočetný myelóm (67) ako pre lymfoproliferatívne choroby (54). Od r. 1996 do marca 2015 sa na KHaT v Bratislave 177 chorých podrobilo jednej TKB pre mnohopočetný myelóm a 55,8% má pravdepodobnosť 5 ročného celkového prežívania a medián celkového prežívania 74,4 mesiacov. Mortalita do 100 dní bola 1,6% (3 zo 177), pričom v podskupine 97 chorých mladších ako 60 rokov bola mortalita do 100 dní nulová. Záver: Dlhodobé sledovanie poskytuje informácie o vývoji a stave transplantáčného programu krvotvorných buniek v SR. Hlavné zmeny sú v type darcov, kde v rámci alogénnej TKB prevažujú nepríbuzní darcovia, a v indikáciách TKB, kde pri autológnej TKB sa stal najčastejšou diagnózou mnohopočetný myelóm.

2852. OUTCOME OF ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN NORMAL KARYOTYPE AML WITH NPM1 MUTATION IN COMPLETE REMISSION IS NOT AFFECTED BY FLT3/ITD POSITIVITY - POTENTIALLY CRUCIAL IMPORTANCE OF PRE-TRANSPLANT LEVEL OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE

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

Background: detection of FLT3/ITD in normal karyotype (NK) AML even in case of NPM1 mutation affects negatively prognosis of AML patients (pts) treated with intensive chemotherapy alone. But impact of FLT3/ITD positivity in the setting of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT) in pts with NK AML with NPM1 mutation in complete remission (CR) is less clear. With the aim to evaluate the potential role of FLT3/ITD positivity in NK AML with NPM1 mutation on the outcome of alloSCT we compared alloHSCT results in pts with NK AML with NPM1 mutation in CR with alloHSCT results of pts with NK

AML in CR with NPM1 mutation and concurrent FLT3/ITD positivity transplanted in our centre from 2005. We also tried to identify the impact of other known pre-transplant prognostic factors on alloHSCT outcome in this cohort of pts. Patients and methods: from 2/2005 to 9/2014 60 consecutive pts with median of age 54 years (range, 30-66 years) with normal normal karyotype 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. 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 and MRD level before alloHSCT - determined using quantitative real-time polymerase chain reaction for detection of NPM1 mutations) were included in the univariate and multivariate statistical analysis. Results: all pts fully 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 univariate and multivariate analysis. FLT3/ITD positivity did not influence alloSCT results. 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) 48%, 35% and 40%. Conclusion: our data show that FLT3/ITD positivity did not influence alloSCT results in pts with NK AML with NPM1 mutation in CR and also show that level of MRD in pts with normal karyotype AML harboring NPM1 mutation in CR provides important prognostic information, which as an independent prognostic factor predicts transplant results.

MALIGNÍ LYMFOMY/ CHRONICKÁ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE

2940. NON-HODGKINOVY LYMFOMY V ČESKÉ REPUBLICCE - TRENDY V EPIDEMIOLOGII A LÉČBĚ

Trněný M., Campr V., Janíková A., Belada D., Procházka V., Móciková H., Pirnos J., Kubáčková K., Ďuraš J., Barsová L., Pukyová J., Brejcha M., Vokurka S., Adamová D., Bár R., Starostka D., Chodacká M., Kessler P., Pytlík R., Dušek L., Benešová K., Sýkorová A., Dlouhá J., Blahovcová P., Boudová L. (I. interní klinika VFN, Praha; FN Motol, Praha; FN, Brno; FN, Hradec Králové; FN, Olomouc; FN Královské Vinohrady, Praha; Nemocnice, České Budějovice; FN, Ostrava; KN, Liberec; MN, Ústí nad Labem; KOC, Nový Jičín; FN, Plzeň; SN, Opava; Nemocnice, Tábor; NsP, Havířov; Nemocnice, Chomutov; Nemocnice, Pelhřimov; VFN, Praha; Národní onkologický registr, Praha; Datacentrum KLS, Praha)

Non-Hodgkinovy lymfomy (NHL) jsou nejčastější krevní malignitou s incidencí kolem 15 na 100.000 obyvatel, spolu s dalšími lymfoproliferacemi, jako je CLL a HL řazenými dle WHO do skupiny lymfomů, incidence dosahuje 23 na 100.000 obyvatel. Kooperativní lymfomová skupina (CLSG – Czech Lymphoma Study Group) začala od roku 1999 prospektivně budovat databázi nově diagnostikovaných pacientů (pac.) s NHL (Lymphoma Project CLSG – LP-CLSG). V předkládaném sdělení analyzujeme incidenci a výsledky léčby u NHL za 15 let. Metodika: Pro popis vývoje incidence a mortality na základě populačních dat byla použita data z Národního onkologického registru (NOR) a ÚZIS. LP-CLSG umožnil zadávání dat z doby diagnózy, relapsů a sledování. Do analýzy byli zařazeni pouze nemocní s hist. čtením z referenčního centra - RC (7 center). LP-CLSG pokrývá zhruba dvě třetiny všech nově diagnostikovaných NHL, více než 17 center zařadilo 50 a více nemocných. Výsledky: Incidence a mortalita resp. se vyvíjela následovně. V roce 1981 byla 6,1 a 3,6 resp., v roce 2001 10,8 a 6,0 resp. a v roce 2011 13,5 a 5,3 (pokles) resp., vždy na 100 000 obyvatel. Do LP-CLSG bylo celkem zařazeno 11 828 nemocných diagnostikovaných v letech 1999–2014, u 10 333 byla diagnóza stanovena v RC s potvrzením diagnózy B- nebo T-NHL. Difuzní velkobuněčný lymfom (DLBCL) byl nejčastějším pod-

typem s 4187 pac. (40,5 %), následovaný folikulárním lymfomem (FL) s 1969 (19,5 %) pac., lymfomem z marginální zóny (MZL) s 885 (8,6 %) pac., lymfomem z pláštových buněk (MCL) s 857 (8,3 %) pacienty, lymfomem z malých lymfocytů (SLL) s 393 (3,8 %). Dalších 1252 (12,5 %) pac. mělo jiný typ B-NHL nebo nebyli blíže klasifikováni. Skupinu nemocných s T-NHL tvořilo 283 (2,7 %) pac. s PTCL NOS, 198 (1,9 %) pac. s ALCL a 309 (3,0 %) pac. mělo jiný typ T-NHL. Věkový medián celého souboru byl 62 let (17–97) a bylo stejné zastoupení mužů (51,2 %) a žen (48,8 %). Celkem 9 718 nemocných mělo dostatečná data léčby a sledování. Medián celkového přežití (OS) B-NHL byl 13,0 let, medián přežití T-NHL 3,4 roku. Medián OS B-NHL léčených chemoterapií byl 8,7 roku, použití rituximabu (R) a chemoterapie vedlo ke 36% snížení rizika úmrtí – medián OS nebyl dosažen (HR 0,64, $p < 0,0001$). Významný podíl na tom mělo zlepšení u pacientů s DLBCL s mediánem OS 5,9 roku po chemoterapii ve srovnání s nedosažením mediánu OS při imunochemoterapii, se snížením rizika úmrtí o 44 % (HR 0,56, $p < 0,0001$). Přidání R k chemoterapii vedlo k signifikantnímu snížení rizika úmrtí u FL o 24 % (HR 0,76, $p = 0,012$), u SLL o 40 % (HR 0,60, $p < 0,01$) a MCL o 33 % (HR 0,67, $p < 0,001$). Při hodnocení dopadu přidání R do léčby MZL nebylo zlepšení signifikantní. Při hodnocení celkového dopadu přidání R do léčby na celou populaci NHL bylo pozorováno signifikantní zlepšení přežití nemocných diagnostikovaných v letech 2009–2014 ve srovnání s lety 1999–2001. Riziko úmrtí bylo sníženo o 14 % (HR 0,86, $p < 0,001$). To bylo způsobeno zejména snížením rizika úmrtí u B-NHL o 13 % (HR 0,87, $p < 0,005$). U T-NHL byl pozorován trend s HR 0,82, který však nebyl signifikantní ($p = 0,2$). Závěry: 1. V průběhu posledních 30 let došlo ke zvýšení incidence NHL v ČR o 100 %, mortalita však od roku 2001 začala klesat. 2. Analýza LP-CLSG v letech 1999–2014 ukázala signifikantní zlepšení osudu nemocných zařazením cílené terapie (rituximab) do léčby. Jednalo se zejména o DLBCL s HR 0,56, FL s HR 0,76, MCL s HR 0,67 a SLL s HR 0,60. To se projevilo zlepšením OS v celé populaci NHL. Nelze však vyloučit i jiné faktory, neboť i u T-NHL bylo pozorováno zlepšení (HR 0,80), byť nebylo signifikantní.

2972. MOŽNOSTI DIAGNOSTIKY A DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKY B-LYMFOMŮ S INTERMEDIÁRNÍMI RYSY MEZI DLBCL A BL

Campr V., Mrhalová M., Kalinová M., Kodet R. (Ústav
patologie a mol. medicíny, FN Motol, Praha)

Burkittův lymfom (BL) a difuzní velkobuněčný B-lymfom (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) jsou v klasifikaci WHO jednoznačně definované kategorie agresivních B-lymfomů, které mají odlišné morfolo- gické a klinické charakteristiky, v případě dospělých pacientů vyžadují odlišný terapeutický přístup a ma- jí různou prognózu. Jejich odlišení je tak kruciólní. Mezi oběma jednotkami existuje poměrně úzká „šedá zóna“ případů s hraniční morfologií a molekulárními změnami, pro kterou klasifikace WHO navrhla termín „neklasifikovatelný B-lymfom s rysy intermediárními mezi DLBCL a BL“ (B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and BL, BCLU). BCLU tedy není nosologická jednotka, ale je to „waste basket“ pro heterogenní skupinu nádorů ne- splňujících kritéria pro DLBCL či BL, která umožňují jejich samostatnou analýzu a současně brání, aby je- jich přítomnost ovlivnila výsledky studia sestav dobře definovaných DLBCL či BL.

Burkittův lymfom je definován jako vysoce ag- resivní ne-Hodgkinův lymfom tvořený monomorfními B-lymfocyty. Nádorové elementy jsou střední velikosti a mají vícečetná drobná jádérka. Mitotická a apoptotická aktivita jsou silně vyjádřené. Pravidlem je obraz „hvězdného nebe“, který je na pozadí tmavší nádorové populace tvořen disperzními světlými his- tiocyty fagocytujícími apoptotické buňky. Klasický BL je pozitivní při průkazu znaků zralého periferního B-lymfocytu CD20, CD79a, PAX5 a CD22 a má membrá- novou expresi IgM, negativní je TdT. Silnou expresí CD10 a BCL6 nádorové buňky odpovídají buňkám zá- rodečných center (germinal center, GC). Negativní jsou BCL2 a MUM1/IRF4, slabá nebo parciální exprese jednoho z těchto znaků však sama o sobě diagnózu BL nevyklučuje. Proliferační index stanovený pomocí Ki67/ MIB1 je prakticky 100 %. Definující je přestavba genu MYC, nejčastěji v rámci reciproké translokace t(8;14) (q24;q32) resp. jejích variant t(2;8)(p12;q24) a t(8;22) (q24;q11), která je spojena s imunohistologicky deteko- vanou expresí proteinu MYC. Karyotyp BL typicky není komplexní, přestavby genů BCL2 či BCL6 se neprokazují.

Difuzní velkobuněčný B-lymfom je tvořen velký- mi buňkami charakteru centroblastů či imunoblastů, případně mohou být anaplastické až RS-like. Nádor exprimuje znaky zralého B-lymfocytu. Proliferace je

vysoká a někdy přesahuje 95 %. Pomocí tzv. schématu Hansové je imunohistologicky možno rozlišit GC-like subtyp s expresí CD10 a BCL6 a nonGC-like subtyp CD10 negativní a MUM1 pozitivní. Tyto dvě skupiny se zhru- ba kryjí se subtypem s genovým expresním profilem buněk zárodečných center (GCB) resp. postgerminál- ních aktivovaných B-buněk (ABC). Zejména u nonGC- like subtypu je běžná exprese BCL2 často s koexpresí MYC, přičemž přestavba MYC se prokazuje max. u 10 % případů DLBCL. Morfologicky typický DLBCL s přestav- bou MYC do kategorie BCLU nepatří. Karyotyp DLBCL je komplexní, běžná je přestavba BCL6 či BCL2. Nádorové buňky bývají silně atypické, ale mohou být i i dosti uniformní, velikostí srovnatelné s elementy BL a při vysokém proliferacním a apoptotickém indexu se může tvořit obraz „hvězdného nebe“. Odlišení DLBCL s GC- like imunofenotypem od BL je někdy obtížné a v čás- ti případů se nedaří nádor přesně klasifikovat. Tyto případy se dříve označovaly jako „atypický Burkittův lymfom“ či „Burkitt-like lymfom“. Pro konfúznost termínů se špatnou reprodukovatelností klasifikace WHO jejich používání nedoporučuje a preferuje zařa- zení nádorů do kategorie BCLU.

Problematiku **diferenciální diagózy** DLBCL vs. BL vs. BCLU lze shrnout do čtyř hlavních okruhů.

1. Případy s morfologií intermediární mezi DLBCL a BL. U nádorů s intermediární morfologií a GC-like imunofenotypem negativita BCL2, prolifere- race nad 95 % a izolovaná přestavba MYC svědčí spíše pro BL. Naproti tomu pozitivita BCL2, proliferace do 90 % a nepřítomnost přestavby MYC při event. přestavbě BCL6 či BCL2 řadí nádor do kategorie DLBCL. Jako BCLU se označí případy s proliferací nad 95 %, expresí BCL2, komplexním karyotypem a přestavbou MYC ať již ty- pickou (kdy jsou partnerem imunoglobulinové geny) tak atypickou (s jinými partnery).

2. BL s atypickým imunofenotypem, zejména s expresí BCL2. Pokud u nádoru s jinak typickými rysy BL není pozitivita BCL2 spojena s přestavbou genu (a jednalo by se tedy o double hit lymfom resp. BCLU), ale je způsobena jinými příčinami, jedná se o BL.

3. BL s typickým imunofenotypem bez přestavby MYC. Doporučuje se provádět vyšetření FISH více son- dami a event. doplnit cytogenetické vyšetření. Pokud je nepřítomnost zlomu jediným abnormálním rysem, může se tumor označit jako BL. V opačném případě se jedná o BCLU.

4. Lymfomy se dvěma a více translokacemi. Jako BCLU se klasifikují všechny lymfomy jakékoli morfo- logie, u kterých se současně prokáže přestavba MYC a BCL6 resp. BCL2, event. vzácně CCND1, označované „double hit“ lymfomy (DHL). Menší část DHL vzniká

transformací folikulárního lymfomu, kdy se přestavba MYC objevuje v nádorové populaci s t(14;18). Vzácně jsou popsány případy s třemi přestavbami („triple hit“ lymfomy).

Závěr. V dobře definovaných jednotkách BL a DLBCL má diagnostika opřena o komplexní vyšetření pevné mantinely. BCLU tvoří směsice různorodých nálezů, které se odklánějí od BL a DLBCL. Lze očekávat, že s rozvojem metod typu sekvenování nové generace se podaří charakterizovat jednotlivé varianty BCLU a zpřesnit jejich diagnostiku, tak aby byla relevantní pro klinické rozhodování a predikci odpovědi na léčbu.

„Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN Motol)“

2952. SOUČASNÉ STANDARDY V URČOVÁNÍ KLINICKÉHO STADIA A HODNOCENÍ LÉČEBNÉ ODPOVĚDI U NEMOCNÝCH S MALIGNÍMI LYMFOMY

Sýkorová A., Pytlík R., Móciková H., Belada D., Benešová K., Papajík T., Janíková A., Šálek D., Procházka V., Vokurka S., Campr V., Klener P., Kubáčková K., Trněný M. (IV. interní hematologická klinika, FN a LF UK, Hradec Králové; I. interní klinika, 1.LF UK a VFN, Praha; Interní hematologická klinika, FN Královské Vinohrady a 3. LF UK, Praha; Hematoonkologická klinika, FN, Olomouc; Interní hematologická a onkologická klinika, FN, Brno; Hematologicko – onkologické oddělení, FN, Plzeň; Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha; Onkologická klinika, FN Motol, Praha)

Úvod: Prognóza nemocných s maligním lymfomem je závislá na histologickém/molekulárně- genetikém

podtypu lymfomu, prognostických faktorech a především ji významně ovlivňuje kvalita dosažené léčebné odpovědi. Prognostické faktory jsou specifické pro určité typy lymfomů a většinou zahrnují klinické stadium, věk, tělesnou kondici, a hodnotu laktátdehydrogenázy (LDH). [1-4, 5] Důležitým rizikovým faktorem ve většině prognostických indexech je rozsah onemocnění, které je základem pro hodnocení léčebné odpovědi.

Současné standardy určování klinického stadia a hodnocení léčebné odpovědi jsou založeny na tzv. „Luganské klasifikaci 2014“. [6,7] Tato klasifikace byla podrobena diskusi a konsenzuálnímu stanovisku k jejímu praktickému použití v roce 2015 na výročním zasedání Kooperativní lymfomové skupiny (KLS) a předkládané doporučení je výsledkem tohoto konsenzu. Doporučení v plném rozsahu bylo v lednu roku 2016 přijato k publikaci do časopisu Klinická Onkologie. [8]

Určování rozsahu onemocnění: K určování rozsahu onemocnění se používá fyzikální vyšetření společně se zobrazovacími metodami. Ze zobrazovacích metod má dominantní postavení PET/CT vyšetření, které nahradilo samostatné CT vyšetření, a to nejen u difuzního velkobuněčného B – lymfomu (DLBCL) a Hodgkinova lymfomu (HL), ale i u řady dalších lymfomů. [9-11] PET/CT vyšetření se nedoporučuje provádět u (¹⁸F)FDG neavidních lymfomů – tj. u lymfomu z malých lymfocytů, kožních lymfomů, Waldenströmovy makroglobulinemie/lymfoplasmocytárního lymfomu, lymfomu z marginální zóny, pokud u těchto diagnóz není suspekce na transformaci onemocnění nebo mimokožní postižení (v případě primárně kožních lymfomů). [7]

Na podkladě rozsahu onemocnění určeného zobrazovacími metodami se určuje klinické stadium dle

Tabulka 1: Revidovaná Ann Arbor klasifikace dle IWG z roku 2014 a doplněná, resp. modifikovaná klasifikace dle Kooperativní lymfomové skupiny ČR (toto označené kurzívou)

Stadium I	postižení 1 oblasti lymfatických uzlin <i>nebo</i> 1 extralymfatického orgánu (IE) <i>lokalizované postižení 1 „velkého“ extralymfatického orgánu (IE)</i> <i>jakékoliv (lokalizované, diseminované, difuzní) postižení 1 „malého“ extralymfatického orgánu (IE)</i>
Stadium II	postižení 2 nebo více skupin lymfatických uzlin na téže straně bránice <i>nebo</i> stadium I a II s postižením sousedního extralymfatického orgánu (IIE) včetně postižení 1 nebo více skupin lymfatických uzlin na téže straně bránice <i>lokalizované postižení 1 „velkého“ extralymfatického orgánu s postižením LU na stejné straně bránice (IIE)</i> <i>jakékoliv postižení 1 „malého“ extralymfatického orgánu a postižení LU na stejné straně bránice (IIE)</i>
Stadium II „bulky“	Stadium II s „bulky“ postižením
Stadium III	postižení lymfatických uzlin nebo orgánů na obou stranách bránice, které může být provázeno postižením sleziny (IIIS) <i>lokalizované postižení 1 „velkého“ extralymfatického orgánu s postižením LU na obou stranách bránice (IIIE)</i> <i>jakékoliv postižení 1 „malého“ extralymfatického orgánu postižení LU na obou stranách bránice (IIIE)</i>
Stadium IV	přídavné postižení extralymfatické tkáně (postižení nesousedících extranodálních orgánů) <i>diseminované či difuzní postižení „velkého“ extralymfatického orgánu s nebo bez postižení LU</i> <i>jakékoliv postižení více než 1 extralymfatického orgánu s nebo bez postižení LU</i>

Legenda: „velké“ EN orgány – játra, plíce, mezotel (pleura, pobříšnice, perikard), kostra, měkké tkáně. „malé“ EN orgány – jiné než „velké“ orgány. E – extranodální postižení

Tabulka 2 „Deauville“ kritéria pro hodnocení metabolické odpovědi u PET/CT vyšetření

Číslo škály	Charakteristika záchytu (¹⁸ F)FDG
1	Bez (¹⁸ F)FDG záchytu v tkáni
2	Záchyt (¹⁸ F)FDG ≤ mediastinum
3	Záchyt (¹⁸ F)FDG > mediastinum ale ≤ v játrech
4	Záchyt (¹⁸ F)FDG lehce > játra
5	Záchyt (¹⁸ F)FDG významně > játra a/nebo nové léze
X	Nové lokalizace záchytu (¹⁸ F)FDG nesouvisející s lymfomem

modifikované Ann Arbor klasifikace. V „Luganské klasifikaci“ z roku 2014 je představena nová modifikace AA klasifikace, kdy stadium I a II je lokalizovaným, stadium III a IV pokročilým onemocněním a navíc je zvlášť vyčleněno klinické stadium II s přítomností masivního postižení (tzv. KS II s „bulky“ postižením). Toto „intermediární“ klinické stadium však nemá jednotný význam. [6] Tabulka 1 ukazuje revidovanou AA klasifikaci z roku 2014 pro primárně nodální lymfomy.

Hodnocení masivního postižení (tzv. „bulk“): Přítomnost masivního postižení je u některých lymfomů negativním prognostickým znakem. Velikost „bulku“ není současnými kritérii jednoznačně definována a hodnotí se v závislosti na typu lymfomu (Hodgkinův vs. Non-Hodgkinův lymfom).

Určování extranodálního postižení: Revize kritérií z roku 2014 nepřispěla k určování rozsahu onemocnění s extralymfatickým postižením, proto KLS doporučuje se řídit u extralymfatického postižení dohodou z roku 2010, kdy extranodální orgány jsou z praktického hlediska rozděleny na tzv. „malé“ a „velké“, pro které byl zvolen odlišný přístup k určování rozsahu onemocnění z důvodu rozdílného klinického dopadu při jejich postižení [12, obrázek 1]. Označení „E“ je dle nových kritérií z roku 2014 doporučováno uvádět u extralymfatického postižení u časných stadií I bez nodálního postižení a u st. II s nodálním postižením šířícím se „per continuitatem“ extralymfaticky.

Postižení a velikost sleziny/jater: Slezina je označena za postiženou lymfomem, pokud je zvětšena v podélné ose > 13 cm a/nebo je přítomna PET pozitivita a/nebo jsou přítomna ložiska ve slezině a/nebo proběhla histologická verifikace postižení. [6,12,13] Pro postižení jater platí stejné podmínky, ale samotná hepatomegalie neznamená postižení lymfomem. [6,12]

Vyšetření kostní dřeně: Dle současného standardu dle revidovaných kritérií z roku 2014 došlo ke změně požadované velikosti vzorku dřeně z 20 mm na 25 mm z jednostranné biopsie. [6]

Vysoká senzitivita PET/CT vyšetření při postižení dřeně vedla k otázce, zda je nadále třeba provádět histologické vyšetření dřeně u všech typů lymfomů. Doporučení je takové, že u Hodgkinova lymfomu se vyšetření dřeně neprovádí, pokud bylo provedeno PET/CT vyšetření. Vyšetření dřeně není nově vyžadováno ani u difuzního velkobuněčného B - lymfomu, pokud nás nezajímá eventuální diskordantní nález ve dřeni a pokud není pacient zařazen do klinické studie, kde je trepanobiopsické vyšetření požadováno. Dle konsenzu KLS dřeně ale nadále vyšetřujeme pro riziko PET/CT falešné negativitu/pozitivitu či pro možnost přítomnosti diskordantního nálezu ve dřeni. [6] U všech lymfomů s nízkým stupněm malignity a u lymfomů z buněk pláště je nadále doporučeno biopsické vyšetření dřeně provádět.

B - symptomy: Dle nových doporučení z roku 2014 se doporučuje přítomnost „B“ příznaků uvádět pouze u Hodgkinova lymfomu, kde mají prognostický význam. U NHL se nově uvádět nemusí, neboť nejsou součástí žádného prognostického indexu, a tak nemají žádný vliv na prognózu. [6] KLS ale doporučuje přítomnost či nepřítomnost B - symptomů do dokumentace zaznamenávat i u NHL na základě zkušeností, že jejich přetrvávání v průběhu léčby může být známkou nedostatečné klinické odpovědi a jejich znovuobjevení může předcházet jiným projevům relapsu.

Vstupní hodnocení a hodnocení léčebné odpovědi u (¹⁸F)FDG PET avidních lymfomů - kvalitativní hodnocení PET/CT dle „Deauville kritérií“ - rok 2014 [7]: Výsledek vstupního záchytu (¹⁸F)FDG v postižených oblastech je stěžejní pro hodnocení metabolické odpovědi při hodnocení léčebné odpovědi jak v průběhu léčby (v současnosti především v klinických studiích), tak po jejím skončení. Hodnocení PET nálezu je v současné době hodnoceno vizuální pětistupňovou škálou koncipovanou na 1. Mezinárodním pracovním setkání týkající se použití PET vyšetření u lymfomů v Deauville v roce 2009. [14-16] Charakteristika kritérií je uvedena v tabulce 2.

Kooperativní lymfomová skupina doporučuje pro hodnocení léčebné odpovědi používat revidovaná Chesonova kritéria z roku 2014 založená u většiny lymfomů na PET/CT vyšetření. Vzhledem k tomu, že stále není možné PET/CT použít ve všech indikovaných případech a vzhledem k tomu, že je nashromážděno velké množství dat u nemocných, kde pro hodnocení byla použita starší léčebná kritéria, doporučuje KLS při slovním hodnocení odpovědi použít jak hodnocení dle CT, tak dle PET (příklad: dle CT parciální remise, PET negativní, celkově tedy kompletní remise).

Tabulka 3: Revidovaná kritéria léčebné odpovědi z roku 2014 dle PET/CT a CT vyšetření

Léčebná odpověď	Definice	Nodalní a extranodalní postižení	Neměřitelné léze	Organomegalie	Nové léze	Kostní dřev
CR	Vymizení všech projevů nemoci	a)CT/PET: skóre 1,2,3 s přítomností reziduální masy či bez - KMO b)CT: regrese na normální velikost na CT \leq 1,5cm, žádné EN postižení	a)CT/PET: nehodnocena b)CT: nepřítomna	a)CT/PET nehodnocena b)CT: regrese na normální velikost (délka sleziny \leq 13 cm)	a)CT/PET: nepřítomny b)CT: nepřítomny	a)CT/PET: není FDG avidita b)CT: normální morfolgie, pokud neurčena - normální IHC
PR	Regrese měřitelné nemoci a žádné nové postižení	a)CT/PET: skóre 4-5 s poklesem zachytu FDG ve srovnání se zachytem vstupně či rezid. postižením - PMO /PET během léčby: onemocnění odpovídá na léčbu PET na konci léčby: přítomnost reziduální choroby/ b)CT: \geq 50 % redukce SPD 6 největších měřitelných N/EN lézí	a)CT/PET: nehodnocena b)CT: nepřítomna/normální/v regresi, nesmí se zvětšit	a)CT/PET: nehodnocena b)CT: slezina - regrese v délce $>$ 50%	a)CT/PET: nepřítomny b)CT: nepřítomny	a)CT/PET: reziduální záchyt vyšší než v normální dřevě, ale nižší než vstupně b)CT: nehodnoceno
SD	Nedosažení CR/PR a není PD	a)CT/PET: nehodnoceno skóre 4 a 5 bez změn oproti vstupním vyš a vyš. během nebo na konci terapie - bez MO b)CT: $<$ 50% redukce SPD 6 největších měřitelných N/EN lézí	a)CT/PET: nehodnoceno b)CT: není zvětšení	a)CT/PET nehodnoceno b)CT: není zvětšení	a)CT/PET: nepřítomny b)CT: nepřítomny	a)CT/PET: stejný záchyt FDG jako vstupně b)CT:nehodnoceno
Relaps/ progrese	Jakákoliv nová léze nebo \geq 50% zvětšení původně postižených lokalizací proti nadíru (maximálnímu zmenšení po léčbě)	a)CT/PET: skóre 4 a 5 se vzestupem intenzity zachytu FDG ve srovnání se vstupním vyš. a)/nebo nové FDG avidní léze v průběhu léčby nebo léčbě b)CT: Uzlina/léze $>$ 1,5 cm v jakékoliv ose a \geq 50% zvětšení nejdelšího rozměru uzliny oproti nadíru a zvětšení nejdelšího nebo nekratšího rozměru oproti nadíru: 0.5cm pro léze \leq 2cm 1cm pro léze $>$ 2cm	a)CT/PET: žádná b)CT: nová nebo jasná progresse preexistující léze	a)CT/PET: nehodnoceno b)CT: 1.Zvětšení délky sleziny dříve zvětšené sleziny o $>$ 50%, 2.Bez předchozí splenomegalie nárůst v délce $>$ 2cm	a)CT/PET: Nové FDG avidní léze související více s lymfomem než s jinou etiologií (infekce, zánět), při nejistém nálezu je indikována biopsie nebo kontrolní vyšetření CT/PET v čase b)CT: 1.Nová léze, která se objevila po terapii 2.Nová uzlina $>$ 1,5 cm v jakékoliv ose 3.Nová EN léze $>$ 1cm v jakékoliv ose, je jestliže měří $<$ 1cm v jakékoliv ose, je vhodné ověřit souvislost s lymfomem 4.Hodnotitelné onemocnění jakékoliv velikosti související s lymfomem	a)CT/PET: Nové nebo rekurentní postižení b)CT: Nové nebo rekurentní postižení

Legenda: CT - computed tomography - počítačová emisní tomografie, PET - pozitronová emisní tomografie, FDG - fluorodeoxyglukoza, IHC - imunohistochemie, SPD (sum of products diameters= součet násobků dvou na sebe kolmých největších rozměrů mnohočetných lézí)
Hodnocení FDG avidity - „Devaulliské“ skóre 1-5; skóre 1- bez zachytu FDG oproti pozadí, skóre 2 - záchyt FDG \geq mediastinu, skóre 3 - záchyt FDG $>$ mediastinu s játra, skóre 4 - záchyt FDG výrazně vyšší než nad játra a/nebo přítomnost nových lézí, KMO - kompletní metabolická odpověď, PMO - parciální metabolická odpověď, MO - metabolická odpověď.



Tabulka 4: Zjednodušení tabulky 3 - „PET/CT kritéria“ (Cheson 2014)

5 - PS	1,2	3	4,5
V průběhu léčby	CR	Dobrá léčebná odpověď	Pokles akumulace (18F)FDG = PR Stejná akumulace (18F)FDG = SD Zvýšení akumulace (18F)FDG či nová léze = PD
Na konci léčby	CR	Sporná pozitivita (vs. CR)	Pokles akumulace (18F)FDG = PR Stejná akumulace (18F)FDG = SD Zvýšení akumulace (18F)FDG či nová léze = PD

Legenda: CR – kompletní remise, (18F)FDG –¹⁸F-fluorodeoxyglukoza, PR – parciální remise, SD – stabilní choroba, PD - progresse

Vstupní hodnocení a hodnocení léčebné odpovědi u (18F)FDG PET neavidních lymfomů dle CT:

Samostatné CT vyšetření a tzv. „CT kritéria“ se užívají u (18F)FDG neavidních či variabilně (18F)FDG avidních subtypů lymfomů u nemocných bez vstupního (18F)FDG PET/CT vyšetření nebo se vstupně negativním (18F)FDG PET/CT vyšetřením. Při CT vyšetření se vstupně hodnotí až 6 největších dvojrozměrně měřitelných lézí z různých oblastí ve 2 na sebe nejdelších kolmých rozměrech. Do hodnocení musí být zavzato mediastinální a retroperitoneální postižení, pokud je přítomno. Vstupně tedy zjistíme velikost SPD (sum of products diameters), který je definován jako součet násobků dvou na sebe kolmých největších rozměrů u 6 největších uzlin nebo uzlinových infiltrátů/extranodálních měřitelných lézí. [6,17,18] V případě nepřítomnosti měřitelné léze se za neměřitelnou lézi považuje postižení dřene a difuzní postižení dalších extranodálních tkání (např. kůže, játra, ledviny, mezotel atp.).

Dle nových doporučení z roku 2014 je velikost normální uzliny při hodnocení léčebné odpovědi simplifikována ($\leq 1,5$ cm v nejdelší ose). [6] Při úplné odpovědi

musí slezina regredovat ≤ 13 cm v podélné ose, velikost jater není definována. [6]

Tabulka 3 shrnuje revidovaná doporučení pro hodnocení léčebné odpovědi z roku 2014 podle PET/CT ve srovnání s CT vyšetřením. Tabulky 4 a 5 ukazují zjednodušená „PET/CT a CT kritéria“.

Závěr:

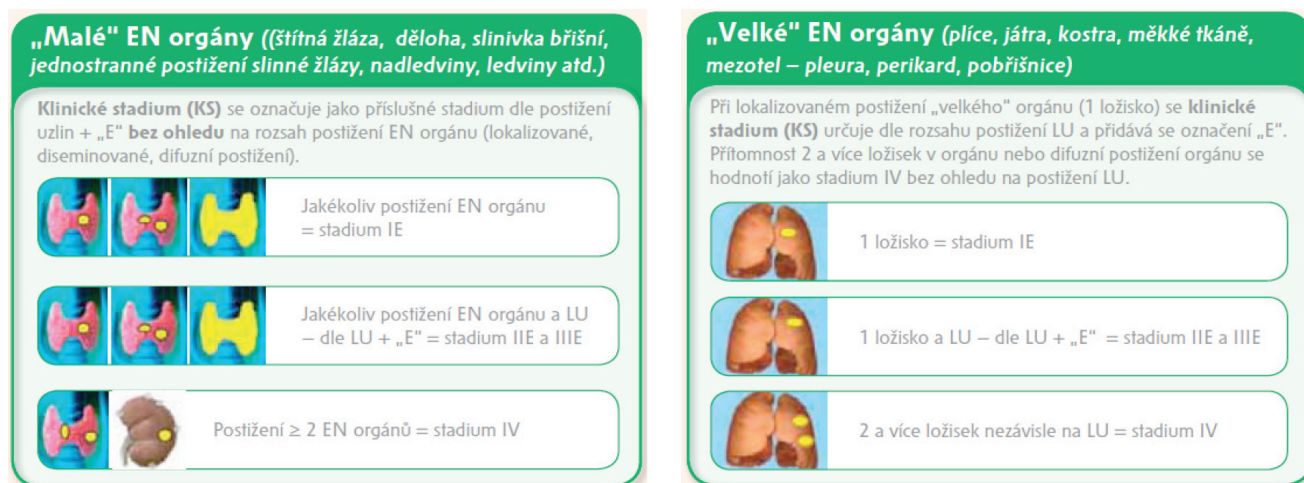
Současná „Luganská klasifikace 2014“ vznikla s ohledem na široké používání metody PET/CT, kdy léčebná odpověď dle PET/CT je v současné době nejvýznamnějším prognostickým faktorem u nemocných s lymfomy. Standardizace kritérií pro určování klinického stadia a léčebné odpovědi u maligních lymfomů vede ke zlepšenému hodnocení rozsahu onemocnění a odpovědi na léčbu a napomáhá hledání účinnějšího způsobu terapie ke zlepšení prognózy pacientů s tímto onemocněním. Slouží k jednotnému hodnocení výsledků klinických studií a současně zjednodušuje práci regulačním agenturám (EMA, SÚKL) v procesu registrace nových léčiv. Zároveň umožňuje i hodnocení léčebných výsledků mimo klinické studie, například v rámci lymfomového projektu Kooperativní lymfomové skupiny – prospektiv-

Tabulka 5: Zjednodušení tabulky 3 - „CT kritéria“ (Cheson 2014)

Léčebná odpověď	Charakteristika záchyty (18F)FDG
CR	LU $\leq 1,5$ cm, nepřítomné EN postižení, nepřítomna nová léze či neměřitelná léze, normální velikost jater a sleziny (slezina <13 cm), negativita dřene (imunohistochemie)
PR	$\geq 50\%$ redukce SPD 6 LU/EN lézí, léze $> 5 \times 5$ mm se započítávají do kalkulace neměřitelná léze – nepřítomna/normální/v regresi, nepřítomna nová léze Slezina - regrese v délce $>50\%$, dřen irrelevantní
SD	Nesplňuje kritéria CR, PR, PD
PD	Uzlina/léze $> 1,5$ cm v jakékoliv ose a $\geq 50\%$ zvětšení nejdelšího rozměru uzliny/léze oproti nadiru a zvětšení nejdelšího nebo nejkratšího rozměru oproti nadiru: 0,5cm pro léze ≤ 2 cm, 1 cm pro léze > 2 cm. Progrese měřitelné léze. Nové nebo rekurentní postižení dřene. Nová uzlina $> 1,5$ cm a/nebo nová EN léze > 1 cm. Zvětšení délky známé splenomegalie o $> 50\%$ nebo zvětšení normální velikosti sleziny > 2 cm v délce.

Legenda: LU – lymfatická uzlina, EN – extranodální, IHC – imunohistochemie, CR – kompletní remise, PR – parciální remise, PD – progresivní choroba, S – slezina, SPD (sum of products diameters) = součet násobků dvou na sebe kolmých největších rozměrů u 6 největších uzlin nebo infiltrátů/lézí.





Obrázek 1: Dohoda KLS pro určování klinického stadia u NHL s extralymfatickým šířením dle Ann Arbor klasifikace a modifikované Ann Arbor klasifikace, stadium IE vs. IVE

Legenda: LU – lymfatická uzlina, EN – extranodální, IHC – imunohistochemie, CR – kompletní remise, PR – parciální remise, PD – progresivní choroba, S – slezina

ně vedené databázi nově diagnostikovaných pacientů s lymfomy. Revize kritérií v roce 2014 přinesla řadu zjednodušení a upřesnění v hodnocení rozsahu onemocnění a hodnocení léčebné odpovědi, ale současně zůstávají nezdopovězené otázky k diskusi, které by měly být předmětem další revize v budoucnu.

POUŽITÁ LITERATURA:

Shipp MA. Prognostic factors in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: who has „high-risk“ disease? *Blood* 1994; 83(5):1165-73.

Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M et al. *The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP.* *Blood* 2007; 109(5):1857-1861.

Sokal-Céligny P, Roy P, Colombat P et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004; 104(5):1258-1265.

Federico M, Bellei M, Marcheselli L. Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J Clin Oncol* 2009; 27(27):4555-4562.

Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med* 1998; 339(21):1506-1514.

Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF et al. Recommendation for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *J Clin Oncol* 2014;32(27):3059-3067.

Barrington SF, Mikhael NG, Kostakoglu L et al. Role of Imaging in the Staging and Response Assessment of Lymphoma: Consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol* 2014;32(27):3048-3058.

Sýkorová A, Pytlík R, Móciková H et al. Určování klinického stadia a hod-

nocení léčebné odpovědi u nemocných s maligními lymfomy – doporučení Kooperativní lymfomové skupiny na základě revidovaných kritérií z roku 2014 (Luganská klasifikace). *Klin Onkol.* Přijato k publikaci 1/16.

Hutchings M, Loft A, Hansen M et al: Position emission tomography with or without computed tomography in the primary staging of Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2006; 91(4):482-489.

Elstrom R, Leonard JP, Coleman M et al. Combined PET and low-dose, noncontrast CT scanning obviates the need for additional diagnostic contrast-enhanced CT scans in patients undergoing staging or restaging for lymphoma. *Ann Oncol* 2008;19(10):1770-1773.

Pelosi E, Pregno P, Penna D et al. Role of whole-body [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography (FDGPET/CT) and conventional techniques in the staging of patients with Hodgkin and aggressive non Hodgkin lymphoma. *Radiol Med* 2008;113(4):578-590.

Sýkorová A, Belada D, Smolej L et al. Určování rozsahu onemocnění u non-Hodgkinových lymfomů, doporučení Kooperativní lymfomové skupiny. *Klin Onkol* 2010; 23(3):146-154.

Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds Meeting. *J Clin Oncol* 1989; 7(11):1630-36.

Boellaard R, Oyen WJ, Hoekstra CJ et al: The Netherlands protocol for standardisation and quantification of FDG whole body PET studies in multi-centre trials. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008;35(12):2320-2333.

Barrington SF, Qian W, Somer EJ et al: Concordance between four European centres of PET reporting criteria designed for use in multicentre trials in Hodgkin lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37(10):1824-1833.

Meignan M, Gallamini A, Haioun C: Report on the First International Workshop on Interim-PET Scan in Lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2009;50(8):1257-1260.

Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B et al: Report of an International Workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lympho-

mas: NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol* 1999; 17(4):1244-1253.

Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 2007; 25(5):579-86.

2909. SOUČASNÉ MOŽNOSTI BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE V LÉČBĚ LYMFODIČNÍCH NEOPLÁZIÍ

Lysák D., Holubová M.

(Hematologicko-onkologické oddělení, FN, Plzeň)

Protinádorová imunoterapie je širokým pojmem, který zahrnuje množství léčebných modalit. Může se jednat o aktivní imunoterapii nejčastěji ve formě protinádorových vakcín na bázi dendritických buněk či genetické imunizace nebo pomocí modulace imunitní odpovědi s ovlivněním inhibičních či aktivačních receptorů TCR signalizace. Jiným typem imunoterapie je adoptivní přenos imunitně efektivních komponent, kterými mohou být monoklonální protilátky anebo buněčná imunoterapie, která zahrnuje nádorově specifické T-lymfocyty, tumor infiltrující lymfocyty (TIL) a zejména geneticky modifikované lymfocyty exprimující chimerický antigenní receptor (CAR).

T-lymfocyty mají přirozeně schopnost vázat se na nádorové antigeny, rozpoznávat nádorové buňky jako cizorodé a způsobovat jejich destrukci. Bohužel řada nádorů je jen omezeně imunogenních a nevyvolávají dostatečnou T- buněčnou imunitní odpověď a současně využívají řadu mechanismů jak imunitní odpovědi unikát (imunopresivní cytokiny a inhibiční molekuly, T_{REG} atd.). Důležitým cílem moderní buněčné imunoterapie je její zacílení proti nádorovým buňkám na straně jedné a minimalizace působení na zdravé tkáně na straně druhé.

Myšlenka na využití T- buněčné adoptivní terapie vychází z GVL efektu, který pozorujeme po alogenní transplantaci, a také z úspěšného použití DLI (donor lymphocyte infusion) k léčbě potransplantačních relapsů či perzistujícího smíšeného chimerismu. Alogenní transplantace i imunomanipulace pomocí DLI jsou ale zatížené nezanedbatelnou toxicitou a rizikem těžkých forem reakce štěpu proti hostiteli (GVHD).

Z oblasti buněčné imunoterapie je v současné době v popředí zájmu hemato-onkologů zejména využití tzv. CAR T- lymfocytů. Základní struktura CARu (chimerický antigenní receptor) se skládá z extracelulární domény, která se specificky váže na cílový antigen, a z intracelulární signální domény, která spouští cytotoxickou odpověď. Extracelulární vazebná doména je získána z variabilního regionu monoklonální protilátky specifické k danému antigenu. Intracelulární část využívá

nejčastěji CD3 ζ aktivační doménu z T-buněčného receptoru (TCR) ve spolupráci s jedním nebo více kostimulačními receptory (jako např. CD28, 4-1BB). Kostimulační signály jsou nezbytné k dosažení plně funkční aktivace T-lymfocytů s dostatečnou mírou proliferace, cytotoxické aktivity a k jejich dlouhodobému přežití. Nádorové buňky a mikroprostředí neposkytují dostatek kostimulačních signálů a podporují vznik anergie T-lymfocytů. Podle počtu kostimulačních domén můžeme rozlišovat různé generace CARů. Například třetí generace CARů kombinuje vícečetné signalizační domény (CD3 ζ /CD28/4-1BB, CD3 ζ /CD28/OX40 atd.), které dále zvyšují efekt CAR T-lymfocytů. Tzv. čtvrtou generací CARů jsou TRUCK (T cells redirected for universal cytokine killing), kde vektor kódující CAR konstrukt obsahuje také sekvenci pro cytokin (např. IL-12), který je produkován po vazbě CARu na nádorový antigen a kumuluje se v cílové tkáni. Akumulace prozánětlivého cytokinu má za cíl přitáhnout ostatní imunokompetentní buňky (NK buňky, makrofágy atd.).

CAR T-lymfocyt se váže pomocí takto upraveného chimerického receptoru na cílový antigen (např. CD19) nacházející se na povrchu nádorových buněk. Následně dojde k aktivaci buněčných signalizačních kaskád T-lymfocytu, které napodobují přirozenou aktivaci cytotoxického T- lymfocytu, a k lýze nádorových buněk. CAR T-lymfocyty tedy kombinují vazebné vlastnosti monoklonálních protilátek a cytotoxickou kapacitu a schopnost proliferace T-lymfocytů. Výhodou modifikovaného CAR receptoru je skutečnost, že rozeznání a vazba cílového antigenu nejsou závislé na jeho standardní presentaci v kontextu HLA molekuly. CAR T-lymfocyty jsou schopné vázat pouze povrchové antigeny. Použitý antigen musí být nádorově specifický, aby CARy nevyvolávali autoimunitní reakci či jiné vedlejší efekty, které by mohly být i letální. Nejčastěji využívanými jsou CAR T-lymfocyty se specifitou vůči antigenu CD19, který je exprimován na B-lymfocytech a B-lymfoidních progenitorech, nikoliv však na kmenových buňkách, a tím představuje ideální cíl pro léčbu B- lymfoidních neoplazií (ALL, CLL či NHL).

Výchozím materiálem pro přípravu CAR T-lymfocytů je leukaferetický produkt, ze kterého se izolují mononukleární leukocyty nebo T-lymfocyty. Genetická modifikace T-lymfocytů CAR konstruktem se provádí nejčastěji retrovirovým vektorem nebo pomocí transpozoz. Po provedení transfekce/transdukce jsou T-lymfocyty dále *in vitro* kultivovány v přítomnosti cytokinů (např. IL-2) a kostimulačních signálů (např. anti-CD3/CD28 protilátky). Během několika dní dochází k jejich aktivaci a několikanásobné expanzi umožňující získat klinicky relevantní dávku.

Dávky CAR T-lymfocytů aplikované v klinických studiích se pohybovaly v rozmezí 1×10^5 – 3×10^7 /kg hmotnosti pacienta, nejčastěji v jedné infuzi. Jejich podání zpravidla předchází lymfodepleční chemoterapie, která vytváří prostor pro expanzi CAR T-lymfocytů potlačením supresorových vlivů v hostitelském mikroprostředí a snížením endogenní lymfocytární kompetice. CAR T-lymfocyty po aplikaci proliferují a mohou dlouhodobě přežívat (měsíce až roky). Naopak nedostatečný engraftment modifikovaných T-lymfocytů je jedním z hlavních důvodů selhání imunoterapie. Počty CAR modifikovaných T-lymfocytů a jejich perzistenci v krvi pacienta je možné stanovovat pomocí PCR metod nebo detekcí CAR antigenu na povrchu lymfocytů průtokovou cytometrií.

V současné době je ve světě otevřeno více než 90 klinických hodnocení zabývajících se CAR modifikovanými T-lymfocyty (www.clinicaltrials.gov), která se věnují nejen hematologickým maligním onemocněním ale i solidním nádorům (meduloblastom atd.). Nejvíce zkušeností je s B-lymfoidními neoplazmi, na kterých byla CAR technologie původně vyvíjena. CAR T-lymfocyty se specifitou proti CD19 antigenu (CTL019) prokázaly výbornou efektivitu u pacientů s akutní lymfoblastickou a chronickou lymfocytární leukémií. Jednotlivé studie se obtížně porovnávají pro metodologické rozdíly (různé typy a dávky CARů, různé chemoterapie, načasování léčby atd.) a jedná se většinou o malé soubory pacientů. Obecně je efekt CAR T-lymfocytů vyšší u ALL, kde se dosahuje až 70–90 % CR, než u CLL s cca 30 % CR (ORR 20–75 %). Větší soubor 14 pacientů s výrazně předlčenou relabující/refraktérní (R/R) CLL publikoval recentně Porter a kol. (1). Odpovědi bylo dosaženo u 8 pacientů (ORR 57 %), z toho 4x CR a 4x PR. *In vivo* expanze CAR T-lymfocytů korelovala s klinickou odpovědí a lymfocyty přežívaly až 4 roky po aplikaci. U pacientů v kompletní remisi nebyla detekovatelná reziduální nemoc, což naznačuje možnost eradikace onemocnění u části pacientů s pokročilou CLL.

První klinická data jsou k dispozici i pro pacienty s nehodgkinovskými lymfomy. Kochenderfer a kol. dosáhl po podání CTL019 kompletní remise u osmi z 15 pacientů s pokročilým NHL (2). Schuster a kol. aplikoval CTL019 20 pacientům s pokročilým CD19+ NHL bez možnosti další kurativní léčby. Bylo dosaženo 67 % ORR a 59 % PFS v 6-ti měsících (3). Turtle a kol. dokazuje na svém souboru 28 pacientů s R/R NHL význam lymfodepleční chemoterapie. Přidání fludarabinu k cyklofosfamidu vedlo k větší expanzi a delší persistenci podaných CTL019, což se projevilo i lepší klinickou odpovědí (ORR 67 % vs. 50 %) (4). Ve studii Sauter a kol. byly CTL019

aplikovány bezprostředně po autologní transplantaci osmi pacientům s R/R NHL, z nichž 5 dosáhlo CR (5). CAR T-lymfocyty namířené proti antigenu CD30 se testují také v terapii R/R Hodgkinova lymfomu, kde budou nejspíše v budoucnu indikovány po autologní transplantaci u pacientů s vysokým rizikem relapsu (6).

Pro CAR buněčnou terapii nelze u mnohočetného myelomu využít antigen CD19, protože jeho exprese na myelomových buňkách je slabá. Jako vhodný cíl se osvědčil BCMA (B-cell maturation antigen), který je přítomen na B-lymfoidní linii včetně myelomových buněk. První aplikace CAR-BCMA (dose escalation study u 11 pacientů s pokročilým R/R MM) prokázala efektivní anti-myelomovou aktivitu CAR T-lymfocytů (7).

CAR T-lymfocyty je možné připravit nejen z autologních lymfocytů, ale je možné modifikovat i alogenní lymfocyty dárcovského původu u pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně. Tím se otevírá možnost léčit potransplantační relapsy nebo implementovat imunoterapii jako součást časně konsolidace po alogenní transplantaci u vysoce rizikových hematologických malignit.

Nové technologie genetického inženýrství umožňují vytvářet universální (off-the-shelf) alogenní CAR T-lymfocyty, které díky odstranění exprese TCR překonávají HLA bariéru, nevyvolávají aloreaktivní odpověď a GVHD. Při současné deficienci CD52 nebo resistenci k fludarabinu je možné provést před jejich aplikací efektivní lymfodepleci neohrožující CAR T-lymfocyty. Tato terapie byla poprvé úspěšně použita u pediatrického pacienta s B-ALL relabující po alogenní transplantaci i léčbě blinatumomabem (8).

Aplikace CAR T-lymfocytů je spojena se specifickými komplikacemi. Častou komplikací je syndrom z uvolnění velkého množství cytokinů (cytokiny release syndrome, CRS), způsobený uvolněním cytokinů (IL-10, IL-6, IFN- γ) při aktivitě a proliferaci CAR T-lymfocytů. Symptomy se pohybují od chřipkových příznaků jako horečka, myalgie až po těžké stavy s hypotenzí, capillary-leak syndromem a respiračním selháním vyžadující intenzivní péči. V různých studiích je výskyt CRS popisován u 20–100 % pacientů (těžký CRS u 27–53 %). Terapie CRS zahrnuje kortikosteroidy a zejména u těžších forem protilátku proti IL-6 receptoru (tocilizumab). Očekávaným vedlejším účinkem po aplikaci CTL019 je protrahovaná aplazie B-lymfocytů s hypogamaglobulinémií. Závažnost a doba trvání deplece B-lymfocytů závisí především na persistenci CAR T-lymfocytů a slouží zároveň jako nepřímý ukazatel efektivity léčby. Defekt humorální imunity se musí řešit substitucí imunoglobulinů. Neočekávanou toxicitou, která byla popsána v řadě studií, je encefalopatie se symptomatologií

zahrnující zmatenost, záchvaty, afázie, změny mentálních funkcí. Tyto nežádoucí účinky jsou reversibilní, časově odpovídají CRS, ale jejich přesná etiologie je nejasná. V rámci snah o zvýšení bezpečnosti léčby CAR T-lymfocyty a omezení zejména dlouhodobé toxicity se testuje využití různých sebevražedných genů jako prostředku eliminace nadměrné nebo již nepotřebné imunitní odpovědi.

Buněčná imunoterapie založená na CAR modifikovaných T-lymfocytech zaznamenává v poslední době mnoho úspěchů nejen u B-lymfoidních neoplazií ale i u dalších hematologických či solidních nádorů. Zůstává nezodpovězena řada otázek týkajících se optimální přípravy a klinického použití CAR T-lymfocytů, na které se snaží odpovědět probíhající klinické studie. Vedle toho se testují možnosti kombinace CARů s monoklonálními protilátkami a imunomodulačními molekulami. CAR T-lymfocyty nabízí obrovský potenciál a možnost vytvářet efektivní protinádorovou léčbu specifickou pro daného pacienta s minimem vedlejších účinků.

Práce byla podpořena grantem MZ ČR-RVO (Fakultní nemocnice Plzeň-FNPL, 00669806), grantem MZ 15-30661A a grantem Nadace pro transplantaci kostní dřeně.

POUŽITÁ LITERATURA:

Porter DL, Hwang WT, Frey NV et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med* 2015; 7(303): 303ra139.

Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Clin Oncol* 2015; 33(6): 540-9.

Schuster SJ, Svoboda J, Nasta S et al. Phase IIa trial of chimeric antigen receptor modified T cells directed against CD19 (CTL019) in patients with relapsed or refractory CD19+ lymphomas. *J Clin Oncol* 2015; 33: 8516.

Turtle CJ, Berger C, Sommermeyer D et al. Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cell Therapy for B Cell Non-Hodgkin Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia: Fludarabine and Cyclophosphamide Lymphodepletion Improves In Vivo Expansion and Persistence of CAR-T Cells and Clinical Outcomes. *Blood* 2015; 126 (23): 184.

Sauter CS, Riviere I, Bernal Y et al. Phase I trial of 19-28z chimeric antigen receptor modified T cells (19-28z CAR-T) post-high dose therapy and autologous stem cell transplant (HDT-ASCT) for relapsed and refractory (rel/ref) aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma (B-NHL). *J Clin Oncol* 2015; 33: 8515.

Ramos CA, Ballard B, Liu E et al. Chimeric T Cells for Therapy of CD30+ Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphomas. *Blood* 2015; 126 (23): 185.

Ali SA, Shi V, Wang M et al. Remissions of Multiple Myeloma during a First-in-Humans Clinical Trial of T Cells Expressing an Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor. *Blood* 2015; 126 (23): LBA-1.

Qasim W, Amrolia PJ, Samarasinghe S et al. First Clinical Application of Talen Engineered Universal CAR19 T Cells in B-ALL. *Blood* 2015; 126 (23): 2046.

2944. AKTUALIZOVANÁ DOPORUČENÍ PRO DIAGNOSTIKU A LÉČBU CHRONICKÉ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIE (CLL) ČESKÉ CLL SKUPINY

Smolej L., Špaček M., Obrtlíková P., Pospíšilová Š., Jarošová M., Urbanová R., Lysák D., Břejcha M., Schwarz J., Doubek M. (IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové; I. interní klinika – klinika hematologie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice, Praha; Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Masarykovy Univerzity, Brno; Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc; Hematologicko-onkologické oddělení, Fakultní nemocnice, Plzeň; Hematologické oddělení, Nemocnice, Nový Jičín; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

V posledních třech letech došlo k zásadnímu vývoji v oblasti prognostických faktorů i léčby chronické lymfocytární leukémie (CLL). Jedná se zejména o prognostický a prediktivní význam mutací genu TP53, zavedení nových monoklonálních protilátek a režimů chemoimunoterapie jak do léčby 1. linie nemocných s významnými přidruženými chorobami, tak i do terapie relapsu/refrakterního onemocnění; nejvýznamnější novinku pak představuje registrace cílených inhibitorů drah B-buněčného receptoru, v jejímž důsledku se poněkud mění i postavení alogenní transplantace krevetvorných kmenových buněk. Vzhledem k těmto stěžejním změnám proto vytvořila Česká skupina pro CLL (ČSCLL), sekce České hematologické společnosti ČLS JEP, aktualizovaná doporučení k usnadnění rozhodování o diagnostických a léčebných postupech v klinické praxi. Doporučení se zakládají na důkladné analýze současné literatury a vycházejí z principů medicíny založené na důkazech. V prezentaci budou shrnuty nejdůležitější změny vůči předchozí verzi doporučení ČSCLL z roku 2013.

KONFERENCE ZDRAVOTNÍCH LABORANTŮ 2

2935. SWINGUJEME V LEPŠÍM ČASE?

Dvořáková K., Hojková P., Smičková J., Holusková I., Galuzzková D. (TO FN, Olomouc)

Úvod: Uvedení analyzátoru Swing TwinSampler do provozu laboratoře testů slučitelnosti Transfuzního oddělení (TO) proběhlo v červenci 2014. Zavedení nového analyzátoru nám umožnilo rychlejší vyšetření statimových požadavků, zejména z ambulance Hemato-onkologické kliniky. Cíl: Naším cílem bylo zjistit, jaký je čas od doručení krevního vzorku do laboratoře přes provedení testu slučitelnosti a ozáření transfuzního přípravku (TP) až po výdeje TP na klinické oddělení. Materiál: Krevní vzorek odebraný do zkumavky s K3EDTA. Metodika: Do července 2014 byly prováděny testy slučitelnosti pouze na analyzátoru Techno TwinStation a manuální metodikou. V červenci byl uveden do provozu další analyzátor, Swing TwinSampler, čímž došlo k rozšíření možnosti vyšetřování testů slučitelnosti. Rozsah i princip vyšetření je totožný na obou analyzátořech i u manuálního vyšetření. Denně probíhá vnitřní denní kontrola kvality používaných reagensů za pomoci kontrolního kitu DiaMed Q.C. System. 4x ročně se účastníme externího hodnocení kvality (EHK). Výsledky: Bylo provedeno sledování vzorků zaslaných z ambulance Hemato-onkologické kliniky s požadavkem na provedení testu slučitelnosti. Sledovaným obdobím byly tři po sobě jdoucí kalendářní měsíce v rozmezí tří let. První sledovaná skupina byla vyšetřována v období, kdy jsme testy slučitelnosti prováděli na analyzátoru Techno TwinStation a manuální metodikou. Další sledované období bylo krátce po zavedení analyzátoru Swing TwinSampler do provozu. Třetí sledování proběhlo opět s odstupem jednoho kalendářního roku. Hodnotili jsme 800 vzorků, které byly vyšetřeny ve sledovaném časovém úseku. Závěr: Co nám tedy přineslo zavedení analyzátoru Swing TwinSampler do provozu? Podle našich výsledků splňujeme doporučení Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP č. STL2015_12 ze dne 01. 09. 2015 verze 1, kde se za obvyklou považuje doba vydání do 90-ti minut od doručení vzorku. Dosáhli jsme zlepšení času v průměru o 15% u neozářených transfuzních přípravků a o 22% u ozářených transfuzních přípravků. Další možnosti ke zlepšování vidíme v transportu vzorků a transfuzních přípravků, což by mohla vyřešit potrubní pošta, která je ve výstavbě.

2980. NÁLEZ EOZINOFILIE V KREVNÍM OBRAZE A V KOSTNÍ DŘENI Z NEZNÁMÉ PŘÍČINY – PREZENTACE KAZUISTIK DVOU NEMOCNÝCH

Dynterová A., Fátorová I., Smolej L. (IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice, Hradec Králové)

Eozinofily jsou leukocyty řazené mezi granulocyty, které obsahují četná specifická granula barvící se kyselým barvivem eozinem oranžově, a jádro, které je nejčastěji bilobární, brýlovitého tvaru. Eozinofilní granula obsahují specifické enzymy (fosfatázy, eozinofilní peroxidázu, myeloperoxidázu, bazické proteiny aj.), které mají antimikrobiální a cytotoxické účinky namířené především proti parazitům. Poločas eozinofilů v krevním oběhu před migrací do tkání, kde je jich minimálně stokrát více než v krvi, se pohybuje od 6 do 12 hodin. Nejvíce eozinofilů lze nalézt v orgánech s epitelálním povrchem, který se dostává do styku se zevními alergeny (respirační, gastrointestinální trakt). Zde mohou eozinofily přežívat řádově týdny. Počet eozinofilů v krvi kolísá v závislosti na věku pacienta, denní době, námaze a na vlivech okolního prostředí se sezónními alergeny. Počet eozinofilů je nejnižší ráno a nejvyšší v noci. U zdravého dospělého člověka tvoří eozinofily 0 - 5 % z celkového počtu leukocytů. Eozinofilie je vzestup počtu eozinofilních granulocytů nad fyziologickou hodnotu, může mít reaktivní nebo klonální charakter. Výrazně častější je výskyt reaktivní eozinofilie (podle kanadské studie je incidence reaktivní eozinofilie < 0,2 %), kdy se jedná o reakci na specifickou T-buněčnou imunitní odpověď, obvykle na zevní alergeny nebo na parazitární infekci, výjimečně na jiné infekce (mykotické nebo bakteriální). Sekundární eozinofilie může provázet velké množství chorob (maligní choroby, kožní onemocnění, endokrinní poruchy, autoimunitní onemocnění aj.), z nichž některé jsou dobře, jiné hůře léčebně ovlivnitelné. Stav spojený s proliferací klonálních eozinofilních prekurzorů (např. chronická eozinofilní leukemie, akutní myeloidní leukemie s eozinofilní diferenciací) jsou velmi vzácné. Každý nález zvýšeného počtu eozinofilů vyžaduje pečlivé vyšetření a pokud je rozpoznán patologický podklad tohoto zvýšení, tak i včasnou odpovídající léčbu. Ve dvou kazuistikách budeme prezentovat nálezy nemocných, u nichž byla zjištěna výrazná eozinofilie při vyšetření krevního obrazu. Na základě těchto nálezů byl proveden aspirát kostní dřeně a další diagnostika těchto stavů, která z části nebo zcela objasnila jejich příčinu.

2920. CYTOGENETIKA AKUTNÍCH LYMFOLASTICKÝCH LEUKEMIÍ - KAZUISTIKA

Hanzlíková J., Prekopová I., Kropáčková J., Holzerová M., Balcárková J., Urbánková H., Vatalíková M., Krůzová L., Mlynářčiková M., Szotkowski T., Jarošová M. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Akutní lymfoblastická leukemie (ALL) je heterogenní lymfoproliferativní onemocnění s výskytem více jak 30% lymfoblastů v kostní dřeni nebo periferní krvi. Nejdůležitějším diagnostickým nástrojem je imunofenotypizace, která dovoluje blastické buňky zařadit do buněčných linií a tím odlišit T-buněčné (T-ALL) (~25%) a B-buněčné (B-ALL) (~75%) akutní lymfoblastické leukemie. Současně platná WHO klasifikace ALL je založena na genetických změnách a dovoluje rozdělovat nemocné do prognostických podskupin. K prognosticky nepříznivým chromosomovým změnám u ALL patří nálezy translokací t(9;22)(q34;q11) a t(4;11)(q21;q23). Frekvence výskytu Ph+ ALL u dospělých nemocných je asi 25%, u nemocných starších 55 let až 50%. Pro určení přítomnosti Ph chromosomu se používá klasické cytogenetické vyšetření, které je doplněno metodou FISH. Klasické cytogenetické vyšetření dovoluje určit i přítomnost dalších chromosomových změn. K častým změnám patří chybění chromosomu 7 (-7), přítomnost dalšího Ph chromosomu a méně často se vyskytují hyperdiploidie s počtem nad 50 chromosomů. Výskyt přídatných změn může souviset s klonálním vývojem klonu s pouze Ph chromosomem. V práci prezentujeme případ nemocné se zajímavým nálezem Ph+/hyperdiploidní ALL, cytogenetické a molekulárně cytogenetické nálezy potvrzující význam cytogenetiky akutních leukemií. Nález translokace t(4;11)(q21;q23) určuje prognosticky nepříznivou podskupinu jak u dětských, tak dospělých pacientů s ALL. Frekvence této změny u dospělých ALL nemocných je 10%, s mírně zvýšenou incidencí na 30% u pro-B ALL subtyp ALL. Kromě samotné translokace jako jediné změny karyotypu mohou mít nemocní přídatné chromosomové změny, které jsou pozorovány až u 1/3 nemocných. Nejčastější přídatnou změnou je nadpočetný chromosom X, změny chromosomu 7p, včetně nálezu isochromosomu i(7)(q10), trisomie chromosomu 8 a delece krátkých ramen chromosomu 9 (9p-). Budeme prezentovat zajímavé cytogenetické nálezy komplexního karyotypu u nemocné s ALL diagnostikované a léčené na HOK FN Olomouc.

Práce je podporovaná grantem IGA UP 2016-001.

2994. MOŽNÁ ÚSKALÍ PŘI ANALÝZE KREVNÍCH DESTIČEK

Sečkařová M., Dohnal J., Juráňová J., Štěpánková A., Lapčíková A., Kadlecová J., Slavík L. (Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Získání validního výsledku při stanovení počtu krevních elementů na hematologických analyzátoch může mít i v dnešní moderní době jistá úskalí či omezení, na která je nutné pamatovat. Dnes běžně používané hematologické analyzátoch provádějící analýzu krevního obrazu s 5-ti populačním diferenciatním rozpočtem leukocytů, využívají k analýze impedančního a optického principu. Pro vyšetření krevního obrazu se používá nesrážlivá periferní krev (odběr do EDTA). Při analýze krevních destiček získáváme parametry: - přímo měřené: PLT - počet krevních destiček MPV - střední objem krevních destiček P-LCR - poměr velkých trombocytů (PLT větší než 12fl) IPF - frakce nezralých destiček (retikulované trombocyty) - vypočítané: PDW - šíře distribuce krevních destiček PCT - destičkový hematokrit Výsledkem impedanční analýzy krevních destiček je histogram (závislost počtu trombocytů na jejich velikosti). V naší hematologické laboratoři věnujeme pozornost jak počtům trombocytů (včetně jejich výrazných změn), tak abnormalitám v histogramu trombocytů. Abnormální histogramová křivka upozorní na tyto interference. 1. kontaminace roztoku 2. přítomnost velkých trombocytů, shluků trombocytů 3. přítomnost patologických erytrocytů, artefaktů erytrocytů Při optické analýze jsou trombocyty označeny fluorochromem a přímo měřeny. Optickou analýzu krevních destiček proto upřednostňujeme u trombocytopenických pacientů. Z hlediska diferenciatní diagnostiky trombocytopenie musíme nejdříve odlišit možnost preanalytického ovlivnění stanovení, ať už v podobě nevalidního odběru nebo pseudotrombocytopenie. Vyloučení nevalidního odběru (sraženina ve zkumavce, která může vzniknout v preanalytické fázi) provádíme scezením krve. Vyloučení pseudotrombocytopenie: provedeme optickou analýzu a mikroskopickou kontrolu počtu trombocytů v nátěru periferní krve. Dále věnujeme pozornost velikosti krevních destiček a zachycení případného satelitismu trombocytů v nátěrech periferní krve. Jsou-li v nátěru periferní krve zjištěny shluky trombocytů, požádáme o nový odběr krve pacienta, avšak do jiného protisrážlivého prostředku než je EDTA, abychom vyloučili tzv. EDTA fenomén. V naší laboratoři používáme ThromboExact obsahující ionty magnézia. Lze také použít odběr do oxalátu (popř. do citrátu), u nich však dochází ke zkreslení naměřených hodnot bílé a červené řady. Pro vyloučení chladových

protilátek využíváme odběr do EDTA transportovaný do laboratoře v termosce s teplou vodou (37°C). Z hlediska diferenciální diagnostiky trombocytopenie můžeme využít také některý z parametrů vyzrávání trombocytů, jako např. IPF (retikulovaných trombocytů), který je významný pro neinvazivní diagnostiku izolovaných trombocytopenií (konzumce trombocytů versus jejich nedostatečná tvorba). U hematom-onkologických pacientů IPF může pomoci k sledování obnovy trombopoézy po chemoterapii nebo transplantaci kostní dřeně. Zjištění trombocytopenie je důležité pro další diagnostiku idiopatické trombocytopenické purpury (ITP) případně dalších chorobných stavů spojených se snížením krevních destiček, včetně ovlivnění řadou léků. Domníváme se, že i v této technicky vyspělé době je pro validitu výsledků stále důležitý a nepostradatelný lidský faktor.

2962. DIAGNOSTIKA HEMOGLOBINOPATIÍ - KAZUISTIKY

Orviská M., Divoká M., Lapčíková A., Fraňková H., Pospíšilová D., Divoký V., Indrák K. Papajík T. (Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc; Krajská nemocnice, Liberec; Dětská klinika, FN a LF UP, Olomouc; Ústav biologie LF UP, Olomouc)

Již čtvrt století se zabývají laboratoře HOK, které v roce 2014 získaly akreditaci jako centrum pro vyšetřování raritních chorob, diagnostikou talasemií a hemoglobinopatií. Při podezření na hemoglobinopatii rutinně provádíme bioanalytické testy stanovení hladin HbA2, HbF, elektroforézy hemoglobinu v polyakrylamidovém gelu. Při podezření na nestabilní hemoglobinovou variantu vyšetřujeme testy stability hemoglobinu - izopropanolový test a test na Heinzova tělíška. Při zjištění patologických výsledků svědčících pro hemoglobinopatii pokračujeme v pátrání po její příčině pomocí molekulárně genetické analýzy na úrovni DNA, pomocí které odhalujeme kauzální mutaci a potvrdíme diagnózu hemoglobinopatie. Mezi základní molekulárně-genetická vyšetření, která užíváme, patří alelově-specifická polymerázová řetězová reakce, sekvenční analýza a MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). V našem sdělení přinášíme popis tří zajímavých kazuistik: 1. Pacienta s nosičstvím alely pro nestabilní hemoglobinovou variantu St. Louise s pozitivními Heinzovými tělísky, 2. Rodiny s abnormální hemoglobinovou variantou Hoshida a 3. Pacienta indického původu s beta-talasemickou delecí. V naší prezentaci ukážeme sled nálezů jednotlivých vyšetření, které nás přivedly k diagnóze hemoglobinopatie počínaje hodnotami červeného krevního obrazu s cha-

rakteristickou morfologií erytrocytů až po diagnostický výsledek molekulárně genetické analýzy.

2979. NAŠE ZKUŠENOSTI SE SETEM STIC EXPERT® HIT STAGO

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

Úvod: Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) je jednou z nejzávažnějších komplikací léčby heparinem. Vyskytuje se zejména při podávání nefrakcionovaného heparinu (UFH), v menší míře však i při léčbě nízkomolekulárním heparinem (LMWH). Určení diagnózy HIT spočívá v hodnocení klinických příznaků a laboratorní diagnostice. Klinické hodnocení využívá některý ze skórovacích systémů, např. 4T. Laboratorní diagnostika je založena na imunologických a funkčních testech. Zpravidla se vyšetřuje nejprve screeningový test, jehož výhodou je zejména jednoduchost a rychlost provedení. Měl by mít 100% negativní prediktivní hodnotu. Vzhledem k imunologickému podkladu však může poskytovat falešně pozitivní výsledky. Poté se provádí některý z řady dalších imunologických či funkčních testů, které mají zpravidla vyšší specifitu, provedení však bývá časově náročnější. V případě dosažení pozitivního výsledku testem imunologickým se vždy doporučuje provést konfirmaci testem funkčním, nejlépe Serotonin release assay (SRA), jež je považován za zlatý standard v laboratorní diagnostice HIT. Cíle práce: Vyhodnotit výsledky získané setem Stic EXPERT HIT firmy Diagnostica Stago, naměřené během 3,5letého používání tohoto setu v naší laboratoři a dále srovnat všechny pozitivní výsledky s výsledky konfirmačního testu SRA, prováděného na Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze. Metodika: Vyšetřované vzorky pocházejí převážně od nemocných hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Hradec Králové (FNHK) s podezřením na HIT. Vzorky byly vyšetřovány v laboratoři IV. interní hematologické kliniky FNHK od srpna 2012 do března 2016 setem Stic EXPERT HIT. Jedná se o imunologickou screeningovou metodu založenou na principu „nanoparticle-based lateral-flow immunoassay“, která detekuje protilátky proti komplexu heparin-destičkový faktor 4 (PF4). Výrobce setu uvádí senzitivitu 100 % a specifitu 93 %. Výsledky: Během 3,5 letého používání setu Stic EXPERT HIT bylo v naší laboratoři provedeno 148 vyšetření, z nichž bylo 20 pozitivních. Dle doporučení by měly být všechny pozitivní výsledky potvrzeny konfirmačním funkčním testem, nejlépe SRA. Z 20 pozitivních výsledků ve screeningovém testu jich bylo na konfirmaci zasláno pouze 10. U čtyř z nich byla pozitivita potvrzena, šest

bylo v SRA negativních. V jednom případě byl výsledek screeningového testu falešně negativní. Závěr: Při použití setu Stic EXPERT HIT jsme potvrdili poměrně vysokou falešnou pozitivitu imunologických testů, což potvrzuje potřebu všech pozitivních výsledků, naměřených imunologickými testy, confirmovat testem funkčním, nejlépe SRA. Dosažená specifická setu je dle

našeho souboru nižší, než udává výrobce. Zaznamenali jsme také případ falešné negativity, což je v rozporu se 100% senzitivitou setu udávanou výrobcem. Pokud tedy výsledek screeningového testu neodpovídá klinickým příznakům, je potřeba nemocného vždy vyšetřit jiným imunologickým nebo funkčním testem.

MORFOLOGIE

2862. NÁLEZY V KOSTNÍ DŘENI U VYBRANÝCH AUTOIMUNITNÍCH STAVŮ ČI VZNIKAJÍCÍCH V DŮSLEDKU JEJICH LÉČBY

Buliková A., Kissová J., Trnavská I., Antošová L., Babáčkova G. (Oddělení klinické hematologie, FN Brno)

ÚVOD

Autoimunitní choroby případně i jejich léčba jsou relativně často provázeny cytopenií resp. i pancytopenií v periferní krvi. Tato skutečnost obvykle vede k indikaci vyšetření kostní dřeně, která má za cíl umožnit diferenciální diagnostiku příčiny těchto nálezů. V praxi se však setkáváme se situacemi, kdy takovéto invazivní vyšetření pouze na základě cyto-morfologického hodnocení jednoznačné rozhodnutí nepřináší. Cílem našeho sdělení je přiblížit možné nálezy v kostní dřeni u autoimunitních stavů, které patří do skupiny hematologicky podmíněných cytopenií, dále u dalších chorob ze skupiny nemocí systémových a v neposlední řadě zmínit změny, ke které vede medikace používaná u různých typů imunopatologií. Nelze navíc opomenout skutečnost, že porucha imunity je nedílnou součástí patofyziologie vzniku myelodysplastického syndromu (MDS) a/nebo lymfoproliferativních stavů včetně možných klinicko-laboratorních konsekvencí.

AUTOIMUNITNĚ PODMÍNĚNÉ CYTOPENIE V HEMATOLOGII

Do této skupiny onemocnění řadíme autoimunitní neutropenii, autoimunitní hemolytické anémie, imunitní trombocytopenii, heparinem indukovanou trombocytopenii, trombocytopenii asociovanou s antifosfolipidovými protilátkami a perniciózní anémií. Avšak ne každý pacient s podezřením na takovouto diagnózu musí nezbytně podstoupit vyšetření kostní dřeně; indikace se liší podle věku nemocného a dále dle typického či nejasného klinicko-laboratorního nálezu podle platných doporučení (1-3).

Autoimunitní neutropenie

Tento typ imunitní cytopenie může být podmíněn protilátkami či buňkami imunitního systému. V kostní dřeni mohou být nálezy zcela normální, v případě neutropenie zprostředkované buňkami se může vyskytnout lehká dřeňová hypoplasie granulopoézy s posunem k méně zralým formám (4). V každém případě je nutno vyloučit neutropenii provázející leukémií z velkých granulovaných lymfocytů (LGL) (5). V dospělých žen je jak imunitně podmíněná tak idiopatická

neutropenie relativně častá a vyšetření kostní dřeně zde nepřináší jednoznačné rozhodnutí (6).

Autoimunitní hemolytické anémie

Z patofyziologického pohledu jde o heterogenní skupinu onemocnění, která vedou k častěji extravaskulární méně často intravaskulární hemolýze v důsledku přítomnosti relativně široké skupiny autoprotilátek, které jsou namířeny proti antigenům na erytrocytech. Vyšetření kostní dřeně není podmínkou diagnózy (7), ale tam, kde je provedeno, musí být vždy nálezy interpretovány v kontextu s ostatními nálezy, tedy s průkazem hemolýzy a anti-erytrocytárních protilátek. Kostní dřeň je hyperplastická se zmnožením erytroidní linie, která je často makro-normoblastická tj. erytroblasty jsou větší velikosti, ale mají jaderné a cytoplazmatické charakteristiky běžných normoblastů (8). U některých typů zejména prudce probíhajících AIHA může docházet ke zřetelné transienční dyserythropoéze (9), zatímco déle probíhající případy jsou provázeny sekundárním deficitem folátů s obvykle lehkou megaloblastovou přestavbou. Při převažující extravaskulární hemolýze dochází ke zvýšení dřeňových makrofágů, které obsahují fagocytované buněčné zbytky a při barvení na železo prokazujeme zvýšení počtu siderofágů resp. i siderotické granulace. U prudké intravaskulární hemolýzy jsou naopak prokazovány známky sideropenie.

Velmi recentně (10) byly na malé skupině nemocných s hemolytickou anémií popsány změny, které jsou zařazovány do změn megaloblastických a to abnormální shlukování jaderného chromatinu (red cell with abnormal chromatin clumping - RCACC); tyto změny mělo 7 z analyzovaných 12 nemocných s touto diagnózou. Od typické megaloblastové přestavby se liší, ale lze je nalézt i u pacientů s myelodysplastickým syndromem (MDS), v malém procentu i u nemocných s imunitní trombocytopenií.

Imunitní trombocytopenie (ITP)

Při podezření na tuto diagnózu se vyšetření kostní dřeně indikuje v praxi snad nejčastěji, přestože izolovaná trombocytopenie by neměla být indikací u většiny nemocných (1,2,11). Důvodem je zřejmě časté chybné diagnostické potvrzení laboratorního nálezu v případě ITP. Již před 70-ti lety Dameshek (12) popsal nálezy v kostní dřeni u pacientů s akutní či chronickou imunitní trombocytopenií a porovnal ji s normálními nálezy resp. i se stavy spojené s hypersplenismem. Zjistil, že jak u akutních tak i chronických případů

ITP jsou megakaryocyty zmnoženy v porovnání s normálními nálezy (tj. méně než 300 megakarocytů na milion jaderných buněk v normální kostní dřeni, 366-743 v případě akutní ITP a 450-1565 v případě chronické ITP), jsou více zastoupeny mladší formy megakaryocytů se sníženou plochitou jádra, a dokonce již tehdy byly popsány změny detekovatelné světelnou mikroskopií, které signalizovaly změny degenerativní, resp. spojené s poruchou tvorby trombocytů. Tyto nálezy byly ověřeny o desítky let později elektronovou mikroskopií (13). K těmto změnám patří jaderná fragmentace a kondenzace chromatinu při obvodu jádra jako výraz apoptózy resp. cytoplazmatická vakuolizace, nabobtnalé mitochondrie, dilatace endoplazmatického retikula a dilatace demarkačního membránového systému jako výraz para-apoptózy. Je také patrná silná periferní zóna cytoplazmy bez cytoplazmatických organel resp. vymizelá či vysoce nepravidelná granulace cytoplazmy (12, 13). Nicméně již velmi časná pozorování poukázaly na skutečnost, že zmnožení megakaryocytů nemusí provázet všechny případy ITP resp. že zmnožení nemusí být významné (14), byť i zde jsou popsány formy degenerativní s vakuolizovanou cytoplazmou. To zřejmě souvisí s nálezy, které potvrzují supresi normální megakaryopoézy anti-trombocytárními protilátkami (15-17) jako jedním z řady mechanismů, které se uplatňují u ITP (18).

V případě akutní ITP dětského věku může být vyvolávající příčinou infekce parvovirem B19 (19), i když tato infekce vyvolává častěji přechodnou čistou aplázi erytropoézy vzácněji i neutropenii. Je-li postižena současně i erytropoéza, mohou být přítomny extrémně velké proerythroblasty s chyběním zralejších stádií a v erytroidních prekurzorech jsou přítomny PAS pozitivní inkluze; v těchto případech může být také počet megakarocytů snížen (19).

Potvrzení imunitní trombocytopenie navozené anti-fosfolipidovými protilátkami (APA) či trombocytopenie heparinem indukované (HIT) vyžaduje obvykle jiné diagnostické postupy, nežli je vyšetření kostní dřene. V prvním případě může být event. cytomorfologický nálezy modifikován dle skutečnosti, zda jde o primární výskyt APA – asociované trombocytopenie či indukovaný jiným systémovým onemocněním (viz ještě dále). U HIT jde o klasickou periferní spotřebu trombocytů a vzácně indikované vyšetření kostní dřene by mohlo být modifikováno jen možným doprovodným onemocněním.

Každopádně existují studie, které prokázaly, že tři erudovaní hematopatologové nebyli schopni bez znalosti vstupních informací odlišit nálezy kostní dřene nemocných s ITP od zcela normálních nálezů (20).

Perniciózní anémie

I když hovoříme o anémii, protože erytropoéza bývá u tohoto stavu postihovaná nejvíce, jde v zásadě o periferní pancytopenii navozenou skupinou autoprotilátek interferujících s metabolismem vitamínu B₁₂ na různých úrovních jeho resorpce. V kostní dřeni je přítomna nejčastěji typická megaloblastová přestavba postihující všechny hemopoetické řady, s dominujícím zmnožením erytropoézy často s posunem k méně zralým formám („modrá dřev“). Nicméně je nutné v této souvislosti upozornit, že se v kostní dřeni mohou objevit nejružnější známky myelodysplázie a že stanovení hladiny vitamínu B₁₂ v séru nemusí odrážet jeho zásoby v organismu. Z tohoto pohledu někteří autoři (21) navrhuji u každé myelodysplázie provázené být jen částečnou megaloblastovou přestavbou terapeutický pokus k zabránění nesprávné diagnózy. Na druhé straně ne všichni nemocní s podezřením na tuto chorobu musí nezbytně vyšetření dřene absolvovat. U nemocných s makrocytární anémií, provázených anizocytózou, makro-ovalocytózou, hypersegmentací neutrofilů v periferní krvi a prokázaným deficitem vitamínu B₁₂ případně i protilátkami proti vnitřnímu faktoru (nálezy protilátek proti parietálním buňkám je málo specifický) a zachycenou retikulocytární krizí 4-6 den po zahájení substituční parenterální léčby se považuje za dostatečný průkaz nemoci, zejména je-li diagnóza podpořena nálezem atrofické gastritidy (22).

NÁLEZY V KOSTNÍ DŘENI U SYSTÉMOVÝCH AUTOIMUNITNÍCH CHOROB

Autoimunita a myelodysplázie

Vztahy mezi autoimunitními chorobami, myelodysplázií resp. myelodysplastickým syndromem (MDS) jsou extrémně komplikované. Na jedné straně je porucha imunity bezpochyby důležitým momentem v patofyziologii MDS (23) a na druhé straně jsou autoimunitní projevy nezanedbatelnou součástí klinické manifestace těchto nemocných (24). Nicméně cytomorfologický nálezy myelodysplázie není vzácný ani u jasně vyhraněných autoimunitních chorob, například systémových onemocnění pojiva, zejména u systémového lupus erythematosus (SLE), resp. i u revmatoidní artritidy (8). Tyto změny mohou být přechodné, kolísat s tíží choroby (25). Dysplázie postihuje všechny hemopoetické řady včetně megaloblastoidie, vícejaderných prekurzorů a prstenčitých sideroblastů v erytropoéze (8, 25), pseudo-pelgeroidních či prstenčitých jader v granulopoéze a multinukleárních forem či mikromegakaryocytů v řadě megakaryocytární (25). Je-li periferní cytopenie významná, jsou dysplastické změny detekovány

u většiny nemocných (25). Znamky dysplázie byly u SLE detekovány i v histologických nálezech včetně průkazu ALIP fenoménu (26).

Situace je o to komplikovanější, že autoimunitní choroby jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku skutečného MDS (27) (OR 1,5), resp. i akutní myeloidní leukémie (AML) (OR 1,29). Ve velké epidemiologické studii (27), která srovnávala 13 486 pacientů s myeloidními malignitami s 160 086 kontrolami, byl rozvoj AML spojen s revmatoidní artritidou, SLE, revmatickou polymyalgií autoimunitní hemolytickou anémií, systémovou vaskulitidou, ulcerózní kolitidou a perniciózní anémií a rozvoj MDS rovněž s revmatickou artritidou a perniciózní anémií. Z tohoto pohledu může být vyhodnocení nálezu dysplastických změn v kostní dřeni u nemocného s jasně rozvinutým autoimunitním onemocněním nesmírně komplikované a z jednorázového a nakonec i opakovaného cytomorfoloického posouzení dřevného aspirátu nelze většinou stanovit definitivně, zda jde o přechodnou dysplázií navozenou systémovým onemocněním, či již skutečný vývoj klonální hematologické myeloproliferativní choroby. Napomoci může nejspíše cytogenetický či molekulárně-genetický nálezu (2, 24) a to zejména u incipientních stavů.

Mnohem méně často je periferní cytopenie u systémových chorob zapříčiněna útlumem myeloidní řady, nejčastěji je zmiňována čistá aplázie kostní dřev (PRCA) (28).

Autoimunitní projevy a lymfoproliferativní stavy

Přestože vztahy mezi autoimunitními chorobami a nádorovými chorobami lymfatického systému jsou neméně dobře známy, neméně dobře dokumentovány a neméně komplikované (29), jak je tomu ve vztahu k postižení myelopoézy u poruch imunity, je čistě cytomorfoloické vyhodnocení nálezu kostní dřev ještě méně diagnosticky resp. diferenciálně diagnosticky přínosné, nežli je tomu v přechodných případech. Důvodem je, že ke stanovení definitivní diagnózy lymfoproliferativního onemocnění prakticky vždy potřebujeme ověření mikroskopicky detekovaných změn dalšími diagnostickými metodami. Nicméně je na místě zmínit, že autoimunitní projevy, z nich nejčastěji autoimunitní hemolytická anémie, jsou poměrně častou komplikací lymfoproliferací ze zralých B lymfocytů, dominantně u chronické lymfatické leukémie. PRCA a ITP jsou méně časté (29). Tyto paraneoplastické stavy mohou být první známkou choroby, resp. její klinickou či laboratorní diagnózu i leta předcházet (29). Na druhé straně sama přítomnost některých autoimunitních stavů zvyšuje riziko vývoje lymfoproliferativních onemocnění – zde je diskutován zejména Sjögrenův syndrom,

SLE, autoimunitní hemolytické anémie, méně jasně revmatická artritida v případech B buněčných neoplázií, resp. celiakie a psoriáza v případech T buněčných (30, 31). V některých případech může hrát nezanedbatelnou roli léčebné postupy, které jsou v řešení autoimunitních chorob využívány (viz ještě dále).

Jiné ovlivnění kostní dřevě u autoimunitních chorob

U všech chronicky probíhajících zánětlivých stavů je teoreticky možné nalézt cyto-morfoloické známky anémií chronických onemocnění tj. porucha barvitelnosti cytoplazmy erytroidních prekurzorů resp. porucha hemoglobinizace, při barvení na železo je detekován snížený počet sideroblastů se zmnožením železa v siderofázích. Jiným možným obrazem jsou změny reaktivní – zmnožení plazmocytů, makrofágů, nežřídka jejich nakupení ve shlucích. Vzácně, zejména u SLE či Stillovy choroby, může nadprodukce pro-inflamatorních cytokinů, nekontrolovaná aktivace T buněk a makrofágů vyústit až do obrazu s chorobou asociovaného hemofagocytárního syndromu (32). Některé stavy, jako je SLE, autoimunitní thyreoiditis či eozinofilní fasciitida jsou uváděny jako možná příčina získané aplastické anémie (8).

NÁLEZY V KOSTNÍ DŘENI VZNIKAJÍCÍ V DŮSLEDKU LÉČBY AUTOIMUNITNÍCH CHOROB

Léčebné postupy, které jsou užívány ke kontrole autoimunitních stavů, mohou nežřídka zasahovat do procesů krvetvorby. Myelosupresivní vliv je popisován u naprosté většiny imunosupresiv jako na dávce závislá toxicita, výjimku tvoří jen kortikosteroidy a hydroxychloroquin (33). U řady léků se mohou objevit známky myelodysplázie; oba tyto nálezy jsou nejčastěji přechodné a mizí s redukcí dávky či s vysazením léku. Bohužel, některé léčebné postupy, které jsou v těchto indikacích využívány, jsou spojeny s možnou indukci skutečného klonálního postižení hemopoetického systému, mohou tedy vést ke vzniku nádorového hematologického onemocnění, nejčastěji k lymfoproliferaci.

Kortikosteroidy

Podávání kortikosteroidů je spojeno s periferní granulocytózu resp. neutrofilii, která jeví jistou dávkovou závislost, i když je možné i individuální či vlastní chorobou dané kvantitativní nastavení. Nejvýznamnější vliv na takto vznikající navýšení periferních neutrofilů má jejich uvolnění z tzv. cévního marginálního poolu, tedy ve skutečnosti zrušení „rolování“ polymorfonukleárních na endotelu (61% navýšení). Dále se uplatňuje

zpoždění tkáňové migrace a přirozené apoptózy (29%). Pouze 10% periferních neutrofilů vzniká zvýšeným uvolněním z kostní dřeně, což může být provázeno nálezem tyčí v periferním rozpočtu (34). Nicméně na animálních modelech bylo prokázáno, že chronické navýšení glukokortikoidů zvyšuje jak relativní tak absolutní počet granulocytů ve všech stádiích jejich vývoje, což je provázeno redukcí počtu lymfocytů (35). To je v souladu s nálezem obvykle vídané zmnožené neutrofilní granulopoézy s relativní lymfopenií, nezřídka doprovázené spíše reaktivními změnami neutrofilů, jako jsou vakuolizace a toxická granulace. Tyto nálezy jsou běžně vídány u nemocných léčených vyššími dávkami kortikosteroidů.

Další imunosupresivní léky

U autoimunitních stavů jsou využívány především antiproliferační látky (methotrexát, azathioprin, mykofenolát mofetil, cyklofosfamid), případně kalcineurinové inhibitory (cyklosporin A, takrolimus), zatímco mTOR inhibitory (sirolimus, everolimus) zůstávají vyhrazeny k potlačení imunity u potransplantačních stavů. Jak již bylo uvedeno dříve, za jistých okolností může kterýkoli z těchto vyvolat dřevňový útlum, který jeví dávkovou závislost (cave kumulace dávky např. u akutní renální insuficience u léků s renální exkrecí). Je-li vyšetření kostní dřeně provedeno krátce po vzniku epizody těžké periferní cytopenie resp. pancytopenie, je v důsledku časně dřevňové regenerace patrný posun k nezralým formám a nález může být špatně interpretován jako porucha vyzrávání (8). Některé z používaných imunosupresiv vedou v důsledku svého účinku ke vzniku megaloblastoidní přestavby, resp. nejméně k megaloblastoidním změnám; k těmto léčivům patří methotrexát, cyklofosfamid a azathioprin (8). Zatímco methotrexát jako klasický antagonist folátů vede k typické megaloblastové přestavbě, megaloblastoidie indukovaná cyklofosfamidem a azathioprinem je méně nápadná, chybí nebo se objevují jen vzácně hypersegmentované neutrofilie a velké tyče a metamyelocyty, zatímco jiné dyserythropoetické změny jsou zřetelné. Podle dávky léku je megaloblastoidie spojena s erytroidní hyperplázií či hypoplázií. U mykofenolátu mofetilu a tacrolimu jsou popisovány změny granulocytů, jako jsou získaná pseudo-Pelger-Huětova anomálie, abnormální shlukování jaderného chromatinu a izolované jaderné fragmenty v cytoplasmě (8, 21). V případě mykofenolátu jsou navíc vzácně popisovány případy lékem indukované PRCA (36).

Anti-imunitní protilátky

V poslední době je použití těchto postupů stále častější u řady imunitně podmíněných stavů. Může

jít o použití i.v. imunoglobulinů, protilátek proti B-lymfocytům (anti-CD20), proti T-lymfocytům (nejčastěji alemtuzumab antiCD52) resp. protilátky proti TNF. Z těchto zejména antiCD-20 monoklonální protilátky mohou vést k dřevňovému útlumu provázenému agranulocytózou a trombocytopenií (7), při alemtuzumabu je dřevňová hypoplazie provázená i dysplázií a při zvýšené incidenci či reaktivaci virových infekcí se může objevit EBV-indukovaný hemofagocytární syndrom (8).

Imunosupresiva a hematologické malignity

V důsledku zavedení imunosupresivní léčby je nutno počítat s potlačením i protinádorové imunity, a proto není překvapením, že tyto léčiva jsou spojena s vyšší incidencí nádorů včetně hematologických. WHO klasifikace tumorů z hemopoetických a lymfatických tkání z roku 2008 v kapitole lymfoproliferativní choroby spojené i imunodeficiencí vyčleňuje imunosupresiva, která jsou spojena se vznikem lymfomů (37); k těmto patří methotrexát a antagonisty TNF - infliximab, adalimumab a etanercept. Methotrexát je spojen s incidencí difusního velkobuněčného B-lymfocytgárního lymfomu, Hodgkinova lymfomu, periferního T-buněčného lymfomu či s jinou lymfoproliferací, u antagonistů TNF je situace méně vyhraněná s výjimkou infliximabu. Tento je jako jediný popisován v předchorobí vzácného hepatosplenického T-buněčného lymfomu, který nebyl zjištěn u jiných imunosupresivních léčiv. Jistá souvislost s ovlivněním hematologických klonálních expanzí (MDS, NHL) je zmiňována i v souvislosti s cyklosporinem A.

ZÁVĚR

Autoimunitní choroby a/nebo jejich léčba komplikovaným způsobem zasahují do normálních procesů krvetvorby, což velmi variantním způsobem může ovlivnit nejen parametry krevního obrazu, ale i nálezy detekované při vyšetření aspirační biopsie kostní dřeně. Z tohoto pohledu je pro tento typ hematologického vyšetření naprosto zásadní informace, že takovouto chorobou pacient trpí a jaké léky jsou mu podávány. Bez těchto údajů může být rutinní posouzení myelogramu zavádějící a nemusí být prospěšné pro správnou diagnózu. Navíc se znalostí příčinných souvislostí může kostní dřevň posuzující hematolog soustředit svou pozornost na event. skutečné hematologické komplikace, jež mohou být vyvolávajícím onemocněním či jeho léčbou indukované, i když v některých případech je nezbytná konfirmace cytomorfoloického nálezu jinými diagnostickými metodami.

LITERATURA

- Jubelirer SJ, Harpold R. The role of the bone marrow examination in the diagnosis immune thrombocytopenic purpura: case series and literature review. *Clin Appl Thromb/Hemost* 2002; 73-76
- Neunert C, Lim W, Crowther M, et al. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. Doi: 10.1182/blood.2010-08-302984
- Valent P. Low blood counts: immune mediated, idiopathic, or myelodysplasia. *Hematology* 2012; 485-491
- Boxer LA. How to approach neutropenia. *Hematology* 2012; 174-182
- Gibson CH, Berliner N. How we evaluate and treat neutropenia in adults. *Blood* 2014; 124: 1251-1258
- Newburger PE, Dale DC. Evaluation and management of patients with isolated neutropenia. *Seminars in Hematology* 2013; 198-206
- Farhi DC, Chai CCh, Edelman AS, Parveen T, Thi Vo T-L (Eds). *Pathology of bone marrow and blood cells*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2004; pp 368
- Bain M, Clark D, Wilkins B. *Bone marrow pathology 4th edition*. Wiley-Blackwell, Oxford 2010; pp: 630
- Cramer SL, Garcia I, Massé J-M, et al. Erythroblastic synartesis: an auto-immune dyserythropoiesis. *Blood* 1999; 94: 3683-3693
- Kawai N, Matsuda A, Jinnai I, et al. Proposal of criteria for dyserythropoiesis in the diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 2016; 103: 227-233
- Mak YK, Yu PH, Chan CH, Chu YC. The management of isolated thrombocytopenia in Chinese adults: does bone marrow examination have a role at presentation. *Clin Lab Haem* 2000; 22: 355-358
- Dameshek W, Miller EB. The megakaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura, a form of hypersplenism. *Blood* 1946; 1: 27-50
- Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JLL, et al. Ultrastructural study shown morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004; 500-506
- Diggs LW, Hewlett JS. A study of the bone marrow from thirty-six patients with idiopathic hemorrhagic (thrombopenic) purpura. *Blood* 1948; 3: 1090-1104
- Chang M, Nakagawa PA, Williams SA, et al. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 2003; 102: 887-895
- McMillian R, Wand L, Tomer A, et al. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood* 2004; 103: 1364-1369
- McMillian R, Nugent D. The effect of antiplatelet autoantibodies on megakaryocytopoiesis. *Int J Hematol* 2005; 81: 94-99
- Kistanguri G, McCrae KR. Immune thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2013; 27: 495-520
- Heegaard ED, Rosthor S, Peterson BL, et al. Role of parvovirus B19 in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Paediatr* 199; 88: 614-617
- Mahabir VK, Ross C, Popovic S, et al. A blinded study of bone marrow examination in patients with primary immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2013; 90: 121-126
- Bain B. Non-clonal myelodysplasia – when myelodysplasia not a myelodysplastic syndrome? Diagnostic work-up of haematological malignancies. Focus on myelodysplastic syndrome. Prague, Czech Republic – November 11-12, 2011, pp14
- Buliková, A, Kissová J. Anemie v praxi. *Interní medicína pro praxi.* 2011; 13: 31-34
- Barret JA, Sloand E. Autoimmune mechanisms in the pathophysiology of myelodysplastic syndromes and their clinical relevance. *Hematologica* 2009; 94: 449-451
- Braun T, Fenaus P. Myelodysplastic syndromes (MDS) and autoimmune disorders (AD): Cause or consequence? *Best Pract Research Clin Hematol.* 2013; 26: 327-336
- Oka Y, Kameoka J, Hirabayashi Y, et al. Reversible bone marrow dysplasia in patients with systemic lupus erythematosus. *Inter Med* 2008; 47: 737-741
- Voulgarelis M, Giannouli S, Tasidou A, et al. Bone marrow histological findings in systemic lupus erythematosus with hematologic abnormalities: A clinicopathological study.
- Anderson LA, Pfeifer RM, Langren O, et al. Risk of myeloid malignancies in patients with autoimmune conditions. *B J Cancer* 2009; 100: 822-828
- Gupta RK, Ezeonyeji AN, Thomas AS, et al. A case of pure red cell aplasia and immune thrombocytopenia complicating systemic lupus erythematosus: response to rituximab and cyclophosphamide. *Lupus* 2011; 20: 1547-1550
- Autoimmunity and malignancy in hematology – more than association. Stern M, Buser AS, Lohri A, et al. *Clin Rev Oncol/Hematol* 2007; 63: 100-110
- Zintzaras E, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. The risk of lymphoma development in autoimmune diseases. A meta-analysis. *Arch Intern Med* 2005; 165: 2337-2344
- Ekström Smedby K, Vajdič CM, Falster M, et al. Autoimmune disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes: a pooled analysis within the InterLymph consortium. *Blood* 2008; 111: 4029-4038
- Lambotte O, Khellad M, Harmouche H. et al. Characteristic and long-term outcome of 15 episodes of systemic erythematosus-associated hemophagocytic syndrome. *Medicine* 2006; 169-182
- Hsu DH, Katelaris CH. Long-term management of patients taking immunosuppressive drugs. *Aust Prescr* 2009; 32: 68-71
- Nakagawa M, Terashima T, D' yachkova Y, et al. Glucocorticoid induced granulocytosis. Contribution of marrow release and demargination of intravascular granulocytes. *Circulation* 1998; 98: 2307-2313
- Trottier MD, Newsted MM, King LE, Fraker PJ. Natural glucocorticoids induce expansion of all developmental stages of murine bone marrow granulocytes without inhibiting function. *PNAS* 2008; 105: 2028-2033
- Doherty T, Austin SK, Newell B, Kiely PDW. Mycophenolat mofetil-induced erythroid hypoplasia in a patient with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2013; 22: 213-215
- Gaulard P, Swerdlow SH, Jaffe ES, Sundtröm C. Other iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders. In Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al (Eds). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon 2008; 350-351

2993. MORFOLOGIE AKUTNÍCH MYELOIDNÍCH LEUKEMIÍ - NÁLEZY TYPICKÉ I MÉNĚ TYPICKÉ

Šimečková R. (ÚHKT, morfologicko-cytochemická laboratoř, Praha)

AML je klonální maligní onemocnění hematopoiezy charakterizované proliferací a hromaděním myeloidních blastů v kostní dřeni (KD), periferní krvi (PK) a v jiných tkáních. V současné době se morfologická diagnostika řídí pravidly WHO klasifikace tumorů z hematopoetické a lymfoidní tkáně, 4. verzí vydanou vydanou v roce 2008, která kromě morfologie zohledňuje i nález imunofenotypizační, molekulárně genetický a cytogenetický.

Pro cytologickou diagnostiku je nutné vyšetření kompletního krevního obrazu, mikroskopické zhodnocení nátěru periferní krve a vyšetření aspirátu kostní dřene doplněné cytochemickým vyšetřením. Podmínkou diagnózy AML je přítomnost více než 20% myeloidních blastů v KD (hodnotíme 500 buněk) nebo v PK (hodnotíme 200 buněk). Tento počet může být i nižší, pokud je přítomna příslušná cytogenetická či molekulárně-genetická odchylka. Pokud je v kostní dřeni zastoupení erytropoezy vyšší než 50%, hodnotí se počet blastů z non-erytroidní složky (nepočítají se prekurzory červené řady, lymfoidní a plazmatické buňky, makrofágy a mastocyty). Stále je velmi rozšířené užívání FAB klasifikace, původně vydané v roce 1976, opakovaně doplněné a revidované. Ve FAB klasifikaci je pro diagnózu AML podmínkou 30% blastů (původně počítáno z non-erytroidní složky).

K myeloidním blastům řadíme za prvé **myeloblasty**, což jsou různě velké buňky, s různě vysokým nukleo/cytoplazmatickým poměrem. Mají obvykle oválné či kulaté jádro s jemně zrnitým chromatinem s jedním i více jadérky a s různě prostornou světle bazofilní cytoplazmou bez granul - tzv. agranulární blasty či s různým počtem azurofilních granul či s Auerovými tyčemi - tzv. granulární blasty. Tyto granulární blasty je nutné odlišit od zralějších forem - promyelocytů, od kterých se liší chyběním perinukleárního projasnění v oblasti Golgiho zóny. V cytochemickém barvení mohou být tyto blasty negativní, či jsou různě intenzivně granulárně pozitivní na myeloperoxidázu (MPO nebo v MPO jsou zřetelné Auerovy tyče (i vícečetně)). Druhým typem blastů jsou **monoblasty**, to jsou poměrně velké buňky s prostornější, světle šedou až sytější bazofilní cytoplazmou, někdy s drobnými protruzemi v kontuře či s jemnou vakuolizací, ojediněle s jemnou azurofilní granulací. Jádro je obvykle kulaté s jedním či dvěma výraznějšími jadérky. V cytochemickém barvení jsou

silně pozitivní na nespecifické esterázy - alfa-naftyl-butyrát-esterázu (ANBE) či alfa-naftyl-acetát-esterázu (ANAE), tyto reakce se dají v monocytární řadě zablokovat přidáním fluoridu sodného (NaF). V MPO jsou většinou negativní. **Promonocyty** jsou další blastické buňky často s nepravidelnými jádry, ledvinovitými či stočenými, s jemným chromatinem, jádérko je jen naznačené či chybí, cytoplazma je jemně granulární. Důležité je odlišit promonocyty a atypické monocyty, které se do blastické populace nepočítají. Atypické monocyty mají více kondenzovaný chromatin, jádra jsou tvarově více variabilní, cytoplazma je více šedá s početnější více fialově se barvící granulací. V cytochemickém barvení oba typy dávají pozitivitu v ANBE či ANAE, v MPO jsou obvykle slabě granulárně pozitivní nebo negativní. **Megakaryoblasty také řadíme do blastických buněk**, jsou to obvykle středně velké elementy s kulatým jádrem, s jemným síťovitým chromatinem, s jedním i více jadérky a sytější bazofilní cytoplazmou, která často vybíhá v drobné pupence (blebs). V cytochemickém barvení jsou MPO negativní, mohou být pozitivní v periodic acid - Schiff reakci (PAS) a v kyselém fosfatáze. V případě akutní promyelocytární leukemie (APL) jsou ekvivalentem blastů **leukemické promyelocyty**, což jsou velké či středně velké elementy s nepravidelným jádrem (ledvinovitým, laločnatým, přeloženým, či tvaru andělských křídel), chybí projasnění Golgiho zóny a patrná je výrazná růžová, červená či purpurová primární granulace, která často překrývá i konturu jádra. Typicky mohou být přítomny četné Auerovy tyče, obvykle silnější než u jiných AML, které jsou uspořádány do snopců. Takové buňky se označují jako faggot cells. V případě mikrogranulární formy jsou jádra často bilobární a cytoplazma může být až agranulární či je patrný jen jemný azurofilní prach, obvykle lze zachytit i typické hypergranulární elementy. V případě variantních translokací se morfologie leukemických promyelocytů může lišit (např. kulaté buňky s výrazně políčkováným chromatinem bez jadérka). V cytochemickém barvení je MPO výrazně pozitivní, výrazně pozitivní je i naftol-AS-D-chloracetát-esteráza (NACE). NACE je specifická esteráza, která je přítomna v primárních i sekundárních granulech neutrofilních granulocytů.

Ve WHO klasifikaci 2008, verzi 4 jsou AML a příbuzné myeloidní neoplazie rozděleny do několika skupin: **AML s rekurentní genetickou abnormalitou AML s t(8;21)(q22;q22); RUNX-RUNX1T1**

Cytologicky jsou obvykle patrné poměrně velké blasty, často granulární, či s dlouhými štíhlými Auerovými tyčemi, dále jsou přítomna pseudo-Chediak-Higashiho

granula, jsou zřejmé dysplastické rysy granulopoezy a může být eosinofilie, ale bez známek dysplazie.

AML s inv(16)(p13;q22) nebo t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11

Cytologicky jde obvykle o myelomonocytární leukemii s morfologicky abnormálními eozinofily (větší purpurově-fialová granula v mladších stádiích, hyposegmentace jader zralých forem, pozitivita NACE, která je v normálních eozinofilech negativní).

Akutní promyelocytární leukemie s t(15;17)(q22;q12); PML-RARA, a variantní traslokace

Cytologicky lze u PML/RARA varianty rozlišit formu hypergranulární často spojenou s pancytopenií a formu mikrogranulární (popis viz výše).

AML s t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL

Cytologicky jde často o monocytární či myelomonocytární leukemii, časté je extramedulární postižení.

AML s t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214

Cytologicky je nejčastější myelomonocytární AML, častá je bazofilie a dysplastické změny.

AML s inv(3)(q21q26.2), nebo t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVII

V krevním obraze je často normální, ale i vyšší počet trombocytů, jsou přítomny pseudopelgeroidní formy neutrofilů, velké hypogranulární trombocyty. Megakaryocyty jsou malé monolobární či bilobární, mohou být patrné dysplastické rysy granulopoezy i erytropoezy, jsou zmnoženy eozinofily, bazofily či mastocyty.

AML (megakaryoblastická) s t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1

Cytologicky má charakter megakaryoblastové leukemie. Megakaryoblasty (viz popis výše). Megakaryocyty jsou různě velké, přítomny jsou rovněž mikroformy, dysplastické rysy ostatních řad obvykle nejsou patrné.

AML s mutovaným NPM1 (provizorní jednotka)

AML s mutovaným CEBPA (provizorní jednotka)

AML spojená s myelodysplazií

- vzniká vývojem z MDS či MDS/MPN, a/nebo
- je provázená cytogenetickou abnormitou typickou pro MDS či MDS/MPN, a/nebo
- je prokázána multilineární dysplazie

Cytologicky jsou patrné dysplastické rysy, které jsou přítomny alespoň v 50% buněk jednotlivých linií a postihují alespoň dvě buněčné linie hematopoezy. Dysgranulopoeza je charakterizovaná hyposegmentací či atypickou segmentací jader, tvarovými atypiiemi jader, hypogranularitou, ale i jinými odchylkami, které nacházíme u myelodysplastického syndromu. Dyserytropeza je charakterizovaná megaloidními změnami, atypickými tvary jader, karyohexií, frag-

mentací jader či vícejaderností, dále přítomností prstenčitých sideroblastů v cytochemickém vyšetření železa či PAS pozitivitou erytroblastů. Jako dysplastické megakaryocyty označujeme hypolobulizované, monolobární či multinukleární formy a mikroformy.

Myeloidní neoplazie spojené s léčbou

Cytologicky jsou obvykle patrné dysplastické rysy všech řad, ale mohou mít charakter i jiných morfologických typů AML, nejčastěji se jedná o akutní monocytovou leukemii.

AML jinak neurčené

AML s minimální diferenciací

Méně než 3% blastů je MPO či Sudan black B (SBB) pozitivní, nespecifické esterázy jsou negativní. Blasty jsou středně velké s jemným, někdy i více kondenzovaným chromatinem, který může mít charakter až lymfoblastu, patrná jsou 1-2 jádérka a cytoplazma je agranulární, bez Auerových tyčí.

AML bez vyvrávání

Více než 3% blastů je MPO či SBB pozitivní a blasty tvoří více než 90% z non-erytroidních buněk. Blasty jsou granulární i agranulární, mohou být přítomny Auerovy tyče.

AML s vyvráváním

Alespoň 20% blastů v KD či PK, více než 10% zrající granulopoezy a méně než 20% monocytární komponenty.

Akutní myelomonocytární leukemie

Alespoň 20% blastů (myeloblasty, monoblasty, promonocyty), alespoň 20% vyvrávající granulopoezy a alespoň 20% monocytární komponenty včetně jejich prekurzorů. Diagnostické je i zastoupení monocytů v PK, alespoň $5 \times 10^9/l$. Cytochemicky je více než 3% blastů pozitivních v MPO, pozitivita ANBE, ANAE s blokáci NaF, případně doplněné barvení NACE.

Akutní monoblastická a monocytární leukemie

Alespoň 80% tvoří monocytární komponenta (monoblasty, promonocyty, monocyty), v případě akutní monoblastové leukemie monoblasty tvoří více než 80% monocytární komponenty. V cytochemii může být MPO negativní či jen rozptýleně pozitivní, typicky pozitivní jsou ANBE, ANAE blokovatelné NaF, ale i tato typická pozitivita nespecifických esteráz může být v některých případech negativní.

Akutní erytroidní leukemie

Cytologicky rozlišujeme dva typy - erytroid/myeloidní, kde je alespoň 50% erytroidních prekurzorů a alespoň 20% myeloblastů z non-erytroidní složky, erytropeza má dysplastické rysy a v blastech mohou být Auerovy tyče. A druhý typ - čistě erytroidní, kde erytroidní prekurzory tvoří alespoň 80% a převažují

nezralé erytroidní prekurzory. V cytochemii maligní proerytroblasty dávají blokovou pozitivitu v PAS reakci a ložiskovitou v ANAE zralejší formy jsou difuzně pozitivní a blasty bývají MPO pozitivní včetně Auerových tyčí. V barvení na železo prokazujeme dyserythropoezu včetně přítomnosti prstenčitých sideroblastů, což neplatí u čisté erytroidní formy s vysokým zastoupením nezralých proerytroblastů.

Autní megakaryoblastická leukemie

Blasty náleží do megakaryocytární linie (viz popis výše), často je tento typ spojen s pancytopenií a fibrózou - suchá punkce. Zralejší formy mají dysplastické rysy. V cytochemii jsou MPO, SBB a CAE negativní, může být pozitivita PAS, kyselá fosfatáza a nespecifických esteráz.

Akutní bazofilní leukemie

Obvykle nacházíme středně velké blasty, které mají oválná i bilobární jádra, prominující jádérka, bazofilní cytoplazma může obsahovat bazofilní granula či může být vakuolizovaná, blasty jsou MPO negativní, pozitivní jsou v barvení toluidinovou modří.

Akutní panmyelóza s myelofibrózou

Častá je pancytopenie, zmnožení blastů, fibróza a obvykle suchá punkce, proto je nutné histologické vyšetření.

Myeloidní sarkom

Nejčastěji je postižena kůže, lymfatické uzliny, trávící trakt, měkké tkáně, varlata. Je tvořen myeloblasty s - nebo bez známek vyzrání, také může mít charakter myelomonocytární, monoblastový či monocytární. Vzácně může být tvořen z erytroidních prekurzorů nebo megakaryoblastů nebo je přítomna nezralá trilineární hematopoeza.

Myeloidní proliferace spojená s Downovým syndromem

U pacientů s Downovým syndromem (DS) je výrazně vyšší riziko vzniku leukemie.

Až 10% novorozenců s DS postihuje tzv. transientní abnormální myelopoeza (TAM), kdy je nález neodlišitelný od AML. Ve většině případů dochází ke spontánní remisi, ale u 20-30% takto postižených dětí se během 1-3 let vyvine skutečná leukemie, často má megakaryoblastový charakter.

Neoplazie z blastických plazmocytoidních dendritických buněk

Blasty bývají středně velké, místy s nepravidelným jádrem, s jemným chromatinem, s jedním i více jádérky, cytoplazma je méně objemná, místy, kolem jádra drobně vakuolizovaná. Typické je kožní postižení, lymfadenopatie a negativní cytochemie. Pro stanovení diagnózy je zásadní imunofenotypizační vyšetření a imunohistochemie.

POUŽITÁ LITERATURA:

WHO Clasifikatíon of Tumours of Haematopoetic and Lymphoid Tissues, 4th Edition, 2008

Barbara J. Bain, Leukaemia Diagnosis, 4th Edition, April 2010, Wiley-Blackwell

Barbara J. Bain, David M. Clark, Bridget S. Wilkins, Bone Marrow Pathology, 4th Edition, December 2009, Wiley-Blackwell

M. Penka, E. Tesařová a kol., Hematologie a transfuzní lékařství I, Grada 2011

2884. ÚLOHA MORFOLOGIE PŘI DIAGNOSTICE A MONITOROVÁNÍ CHRONICKÉ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE

Faber E., Juráňová J., Lapčíková A. (Hematologická klinika, FN a LF UP, Olomouc)

Morfologické posouzení preparátů nemocných, kteří přichází s podezřením na chronickou myeloidní leukemii (CML) nečiní zásadní problémy. V typických případech nenacházíme na elementech periferní krve ani v aspirátu kostní dřeni kvalitativní abnormality a podezření na diagnózu CML je vyslovováno na základě kvantitativních změn. Typická je leukocytóza s posunem doleva, s vyplavením elementů střední zralosti v kombinaci s basofilií případně eozinofilií. Obvykle dochází také k vyplavení malého počtu promyelocytů nebo blastů. V krevním obraze se medián leukocytů pohybuje kolem hodnoty $80 \times 10^9/l$, nicméně rozptyl hodnot bývá výrazný - od nízkých počtů do $20 \times 10^9/l$ až po hodnoty nad $600 \times 10^9/l$. Anémii lze pozorovat u necelé poloviny případů, většinou je normocytární a lehkého stupně. V periferní krvi se mohou nacházet i erytroblasty, jejich zastoupení však nebývá výrazné. Ve většině případů je přítomna trombocytémie, výjimečně s hodnotami přes $2000 \times 10^9/l$, počet trombocytů však může být normální a trombocytopenie diagnózu CML rozhodně nevylučuje. Aspirát kostní dřeni bývá v typických případech výrazně hypercelulární s dominancí granulopoézy a značnou redukcí erythropoézy. Poměr myeloidní a červené řady je vyšší než 10:1, obvykle 25:1 (1). Zastoupení megakaryocytů bývá variabilní. V kostní dřeni mohou být zastoupeny makrofágy a střídající buňky typu pseudo-Gaucherových buněk a modrých (sea-blue) histiocytů. Barvitelné železo v kostní dřeni je sníženo u většiny nemocných, což je důsledkem odlišné distribuce zásobního železa (2).

Diferenciálně diagnosticky je nezbytné vyloučit stavy vedoucí k leukemoidní reakci (zánětlivá onemocnění nebo infekce, většinou bakteriální etiologie). Pro tyto reaktivní změny je v nátěrech periferní krve typická přítomnost toxické granulace v neutrofilech, nebývá přítomna basofilie a eozinofilie. Dále je nezbytné vyloučit

	Numerická kritéria podle WHO	Numerická kritéria podle ELN
Akcelerovaná fáze		
Blasty v periferní krvi	10-19 %	15-29 % blastů nebo ≥ 30 % blastů a promyelocytů
Basofily v periferní krvi	≥ 20 %	≥ 20 %
Trombocyty	$< 100 \times 10^9/l$ nezávisle na léčbě nebo $> 1\,000 \times 10^9/l$ neovlivnitelných léčbou	$< 100 \times 10^9/l$ nezávisle na léčbě
Blastická fáze		
Blasty v periferní krvi nebo v kostní dřeni	≥ 20 %	≥ 30 %

další chronické myeloproliferativní stavy jako je pravá polycytémie, esenciální trombocytémie nebo výjimečně osteomyelofibróza. Další jednotky mající podobný morfologický i klinický obraz představují chronická myelomonocytární leukémie (CMMoL), atypická CML a chronická neutrofilní leukémie. V minulosti často používané cytochemické vyšetření alkalické fosfatázy v neutrofilech (snížené skóre u CML a naopak zvýšené např. u infekcí) bylo pro svou nedostatečnou specifitu opuštěno. Diagnózu CML standardně potvrzujeme cytogenetickým vyšetřením kostní dřeni s průkazem chromosomu Philadelphia (Ph), které lze v případě selhání kultivace nahradit fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH). Vždy je nezbytné provést molekulární vyšetření k průkazu leukemické fúze **BCR-ABL1** pomocí polymerázové řetězcové reakce s využitím reverzní transkriptázy (RT-PCR). Toto slouží jednak k potvrzení CML v případech negativity Ph chromosomu a jednak výjimečně k odlišení chronické neutrofilní leukémie (přítomna varianta μ -BCR s proteinem p230) nebo častěji k identifikaci varianty m-BCR s proteinem p-190, který se u CML vyskytuje výjimečně. Udává se, že tato varianta CML se v krevním obraze vyznačuje monocytózou, což může působit diferenciatně diagnostické rozpaky vůči CMMoL (3). Častěji se typ m-BCR vyskytuje u Ph-pozitivní akutní lymfoblastické leukémie (ALL), kde je popisován asi u dvou třetin pacientů. Odlišení blastického zvratu CML (s nímž se můžeme setkat u asi dvou procent pacientů i při diagnóze) od ALL může být složité, ne-li nemožné. Pro vzácně se vyskytující atypickou CML svědčí výrazné dysplastické změny v nátěru aspirátu kostní dřeni při splnění dalších kritérií pro diagnózu CML, ale za současné nepřítomnosti leukemického genu **BCR-ABL1**. Pozitivita **BCR-ABL1** odliší CML také od dalších vzácnějších neklasifikovatelných myeloproliferativních onemocnění nebo jednotek stojících na pomezí myeloproliferace a myelodysplazie (4).

Určení přesného podílu blastů a basofilů má zásadní význam pro určení fáze onemocnění, ale také pro správně provedený výpočet prognostických skóre (Sokal, EURO, EUTOS a ELTS). Provedením diferenciat

álního rozpočtu leukocytů periferní krve na 500 místo obvyklých 100 elementů klesá variační šíře (a možná chybovost) výsledku z ± 14 % na ± 6 % (5). Z tohoto důvodu je některými skupinami nebo v klinických studiích doporučeno provádět manuální diferenciatní rozpočet leukocytů v periferní krvi na vyšším počtu buněk. Na podíl blastů nezbytný ke stanovení diagnózy blastického zvratu, resp. akcelerace existuje rozdílný pohled skupin expertů WHO a ELN (4,6). Autoři WHO klasifikace doporučují používat jako kritérium pro stanovení diagnózy blastického zvratu hranici 20 % blastů (v nátěrech periferní krve nebo aspirátu kostní dřeni), která odpovídá WHO kritériím pro diagnostiku akutních leukémií. ELN experti ponechali ve svých doporučeních hodnotu 30 % (Tabulka). Důvodem bylo zjištění, že prognóza pacientů s podílem blastů v rozmezí 20-30 % ve dřeni nebo periferní krvi odpovídá akceleraci a nikoli blastickému zvratu (7). Z toho důvodu také není vhodné používat pro blastický zvrát CML termín „zvrát do akutní leukémie“.

Problém s diagnostikou CML může nastat v netypických případech – setkali jsme se s pacienty s normálními počty leukocytů v krevním obraze, lehkou basofilií a trombocytémií nebo dokonce trombocytopenií, u nichž metody klasické a molekulární genetiky potvrdily CML. Dalším problémem může být současný výskyt jiného hematologického onemocnění při diagnóze nebo jeho manifestace během léčby CML: anémie různé etiologie, dalšího myeloproliferativního onemocnění (s průkazem mutace V617F v genu JAK2), myelodysplastického syndromu nebo chronické lymfatické leukémie. K identifikaci dalšího onemocnění může dojít jak v situaci nedostatečné nebo naopak optimální odpovědi na léčbu. Ve všech případech pomůže k identifikaci problému pečlivé sledování pacienta a včasná identifikace známek nesouvisejících s CML nebo podávanou léčbou.

Závěr: stanovení diagnózy CML a její diferenciatní diagnostika nečiní potíže také proto, že se hematolog může opřít o robustní vyšetření cytogenetiky nebo molekulární biologie. O to více by měl morfolog věnovat

péči odlišení pokročilých fází CML nebo koexistujících onemocnění, jejichž nález může být překvapivý.

LITERATURA

1. Voglová J, Kašparová P, Vrbacký F. Klinický obraz, diagnostika a diferenciální diagnostika. In: Faber E, Indrák K. Chronická myeloidní leukémie. 1. vyd. Praha, Galén, 2010; 51-63.
2. Čermák J, Voglová J, Brabec V, et al. Red cell ferritin and iron stores in chronic granulocytic leukemia. Neoplasma 1994; 41: 217-220.
3. Melo JV, Myint H, Galton DA, Goldman JM. P190 BCR-ABL chronic myeloid leukemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukemia? Leukemia. 1994; 8: 208-211.
4. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. In: WHO classification of tumours. vol. 2. Geneva, World Health Organization, 2008.
5. Dacie JV, Lewis SM. Basic haematological techniques. In: Dacie JV, Lewis SM. Practical haematology. 6th ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1984; 22-49.
6. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. Blood 2013; 122: 872-884.
7. Cortes JE, Talpaz M, O'Brien S, et al. Staging of chronic myeloid leukemia in imatinib era. An evaluation of the World Health Organization proposal. 2006; 106: 1306-1315.

Práce byla podpořena grantem UP IGA_LF_2016_001.

2901. MOŽNOSTI HISTOLOGICKEJ DIAGNOSTIKY MEGALOBLASTOVEJ ANÉMIE A MYELOYDYSPLASTICKÉHO SYNDRÓMU TYPU REFRAKTÉRNEJ ANÉMIE V TREPANOBIOPTICKÝCH VZORKÁCH

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

Úvod: Megaloblastová anémia (MA) je podtyp makrocytovej anémie vznikajúci v dôsledku poruchy syntézy DNA. Najmiernejšie formy MA vedú len k vzniku makrocytózy bez sprievodnej anémie, ťažké formy až k vzniku súčasnej trombocytopenie a/alebo leukopénie.

Častými príčinami sú deficity folátu a/alebo vitamínu B12. Stanovenie diagnózy MA vo väčšine prípadov nepredstavuje závažnejší klinický problém, avšak je potrebné vylúčiť aj iné príčiny makrocytózy, vrátane myelodysplastického syndrómu (MDS). Materiál a metodika: V bioptickom registri sme v období 2004 - 2015 identifikovali trepanobiopsie kostnej drene (KD) 126 pacientov s údajom o cytopénii/ách v periférnej krvi a súčasne vysloveným podozrením na MA resp. na MDS typu refraktérnej anémie (RA). KD pacientov sme retrospektívne analyzovali so zameraním sa na hodnotenie: a/ celkovej bunečnatosti KD a proporcionality zastúpenia prekursorov, b/ topografických pomerov, c/ prítomnosť maturačných defektov a dysplastických zmien, d/ stupeň a rozsah myelofibrózy, e/ zásoby železitého pigmentu a zhodnotenie f/ prítomnosti „zápalovej“ reakcie v KD. Imunohistochemické vyšetrenia boli použité na podporu histologickej analýzy. Výsledky: Súbor tvorilo 126 pacientov (61 mužov a 65 žien), priemerný vek bol 63 rokov (14-88 rokov). Anemický syndróm bol prítomný takmer u všetkých pacientov (121/126). Pacientov sme rozdelili do troch podskupín - MA (31 pacientov), MDS-RA (39) a „DIF DG“ (56). Zmeny bunečnatosti KD sa vyskytli v 81% a narušenie topografických pomerov v 73% všetkých pacientov. Megaloblastovú predstavbu erythropoézy sme detekovali v 79% všetkých biopsií, diagnostické dysplázie sme pozorovali v 25% prípadov. Prstencové sideroblasty boli prítomné v 29% všetkých biopsií. Poruchy lobulizácie a denzity jadier megakaryocytov sa vyskytovali u 61% všetkých pacientov. V 14% všetkých biopsií bola stróma KD bez myelofibrózy, len v 5% vzoriek sa vyskytol stredne ťažký stupeň difúznej fibrózy. Stromálna „zápalová“ reakcia bola prítomná v 44% všetkých prípadov. Zásoby železitého pigmentu absentovali v 26%, resp. boli znížené v 35% všetkých biopsií. Zvýšené zásoby boli prítomné v 33% všetkých prípadov. Záver: Odlíšiť zmeny krvotvorby v bioptickom obraze KD pacientov s MA a MDS-RA je obtiažne a bioptické vyšetrenie umožňuje stanoviť jednoznačný záver v približne 55% prípadov. Zásadným problémom je rozhodnutie, či zmeny v KD sú alebo nie sú dôsledkom klonálneho ochorenia.

DÁRCOVSKÉ A LÉČEBNÉ AFERÉZY

2997. EXTRAKORPORÁLNÍ FOTOCHEMOTERAPIE

Gašová Z., Bhuiyan-Ludvíková Z., Bohmová M.
(Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

„Extrakorporální fotochemoterapie je postup, při němž se za pomoci techniky hemaferézy separují mononukleární buňky (MNC) pacienta. Buňky se poté ošetří fotosenzitivní látkou 8-methoxypsoralenem (8-MOP) v koncentraci 200 ng/ml. Takto upravené buňky se následně ozáří UV-A zářením o vlnové délce 320 až 400 nm v dávce 2 J/cm². Koncentrát MNC se poté transfunduje zpět do cirkulace pacienta.

Metoda je účinná v terapii onemocnění, na jejichž patogenezí se podílejí T lymfocyty, jako např. v terapii kožních lymfomů z T lymfocytů (CTCL) a v terapii akutní a chronické GVHD (aGVHD, cGVHD). ECP se také zavádí do terapie některých imunitních komplikací po orgánových transplantacích srdce, ledvin a plic.

Na účinnosti metody se podílí několik na sebe navazujících postupů: separace mononukleárních buněk a fotomodifikace za pomoci 8-methoxypsoralenu (8-MOP) a UVA- záření. 8-MOP patří do skupiny psoralenů, což jsou tricyklické aromatické sloučeniny, které se řadí mezi furokumariny a které vykazují výraznou absorpci UV-A záření. V buňkách se váží na DNA struktury, kde po ozáření UV-A dochází mezi bázemi DNA k vytvoření zkřížených vazeb. Tyto změny mají za následek inhibici syntézy DNA a tím inhibici proliferace buněk. Stupeň inhibice závisí na koncentraci psoralenu, vlnové délce a dávce UV-A záření a také na čistotě připravených buněk. Významnější příměs erytrocytů v přípravku může snížit účinnost ošetření buněk.

Přesný mechanismus účinku ECP nebyl doposud vysvětlen. Fotoferéza vyvolává v ošetřených buňkách změny na molekulární a buněčné úrovni, které u léčeného pacienta vyvolávají změny v imunitních reakcích.

V mechanismu ECP se předpokládá kombinace následujících jevů:

- 1 Fotodestrukce s následnou eliminací mononukleárních buněk, k níž dochází vlivem antiproliferačního účinku 8-MOP a UV-A záření.
- 2 Fotomodifikace dalších biomakromolekul, tj. proteinů a lipidů s ovlivněním funkcí imunitního systému. Vliv na imunitní systém se vysvětluje tím, že ke komunikaci mezi jednotlivými částmi imunitního systému dochází prostřednictvím interakcí mezi proteinovými strukturami.

3. Uvolnění cytokinů, jako TNF- α , IL-1, IL-6 a IL-8 z ozářených mononukleárních buněk.
4. Indukce apoptozy fotomodifikovaných mononukleárních buněk.
5. Vliv ECP na vlastnosti monocytů a dendritických buněk (antigen prezentujících buněk APC, DC).
6. Vliv zvýšené apoptozy lymfocytů a aktivace monocytů v dendritické buňky. Dendritické buňky (dále DC) následně fagocytují apoptotické lymfocyty a prezentují znaky fagocytovaných buněk na svém povrchu. DC jsou poté schopné aktivovat buď tvorbu regulačních T lymfocytů a tím navodit proces imunitolerance nebo naopak aktivovat imunitní systém se specifickou supresí patogenního klonu T lymfocytů. Těmito jevy by se mohl vysvětlit efekt fotochemoterapie v ovlivnění jak postransplantačních komplikací jako GVHD tak i v terapii nádorových onemocnění, např. kožních lymfomů z T lymfocytů.
7. Ovlivnění funkcí imunitního systému nemocného procesem imunomodulace.

Přesto, že se ECP provádí v mnoha transplantačních centrech, lze v jejich postupech nalézt značnou heterogenitu. V posledních letech je patrná velká snaha nalézt optimální postup pro účinné a bezpečné provádění ECP. Existují rozdíly ve skupinách pacientů, v technickém provedení výkonů, v indikacích k výkonům, v stanovení terapeutického režimu, v optimálním načasování zahájení a ukončení série postupů, v ověření účinnosti metody, v kontraindikacích postupů, v posuzování účinku ECP u pacientů a v kontrole účinnosti terapie in vitro (parametry koncentrátů mononukleárních buněk, účinnost fotomodifikace). ECP se obvykle provádí ve spolupráci klinických lékařů a lékařů na aferetických nebo transfuzních centrech. Některá pracoviště se zabývala zhodnocením stávajících postupů a formulací závěrů, které by měly pomoci v optimálním provádění ECP (např. Italská společnost pro hemaferézu a buněčnou manipulaci a Italská skupina pro transplantaci kostní dřeně, 2013).

Na základě stávajících zkušeností a výsledků lze uvést:

1. Techniky pro provádění ECP

Metoda extrakorporální fotochemoterapie se může provádět za pomoci techniky „in line“, tj. jednoho jednoúčelového zařízení pro separaci a fotomodifikaci buněk („all in one“) nebo za pomoci tzv. „off line“ techniky, která využívá dvě nezávislá zařízení jak pro separaci mononukleárních buněk (MNC) tak pro jejich

fotomodifikaci. Tento režim je méně nákladný a přípravek je málo kontaminovaný erytrocyty. Separátor může být využíván i pro jiné typy výkonů. Výhodou systému „in line“ je však značka CE, která zatím nebyla „off line“ režimu přiznána. Proto je při zavádění „off line“ techniky nutné předem provést standardizaci jednotlivých postupů: (i) vypracování optimálního režimu pro separace mononukleárních buněk, (ii) stanovení koncentrace 8-MOP v koncentrátech mononukleárních buněk, (iii) zajištění účinné ozařovací dávky a (iv) ověření účinnosti procesu za dodatečné kontroly reaktivity fotomodifikovaných lymfocytů pomocí funkčních testů (blastické transformace lymfocytů po stimulaci fytohemaglutininem, PHA) nebo stanovením apoptózy T lymfocytů. Pokles hodnot indukované proliferace lymfocytů na cca reziduálních 10% se považuje za dostatečný pro očekávaný efekt terapie.

2. ECP u pacientů s akutní a chronickou GVHD

V posledních letech stoupá počet alogenních transplantací kmenových krvetvorných buněk a současně také stoupá frekvence GVHD, která je příčinou významné morbiditativy a mortality nemocných. ECP je účinným a bezpečným postupem v terapii akutní a chronické GVHD u dětských i u dospělých pacientů, kteří jsou refrakterní na terapii kortikosteroidy a kalcineurinovými inhibitory. ECP má potenciál omezit dávku podávaných kortikosteroidů.

Předpokládá se, že u nemocných s chronickou GVHD může ECP ovlivnit autoimunitní projevy onemocnění doposud nevyjasněným mechanismem imunomodulace. ECP je pravděpodobně schopná navodit inaktivaci autoreaktivních klonů T lymfocytů a úpravu dysfunkce imunitního systému s potlačením manifestace onemocnění.

Výsledky ukazují zlepšení klinického stavu u nemocných především s postižením v kožní a hepatální lokalizaci a u dětí s oční formou onemocnění. U viscerálních forem onemocnění je účinnost méně patrná.

3. ECP je vhodnou metodou u pacientů, u nichž je další imunoprese nevhodná nebo kontraindikována.

Kortikosteroidy a jiné imunopresivní látky podávané v terapii GVHD jsou provázené vysokým rizikem mortality v důsledku infekčních komplikací. ECP nevyvolává generalizovanou imunopresi. V souvislosti s prováděním ECP nebyl pozorován zvýšený výskyt infekčních komplikací.

4. Příprava pacienta k separaci MNC

Před zahájením ECP se posuzuje způsobilost pacientů k separacím MNC. Hodnotí se žilní přístup,

klinický stav pacienta, případný výskyt HIT, známá intolerance citrátu nebo psoralenů, terapie ACE inhibitory, antiagregační nebo antikoagulační terapie, kardiopulmonální funkce (ekg, echokardiografie), funkce jater a ledvin, u febrilních pacientů hladiny prokalcitoninu, koagulační testy a hladiny elektrolytů. U pacientů s anamnézou HIT nelze použít k antikoagulaci separačního okruhu heparin. U pacientů na antiagregační terapii je třeba zajistit změnu na alternativní antikoagulační terapii. V těchto posledních dvou situacích je nutné použít k antikoagulaci pouze ACD-A. U plicních forem GVHD je třeba hodnotit respirační funkce.

Separace MNC pro ECP je bezpečným postupem s podobnou frekvencí nežádoucích reakcí jako separace PBPC (cca u 5% všech výkonů). Děti s hmotností nižší než 25 kg mají malý celkový objem krve. Separace mononukleárních buněk lze u nich bezpečně provést po předplnění separačního okruhu deleukotizovanými a ozařenými erytrocyty, jejichž hematokrit je upravený na požadovanou hodnotu (podle krevního obrazu pacienta a nařazení transfuzního přípravku v separačním okruhu). Nežádoucí reakce jsou mírné a přechodné.

5. Hematologické kontraindikace ECP

Je žádoucí, aby pacienti měli předseparační hodnotu hemoglobinu alespoň 80 g/l a počty trombocytů byly vyšší než 50×10^9 /l. Parametry červeného krevního obrazu pacienta lze upravit podáním transfuze erytrocytů. ECP se neprovádí, pokud je počet leukocytů nižší než 1×10^9 /l.

6. Nehematologické kontraindikace ECP

K nehematologickým kontraindikacím patří závažná kardiovaskulární nebo ledvinná onemocnění. Zvýšená teplota sama o sobě ještě nemusí být kontraindikací výkonu, avšak ECP se neprovádí u pacientů v septickém stavu, i když jsou afebrilní. Pacienti mohou být indikováni k výkonům až po zvládnutí infekce.

ZÁVĚR

Metoda ECP je alternativní, netoxický imunoterapeutický postup umožňující zlepšení kvality života nemocných při snížení rozsahu celkové nespecifické imunoprese.

Pro nemocné s c-GVHD a CTCL představuje jednu z mála možností potlačení autoimunitních projevů onemocnění a úpravu dysfunkce imunitního systému. Významná je též možnost omezení celkové nespecifické imunopresivní terapie pacientů se snížením výskytu závažných infekčních komplikací.

2910. DÁRCOVSTVÍ A ODBĚRY ALOGENNÍCH HEMOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK

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

Alogenní transplantace hemopoetických kmenových buněk představuje důležitou léčebnou modalitu v terapii řady hematologicko-onkologických onemocnění. V Evropských transplantacích centrech se ročně provede kolem 16 tisíc alogenních transplantací (EBMT survey 2013), v ČR přes 200 alogenních transplantací/rok (242 za rok 2014). Celosvětově se zvyšuje počet transplantací provedených s nepříbuznými dárci. Je také patrný trend častějšího využívání zahraničních nepříbuzných dárců, se kterými se provádí cca 50 % nepříbuzeneckých transplantací (WMDA report 2014). Nejčastějším zdrojem kmenových buněk pro transplantaci jsou periferní kmenové buňky (PBSC), které se aplikují ve zhruba 75 % případů.

Odběry PBSC pro účely alogenní transplantace se provádějí cca od roku 1999. Standardní mobilizační procedura obnáší 4-5 denní aplikaci růstového faktoru granulopoezy (G-CSF, filgrastim) v dávce cca 10 µg/kg/den. Maximální hladiny vyplavených CD34+ buněk je dosaženo v den +5, kdy se zpravidla provádí první aferéza. Obsah CD34+ buněk v aferézním produktu je určen především hladinou CD34+ buněk cirkulujících v periferní krvi dárce a také parametry aferézy. Neexistují bohužel spolehlivé parametry, které by umožnily predikovat kvalitu mobilizace u konkrétního dárce. Horší odpověď na filgrastim je možné pozorovat u starších dárců, naopak lepší mobilizovatelnost je popisována u dárců s vyšším body mass indexem.

Mobilizační efekt G-CSF je nepřímý. Molekula působí myeloidní aktivaci s uvolněním neutrofilních proteáz. Proteázy následně štěpí adhezivní vazby, které drží kmenové buňky v mikroprostředí kostní dřeně. Obvyklá dávka CD34+ buněk pro alogenní transplantaci se pohybuje mezi 3,0 až 5,0 x 10⁶/kg hmotnosti příjemce, za suboptimální se považují transplantáty s obsahem méně než 2,0 x 10⁶/kg. Ve výjimečných případech je možné zvážit při mobilizaci zdravého dárce i použití plerixaforu, který však není v této indikaci schválený a ověřený. Svým přímým zásahem do vazebné osy SDF-1α/CXCR4 však může umožnit úspěšnou mobilizaci i u dárců, kteří neodpovídají na G-CSF (poor mobilizers), nebo v případě, kdy je požadována megadávka CD34+ buněk. Složení transplantátů z PBSC a kostní dřeně (BM) je díky odlišnému způsobu odběru rozdílné. PBSC mají zpravidla menší objem, nižší hematokrit, proto případná ABO inkompatibilita nepředstavuje při podání transplantátu zpravidla problém. Vyšší obsah

„committed“ progenitorů naopak nabízí o něco rychlejší engraftment. Odběr z periferní krve s sebou však nese i cca 10x vyšší zastoupení T-lymfocytů v porovnání s kostní dření, které mohou zvyšovat riziko vzniku zejména chronické GVHD. Transplantace PBSC může být spojena s nižším rizikem relapsu a delším EFS v porovnání s kostní dření. Na druhou stranu nevedou tyto výhody, s výjimkou pacientů s pokročilým onemocněním, ke zlepšení celkového přežití.

V současné době je dávka CD34+ buněk event. CD3+ buněk hlavním ukazatelem kvality štěpu. Máme málo informací o dalších subpopulacích CD34+ a imunokompetentních buněk, o jejich alo-reaktivitě, vlivu na imunitní rekonstituci a GVHD/GVL. Je známo, že expozice G-CSF zmírňuje alo-reaktivitu T-lymfocytů jejich posunem k Th2 cytokinovému profilu. Přesný mechanismus není známý, může být zprostředkován dendritickými buňkami. G-CSF však nepoškozuje anti-leukemickou aktivitu T-lymfocytů a G-CSF mobilizované T-lymfocyty si zachovávají svou terapeutickou aktivitu, jako konvenční nemobilizované DLI (donor lymphocyte infusion). G-CSF také moduluje aktivitu T_{REG}, které mají význam pro navození imunotolerance, a dále jsou důkazy o jeho nepříznivém vlivu na funkci NK buněk, který je však dočasný a neovlivňuje negativně jejich GVL potenciál. Recentní analýza souboru nemyeloablativních transplantací prokázala asociaci mezi dávkou CD8+ lymfocytů ve štěpu a nižším rizikem relapsu a naopak lepším PFS a OS (1). Vyšší obsah CD8+ lymfocytů ve štěpu byl přítomen zejména u odběrů od mladých dárců. Vyšší pravděpodobnost získání štěpu bohatšího na T-lymfocyty případně NK buňky může být jedním z možných vysvětlení vlivu věku dárce na výsledek transplantace. Nové mobilizační režimy (např. použití plerixaforu) mohou mít odlišný vliv na složení štěpu, ale jejich dopad na rychlost hematopoetického či imunitního engraftmentu, na riziko GVHD či relapsu se bude muset teprve ověřit.

Nežádoucí reakce v souvislosti s darováním PBSC mohou být způsobeny vedlejšími účinky filgrastimu a nebo komplikacemi vyplývajícími z leukaferézy. Podávání filgrastimu je u většiny dárců spojeno s různě vyjádřenými „flu-like“ symptomy, zejména bolestmi kostí, svalů či hlavy, únavou, subfebriliemi. Tyto obtíže jsou ovlivnitelné běžnými analgetiky a většinou nevyžadují úpravu dávkování G-CSF. Komplikace leukaferézy zahrnují zejména projevy citrátové toxicity, případně vasovagální reakce. Vzácné nejsou ani komplikace vznikající v souvislosti s žilním přístupem, zejména hematomy či trombózy v případě zavedení CŽK.

Mobilizace a odběr PBSC jsou spojeny s typickými změnami v krevním obraze. Leukocytoza způsobená fil-

grastimem dosahuje průměrně $40 \times 10^9/l$, pouze cca 20 % dárců mívá hodnoty leukocytů nad $50 \times 10^9/l$. Maximální akceptovatelná leukocytóza je arbitrárně stanovena na $70 \times 10^9/l$ a při jejím dosažení je nutné redukovat dávku filgrastimu. Nicméně dárce s vyššími hodnotami leukocytů nemají zpravidla více nežádoucích projevů či obtíží způsobených filgrastimem. Hladina trombocytů klesá zejména po první aferéze a u části dárců může docházet ke snížení až pod $100 \times 10^9/l$.

Nejčastějšími subjektivními obtížemi dárců v souvislosti s darováním jsou únava, bolesti, nespavost, nevolnost nebo nauzea. Podobné příznaky lze pozorovat i u dárců kostní dřeně, odlišné je ovšem jejich načasování. Zatímco při odběru PBSC se objevují za 24 hodin po první aplikaci filgrastimu a vrcholí zpravidla v den +5, tedy v den první aferézy, při odběru kostní dřeně začínají až při vlastním odběru s maximem 24 – 48 hodin po odběru. Bolesti v souvislosti s odběrem (většinou mírné) zažívá téměř 90 % dárců. Při odběrech PBSC se jedná především o bolesti muskuloskeletálního charakteru, případně bolesti hlavy, které svého maxima dosahují v den +5. Naproti tomu odběry kostní dřeně jsou zatíženy zejména bolestmi v místě odběru a nejintenzivněji jsou vnímány cca 24 – 48 hodin po odběru. Vedle bolestí je významným vedlejším účinkem darování únava, kterou udává druhý den po odběru větší část dárců (cca 60 %). S odstupem měsíce po odběru je přetrvávající únava přítomna už jen u malé části dárců (cca 5 %). Celkové zotavení dárce po odběru je po darování PBSC velmi rychlé (cca 1 týden) v porovnání s dárce kostní dřeně (cca 3 týdny).

Závažné nežádoucí reakce (SAE) u dárců, tedy takové, které ohrožují život, vedou k neplánované hospitalizaci či jejímu prodloužení nebo způsobují dlouhodobě přetrvávající zdravotní problémy, mají většinou akutní charakter a odezní během několika dnů. Jejich incidence je pro odběry PBSC cca 0,6 %, pro odběry kostní dřeně cca 4 x vyšší. Nejčastěji se jedná o neplánovanou hospitalizaci na základě očekávaných nežádoucích účinků odběru (bolesti, nauzea, slabost, kolapsový stav), méně často je důvodem hospitalizace neočekávaná komplikace (infekce, bolest na hrudi apod.). Dlouhodobé komplikace se symptomy přetrvávajícími déle než 3 měsíce jsou taktéž vzácné (~0,06 %), nejčastěji ve formě protrahovaných bolestí. Velmi vzácné jsou život ohrožující komplikace (~0,01 %).

Důležitou problematikou je sledování dlouhodobých účinků G-CSF, především výskytu nádorových onemocnění u dárců PBSC. Zejména v minulých letech existovala obava z případného leukemogenního potenciálu filgrastimu a z rizika zvýšeného výskytu hematologických nádorových onemocnění u mobilizovaných

dárců. Aktuální data ukazují, že incidence nádorových onemocnění je stejná u dárců PBSC i dárců kostní dřeně (~0,8%), a zároveň je nižší v porovnání s běžnou populací. Filgrastim tedy nezvyšuje riziko hematologických malignit a mobilizaci pomocí filgrastimu lze považovat za bezpečnou. Při analýze chromozomálních abnormalit po stimulaci G-CSF neprokázaly studie jakoukoliv perzistující abnormalitu v CD34+ nebo mononukleárních buňkách. Některé studie našly pouze přechodné změny v genomovém expresním profilu, jejichž význam je nejasný (2). Nicméně přes vysokou bezpečnost darování PBSC je nezbytné s ohledem na možnost výskytu dlouhodobých komplikací sledovat zdravotní stav dárce nejen v době odběru a bezprostředně po něm, ale musí být prováděna i dlouhodobá dispenzarizace. Její minimální doporučené trvání je 10 let.

Některé skupiny dárců podstupujících odběr mají svá specifika. Ženy dárkyně mají vyšší riziko nežádoucích reakcí, které souvisí, vedle jejich často nižší hmotnosti, s častější nutností zavedení ČŽK a horší tolerancí aferézy. Příbuzní dárce bývají často starší, nezářídka komorbidní a riziko nežádoucích reakcí při odběru včetně SAE je u nich vyšší. Přestože standardy péče o příbuzné dárce resp. kritéria posuzování jejich zdravotní způsobilosti se mohou mírně lišit, mělo by se s příbuznými dárce zacházet stejně jako s nepříbuznými a to včetně dispenzarizace po odběru.

Dárcovství alogenních hemopoetických kmenových buněk je bezpečnou procedurou s nízkou mírou rizika pro dárce. Větší část odběrů se provádí u nepříbuzných dárců. Pro péči o dárce se uplatňují standardy stanovené světovou asociací dárců (WMDA) a národními regulačními autoritami. Způsob odběru PBSC se může do budoucna měnit s příchodem nových mobilizačních molekul, které umožní ovlivňovat buněčné složení transplantátu a přizpůsobovat je charakteristikám pacienta a jeho onemocnění. Základní pravidla dárcovství, zejména ochrana zdraví a anonymity dárce, však zůstanou trvale platná.

Práce byla podpořena grantem MZ ČR-RVO (Fakultní nemocnice Plzeň-FNPl, 00669806), grantem MZ 15-30661A a grantem Nadace pro transplantaci kostní dřeně.

1. Reshef R, Huffman AP, Gao A et al. High Graft CD8 Cell Dose Predicts Improved Survival and Enables Better Donor Selection in Allogeneic Stem-Cell Transplantation With Reduced-Intensity Conditioning. *J Clin Oncol* 2015; 33(21): 2392-2398.
2. Shaw BE, Confer DL, Hwang W, Pulsipher MA. A review of the genetic and long-term effects of G-CSF injections in healthy donors: a reassuring lack of evidence for the development of haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2015; 50: 334-340.

2891. REOFERÉZA - KLINICKÝ VÝZNAM REOLOGICKÝCH, TECHNICKÝCH A DALŠÍCH HEMAFERETICKÝCH UKAZATELŮ ÚČINNOSTI

Lánská M., Bláha M., Žák P. (IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice, Hradec Králové)

Lékařská reologie je v současnosti rychle se rozvíjejícím oborem, protože vzhledem k technickému pokroku lze léčebně ovlivnit některé těžké poruchy v mikrocirkulaci. Jedná se o vědní obor studující krevní fluiditu a aplikující výsledky tohoto výzkumu do klinické praxe hlavně v oblasti mikrocirkulace. V klinické praxi je důležitá reologická úprava zejména snížením viskozity pomocí eliminace nadměrně zvýšených tzv. reologických činitelů (jde obvykle o některé vysokomolekulární proteiny).

Reoferéza spojuje možnosti hemaferézy (léčebné metody, která se zabývá separací krevních složek) a lékařské reologie. Hlavním cílem reoferézy je zlepšení cirkulace v mikrořečisti. Hlavními determinantami průtoku orgány je stav cév a reologické charakteristiky krve. Dále je průtok závislý na funkčním stavu celé kapilární sítě jako „mikrocirkulačního niché“. K významným změnám v mikrocirkulaci může docházet na podkladě změn kteréhokoliv výše uvedeného parametru. Uplatnění reologických faktorů v patologii chorob i význam reologických vlastností krve jsou v posledních letech předmětem intenzivního výzkumu.

K ovlivnění reologických vlastností krve lze použít 3 hlavní léčebné modalit: hemodiluci, infuzní terapii a aferetické metody. Hemodiluce spočívá v odběru plné krve pacientovi s cílem snížení hematokritu a tím ovlivnění reologických podmínek. Efekt léčby je krátkodobý, laboratorní změny již nejsou detekovatelné za 24 hod od procedury. Efekt infuzní terapie je pouze přechodný, několik hodin trvající, proto tato metoda nenašla významné uplatnění v reoterapii.

Největší uplatnění přinesly až aferetické metody. Viskozita plazmy je jedním z určujících faktorů krevního průtoku mikrocirkulací, proto byla vyvíjena snaha najít způsob ovlivnění viskozity plazmy výhodným pozměněním složení plazmy. Postupným rozvojem aferetických technik byly zaváděny nejdříve neselektivní metody výměny plazmy (výměnná plazmaferéza), po semiselektivní až vysoce selektivní adsorpce patologických substancí (heparinem indikovaná lipidaferéza, přímá adsorpce LDL cholesterolu (DALI), imunoadsorpce, kaskádová filtrace). Bylo zjištěno, že čím specifitější je aferetická procedura, tím více klesá reologická efektivita.

V literatuře často nacházíme několik odlišných názvů pro jednotlivé aferetické metody. Membránová

diferenční filtrace je synonymem pro dvojitou, nebo kaskádovou filtraci plazmy čili filtrační plazmaferézu. Plazma prochází dvěma filtry. Borberg zavedl pojem „rheohemapheresis“ pro svoji modifikaci metodiky. Plazma je primárně získávána ne filtrem, ale centrifugací separátorem krevních tělísek. Teprve pak dochází k jejímu průchodu „druhým stupněm - cílovým filtrem. Z tohoto hlediska je správné používat nadále pojem kaskádová metoda, ale nejde již o dvojitou filtraci. Na našem pracovišti používáme Borbergovu metodu, pro naši modifikaci kaskádové filtrace používáme pojem reoferéza, nebo reohemaferéza.

Reoferéza je modifikace diferenční filtrace plazmy, kdy se používá speciální sekundární plazmatický filtr s relativně malými otvory, nazývaný reofiltr, který z protékající plazmy eliminuje exaktně definované spektrum proteinů s vysokou molekulární hmotností (nad 150 000 Daltonů). Jedná se zejména o: fibrinogen, a₂-makroglobulin, imunoglobulin M, LDL cholesterol, vonWillebrandův faktor, trombomodulin, fibronektin. Eliminace těchto proteinů vede ke snížení krevní i plazmatické viskozity, dále ke zlepšení agregability a flexibility erytrocytů. Výsledkem snížené krevní i plazmatické viskozity je zlepšení krevního průtoku mikrocirkulací a léčebně příznivé ovlivnění některých poruch v mikrocirkulaci. Dochází k příznivým změnám cytokinů a adhezních molekul, dále ke zvýšené produkci NO endotelem, a ke zlepšení deformability erytrocytů.

Reoferéza je indikovaná v léčbě onemocnění s prokázanou nebo důvodně předpokládanou poruchou mikrocirkulace. Tato léčba byla v rámci studií využita u věkem podmíněné makulární degenerace sítnice (VPMD), náhlé idiopatické ztráty sluchu (sudden idiopathic sensorineural hearing loss - SISHL), u periferních tepenních onemocnění - zejména na dolních končetinách, dále byla studována u onemocnění koronárních tepen, cévní mozkové příhody, „uveal effusion“ syndromu, trombózy centrální retinální žíly.

Podle literárních dat jsou největší zkušenosti s použitím reoferézy u věkem podmíněné makulární degenerace sítnice a náhlé idiopatické ztráty sluchu, kde jsou k dispozici randomizované studie. Americká společnost pro aferézy (ASFA - American Society for Apheresis) jednou za 2 roky na základě systematické revize všech dostupných aktuálních informací a důkazů vydává pravidla (guidelines) pro použití aferéz u jednotlivých chorob. Podle nejnovější edice je reoferéza indikována u VPMD - kategorie I (všeobecně uznávaná terapie, většinou v první linii terapie), síla důkazů 1B a SISHL - kategorie III (optimální úloha aferézy není určena, rozhodnutí nutno individualizovat), síla důkazů 2A.

Věkem podmíněná makulární degenerace sítnice (VPMD) je degenerativní onemocnění sítnice, způsobující progresivní změny vize pacientů a je nejčastější příčinou praktické slepoty lidí nad 60 let v industrializovaných zemích. Přes všechny nové poznatky v diagnostice a léčbě zůstává VPMD nevléčitelným onemocněním. K závažným ztrátám vize dochází přibližně u 10-15 % nemocných. Dosud byly publikovány kasuistiky nebo série nemocných, dvě kontrolované studie a pět randomizovaných kontrolovaných prací, které svědčí o úspěchu reoferézy u suché formy AMD. Tuto chorobu dosud nelze vyléčit, ale uvedené práce svědčí o možnosti zadržet její progresi nebo dokonce zlepšit stav nemocných na dlouhou časovou periodu.

Náhlá ztráta sluchu (SISHL) je nejčastěji definována jako ztráta sluchu nejméně o 30 dB ve 3 sousedících frekvencích v tónové prahové audiometrii, která vznikla za méně než 72 hodin. Náhlá ztráta sluchu může představovat izolovaný problém, nebo příznaky jiného, např. systémového onemocnění. Specifickou příčinu se podaří zjistit asi v 10% případech, pro zbývající případy se používá termín idiopatická ztráta sluchu.

Současný stav znalostí léčby SISHL lze shrnout jako neuzavřený. Byly publikovány série nemocných, 1 nekontrolovaná a 2 randomizované a kontrolované studie. Metodika provádění aferézy není jednotná a soubory léčených nemocných nejsou plně srovnatelné a dosud nejsou dostatečně velké k definitivním závěrům. Filtrace plasmy jako doporučována jako alternativa konvenční empirické terapie, není většinou metodou první volby. Na našem pracovišti jsme metodu reoferézy použili v rámci grantového projektu jako druhou linii léčby při neúspěchu kortikosteroidní terapie.

Nežádoucí účinky reoferézy jsou většinou identické s jinými aferetickými metodami. Specifickou komplikací, se kterou se setkáváme u výkonů se sekundární filtrací plasmy, je bradykininová reakce. Vyskytuje se u pacientů, kteří užívají ACE-inhibitory a projevuje se zarudnutím, hypotenzí, bradykardií a dušností. Proto by u pacientů podstupujících sekundární filtraci plasmy měl být ACE inhibitor vysazen alespoň 24 hod před výkonem. Také v registru WAA (World Apheresis Association) jsou nežádoucí účinky sledovány a hodnoceny. U reoferéz bylo pozorováno 9,1% nežádoucích reakcí, většinou byly mírné, nebyly zaznamenány závažné komplikace.

ZÁVĚR:

Reoferéza je nová léčebná metoda pro řadu onemocnění s poruchou mikrocirkulace. Při dlouhodobém sledování jsou výsledky velice příznivé u makulární degeneraci sítnice, u dalších diagnóz nutno vyčkat

výsledků dalších studií. Jedná se o relativně nákladnou, specializovanou péči, vyžadující vyškolený tým a mezioborovou spolupráci.

2859. HAND-FOOT SYNDROM - PLAZMAFERÉZA, JAKO MOŽNOST ŘEŠENÍ NĚKTERÝCH TOXICKÝCH PROJEVŮ PROTINÁDOROVÉ LÉČBY VYUŽÍVAJÍCÍ LÁTKY NA BÁZI NANOČÁSTIC

Filip S., Kubeček O., Martínková J., Špaček J., Maláková J., Lánská M., Hodek M., Bláha M. (Klinika onkologie a radioterapie LFUK, Hradec Králové; Gynekologická a porodnická klinika, Hradec Králové; Ústav lékařské diagnostiky a biochemie, Hradec Králové; IV. Interní hematologická klinika, Hradec Králové)

Úvod: Palmo-plantární erytrodysestézie (PPE, hand-foot syndrom) je při terapii liposomálním pegylovaným doxorubicinem (PLD) společně s mukositidou nejčastější dávkou limitující toxicitou. Incidence se při použití standardního schématu (50 mg/m² každé 4 týdny) pohybuje okolo 50 % pro jakýkoliv grade a 20 % pro grade 3 a 4. Přesto, že PPE nepředstavuje život ohrožující komplikaci, může nepříznivě ovlivnit kvalitu života a vést k nutnosti redukce dávek, prodloužení intervalu mezi dávkami, nebo dokonce přerušení léčby. Obtíže se obvykle vyvinou za 14-21 dní po dokončení 3. cyklu chemoterapie. Na syndrom zpravidla upozorní prodromy v podobě parestezií končetin, které předcházejí o 3-5 dnů kožní příznaky. Syndrom klinicky kulminuje výskytem bolestivého erytému a otoku kůže v místech vystavených zvýšenému tlaku, zejména dlaní rukou a plosek nohou. Následuje deskvamace kůže a reepitelizace. Podle recentních zkušeností německých autorů lze snížit výskyt PPE pomocí extrakorporální eliminace určité frakce PLD po nasycení tumoru. Optimální je využít kaskádové filtrace plasmy. Metoda a soubor nemocných: Metodu „kinetic targeting“ s využitím plasmafiltrace jsme zavedli a provedli 34 výkonů u 9 žen; průměrný věk 57 let (47-67 let) s karcinomem ovárií (stadium IIIA-C). Nemocným byla aplikována chemoterapie PLD v dávce 50 mg/m² každé 4 týdny (4-6 cyklů). Plasmafiltrace byla provedena od 2 cyklu chemoterapie. Výsledky: Podle našich dosavadních zkušeností u 9 nemocných žen léčených PLD pro platinarezistentní karcinom ovárií, se jeví použití plasmaferézy jako léčebné metody úspěšnou možností prevence PPE. Tuto toxickou komplikaci (grade 3) jsme zaznamenali jenom u jedné nemocné léčené PLD s použitím plasmaferézy. V důsledku rozvoje PPE bylo nutné léčbu přerušit a posléze ukončit pro další komplikovaný klinický průběh onemocnění.

Diskuse a závěr: Použití plasmazerézy v této indikaci ukazuje jasný benefit této metody. Podle literatury by měl být výskyt PPE při námi podané dávce PPL asi 50%. Při využití eliminace nadbytečného množství PPL po nasycení tumorosní tkáně byl výskyt podstatně nižší – jen u jedné nemocné. V našem dalším výzkumu se zaměříme na zvětšení souboru nemocných a bližší

hodnocení jak klinických parametrů (nutriční stav, imunologický profil), tak „benefit cost“ vzhledem k možnosti doporučit tuto metodu jako standardní postup u nemocných s vysokým rizikem PPE (malnutrice, chronická žilní insuficience dolních končetin, imunokompetence atd.) léčených PLD. Práce byla podpořena grantem AVZ MZ 16-30366A.

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

2970. VYUŽITÍ CELOEXOMOVÉHO SEKVENOVÁNÍ V PŘEDNÁŠKA

Staňo Kozubík K., Pál K., Radová L., Šmída M., Réblová K., Plevová K., Pospíšilová Š., Doubek M. (CMBGT, IHOK FN a CEITEC MU, Brno; CEITEC MU, Brno)

Přednáška bude cílena zejména na laboratorní aspekty této problematiky. Pokusí se o vysvětlení principu NGS, uvedení historie NGS a konkrétní postup aplikace exomového sekvenování na případové studii. Zmíní také problematická místa dané metodiky (BioIT, zkušenosti s vyhodnocováním NGS dat a používáním NGS metodiky v laboratoři).

Lidský genom obsahuje cca $3,2 \cdot 10^9$ párů bází. Pouze <2 % genomu tvoří kódující genové sekvence. Gen je tvořen introny, exony a nepřekládanými úseky na 3' a 5' koncích. Všechny exony (kódující sekvence) se označují „exom“. Exom obsahuje cca 85 % známých mutací, které podmiňují onemocnění. Sekvenování nové generace (NGS – z anglického „Next Generation Sequencing“) nachází stále větší uplatnění nejen v klinickém výzkumu, ale také v klinické diagnostice. Tato technologie umožňuje přechyst sekvenování lidského genomu za významně nižší cenu a kratší dobu než klasické Sangerovo sekvenování. Zatímco klasické sekvenování (sekvenování první generace = Sangerovo sekvenování) detekuje DNA nukleotidy v řadě jeden po druhém, NGS funguje na principu masivního paralelního sekvenování. Tím se stanoví sekvence až stovek milionů bází současně.

Výhodou NGS je flexibilita: v jednom běhu lze sekvenovat a) konkrétní úsek DNA (gen/geny), b) protein kódující DNA (exom), c) celou DNA (genom). Lze využít nastavitelné senzitivity metody: podle množství genetické informace k vyšetření volíme vysokou senzitivitu pro detekci např. somatických mutací nebo nižší senzitivitu pro vyšetření např. zárodečného genomu. V současnosti je cílené, celoexomové i celogenomové sekvenování považováno za vhodnou a praktickou variantu testování pro klinické účely. S jejich využitím lze

detekovat varianty napříč širokým spektrem aplikací: např. v populační genetice, u klinicky podmíněných onemocnění nebo u nádorových onemocnění. Volba mezi celoexomovým nebo celogenomovým sekvenováním závisí na ceně a potřebě znalosti nekódujících dat pro stanovení diagnózy.

V hematologii lze exomové sekvenování využít k detekci kauzálních genů a jejich variant např. u monogenních onemocnění, ale také ke stanovení diagnózy tam, kde je fenotyp onemocnění podmíněn výskytem mutace v celé řadě genů nebo kde je vyšetřovaný úsek DNA příliš rozsáhlý. Mezi nemoci, u nichž je stanovení diagnózy rychlejší a levnější pomocí celoexomového sekvenování, patří např. Long QT syndrom u člověka, SCID a kardiomyopatie. V klinické hematologii existuje řada potenciálních aplikací pro cílené exomové sekvenování: hemolytická anemie neznámého původu, kongenitální neutropenie, aplastická anemie ad. Celoexomové sekvenování se využívá pro diagnostické účely u následujících klinických syndromů: Fanconiho anemie, neuroacanthocytosis syndromy a Diamond-Blackfanova anemie. Řada hematologických onemocnění je nejasné etiologie, přestože jde často o geneticky podmíněná onemocnění. Exomové sekvenování je vhodné také v případech geneticky podmíněného hematologického onemocnění nejasného původu pro detekci kauzální varianty (např. u trombocytopenií).

Pro identifikaci hereditárních germinálních mutací je zapotřebí získat biologický materiál (např. periferní krev a z ní izolovanou DNA) nejen od nemocných, ale také od zdravých členů rodiny. Po provedení NGS analýzy získáme stovky až tisíce variant. Následuje bioinformatická a biostatistická analýza dat: srovnání získaných dat s referenční sekvencí, stanovení odchylek od reference, vyloučení populačních a rodinných variant a identifikace potenciálně kauzálních variant. Přítomnost potenciálně kauzální varianty je třeba ověřit alternativní sekvenovací metodou. Optimální by bylo provést funkční test potenciálně kauzálních variant pro stanovení jejich patogenity.

Na reálném příkladu bude představena metodika exomového sekvenování konkrétní rodiny včetně výsledku NGS a funkční analýzy detekované mutace.

„Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 16-29447A. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.“

2978. DETEKCE MUTACÍ V TP53 GENU U PACIENTŮ S CHRONICKOU LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIÍ POMOCÍ SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE

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

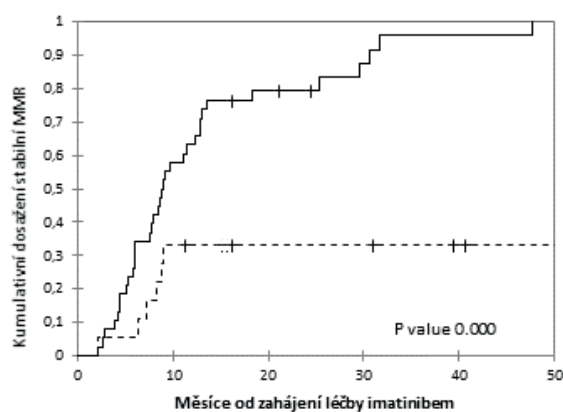
Chronická lymfocytární leukemie (CLL) patří mezi nejčastěji se vyskytující maligní lymfoproliferativní onemocnění starších dospělých. Klinický průběh CLL je velmi heterogenní. Jednou z možných příčin je velká genetická variabilita zahrnující řadu významných cytogenetických aberací (13q-, 11q-, trizomie 12 a 17p-) a také mutace v TP53, NOTCH1, ATM, SF3B1, BIRC3 a dalších genech podílejících se na patogenezi CLL. Mezi nejvýznamnější prognostický faktor u CLL patří delece a/nebo mutace genu TP53, které jsou spojovány s neodpovídatostí na chemoterapii a vyšším rizikem relapsů. S nástupem nových léků typu inhibitorů BCR signalizace (ibrutinib a idelalisib), které jsou účinné také u pacientů s deletovaným/mutovaným TP53, je nutné zařadit vyšetřování delece 17p- současně s detekcí mutací v genu TP53 do klinické praxe. Sdělení shrnuje současný stav znalostí klinického dopadu deletovaného/mutovaného TP53 genu u CLL. Dále diskutujeme výhody detekce mutací TP53 genu pomocí sekvenování nové generace (NGS), která umožňuje detekovat i minoritní subklony nesoucí mutace TP53, včetně základní interpretace výsledků. Současná cytogenetická detekce delece 17p- společně s detekcí mutací TP53 genu pomocí NGS umožní identifikovat rizikové CLL pacienty a současné nové léčebné možnosti umožní nasadit cílenou terapii u těchto vysoce rizikových pacientů. Grantová podpora: MZ ČR VES16-32339A, IGA_LF_2016_001, IGA_LF_2016_011.

2908. SNP ALELY V REGULAČNÍCH OBLASTECH GENŮ SLC22A4 A SLC22A5 JSOU VÝZNAMNĚ SPJATY S DOSAŽENÍM STABILNÍ VELKÉ MOLEKULÁRNÍ ODPOVĚDI U PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ LÉČENÝCH IMATINIBEM V PRVNÍ LINII

Jarušková M., Čuřík N., Hercog R., Polívková V., Motlová E., Beneš V., Klamová H., Machová Poláková K. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha - CZ; Genomics Core Facility, Heidelberg - D)

Nejčastěji užívaným lékem v 1. linii u chronické myeloidní leukemie (CML) zůstává inhibitor tyrozin-kináz (TKI) imatinib (IM). Biologická dostupnost IM v leukemických buňkách v dostatečné koncentraci je důležitým faktorem ovlivňujícím odpověď pacientů na léčbu. Farmakogenetika představuje potenciální zdroj molekulárních markerů, které by mohly v době diagnózy predikovat odpověď na léčbu IM. Vhodnými markery mohou být děděné polymorfismy nacházející se v regulačních oblastech vybraných ABC a SLC genů, které kódují transmembránové přenašeče IM. Cílem této práce bylo prověřit polymorfismy v promotorových oblastech vybraných ABC a SLC genů a identifikovat ty, které jsou asociované s odpovědí na léčbu IM v první linii u pacientů s CML. Metodou NGS jsme na testovací kohortě 83 pacientů vyšetřili promotory 15 SLC a 4 ABC genů s anotovanou funkcí lékových přenašečů. Všichni pacienti byli léčeni IM v neměnné dávce 400mg/den. Na základě minimálně dvouletého sledování byli pacienti rozděleni na optimálně (n=42) a neoptimálně (n=41, kategorie warning a failure podle doporučení Evropské leukemické sítě 2013) odpovídající na IM. Na validační kohortě (n=42) byla provedena detekce SNP v promotorech genů SLC22A4 a SLC22A5 pomocí Sangerova sekvenování. Analýzy vazebné nerovnováhy genotypovaných SNP v promotorech SLC22A4 a SLC22A5 a vyhledávání s nimi asociovaných SNP v dalších lokusech regulujících transkripci obou genů bylo provedeno na Evropské populaci pomocí nástroje LDlink1.1. Pro analýzy frekvence alel byly použity Fisherův exaktní test pravděpodobnosti a Chi-kvadrátový test. Kumulativní incidence dosažení stabilní velké molekulární odpovědi (MMR) byla vypočtena pomocí XLSTAT. Pro výpočet přežití bez události byla použita Kaplan-Meierova metoda. V 1486 sekvencích promotorů vyšetřených NGS jsme identifikovali 95 SNP. Na sloučeném souboru testovací a validační kohorty pacientů (n=125) jsme mezi pacienty optimálně odpovídajícími na léčbu IM a pacienty se selháním léčby nesoucími genotyp rs2631365-TC (SLC22A5) zjistili významný rozdíl v četnosti genotypů

Obrázek 1



rs460089-GC a rs460089-GG (SLC22A4). Zjistili jsme, že lokusy rs460089 a rs2631365 jsou ve významné vazebné nerovnováze ($R^2=0,98-1,0$; $P=0,0$) s dalšími 12 regulačními lokusy nacházejícími se převážně v intronech genů SLC22A4 a SLC22A5, které kódují transportéry IM OCTN1 a OCTN2. Na základě asociačních analýz se ukázalo, že pacienti nesoucí genotyp rs460089-GC měli významně vyšší pravděpodobnost dosažení stabilní MMR než pacienti nesoucí genotyp rs460089-GG ($P=0,001$). Pravděpodobnost dosažení MMR se ještě zvýšila u pacientů nesoucích genotyp rs460089-GC_rs2631365-TC ($P=0,000$; obrázek 1). Podobně pacienti s genotypem rs460089-GC měli významně vyšší pravděpodobnost přežití bez události než pacienti s genotypem rs460089-GG ($P=0,003$) a tento rozdíl se prohloubil mezi pacienty nesoucími genotyp rs460089-GC_rs2631365-TC v porovnání s pacienty s genotypem rs460089-GG_rs2631365-TC ($P < 0,0001$). Zjistili jsme, že SNP rs460089 a rs2631365 mohou představovat důležité genetické markery předpovídající odpověď na léčbu IM u pacientů s CML v době diagnózy. Pacienti s genotypem rs460089-GC_rs2631365-TC budou s vysokou pravděpodobností odpovídat na léčbu IM optimálně, zatímco vysoce rizikový genotyp rs460089-GG_rs2631365-TC naopak předvídá selhání léčby IM a progresi onemocnění. Pacienti s tímto rizikovým genotypem by mohli profitovat z léčby takovými TKI, které pro transport do buněk nevyužívají transportéry OCTN1 a OCTN2. Podporováno granty MZČR IGA NT/13899 a GA UK 177815.

2947. VYŠETŘENÍ TKÁNÍ PŘI DIAGNOSTICE AMYLOIDU

Flodrová P., Pika T., Flodr P. (Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP, Olomouc; Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc)

Amyloidóza je vzácné onemocnění charakterizované ukládáním amyloidových depozit v extracelulárním prostoru tkání. Tato depozita jsou jen velmi omezeně odbouratelná a jejich hromaděním dochází postupně k porušení funkce postiženého orgánu a v konečné fázi až k jeho selhání. V současnosti je známo 31 proteinů, které mohou způsobit amyloidózu u lidí, a to jak v systémové tak lokalizované formě. Prognóza většiny nemocných není příznivá, v krajních případech dochází k úmrtí v řádu měsíců po stanovení diagnózy. Z toho důvodu má prioritu co nejčasnější a také nejpřesnější stanovení diagnózy. V diagnostickém procesu má kromě podrobného klinického vyšetření nezastupitelnou roli hodnocení tkáně, které jediné může přítomnost onemocnění potvrdit nálezem amyloidu v histologickém obraze. Kromě metod speciálního barvení, které více či méně specificky amyloid znázorní, je v dnešní době nezbytné použití dalších postupů, které mají za cíl přesnou typizaci amyloidu. Ta je klíčová pro adekvátní terapii pacientů, neboť každý subtyp onemocnění se léčí výrazně odlišným způsobem. K určení subtypu amyloidu se využívá především aplikace nepřímé imunohistochemie a imunofluorescence na histologické tkáňové řezy. V úzce specializovaných centrech je výhodou dostupnost metody kapalinové chromatografie spřažené s hmotnostní spektrometrií, která jako jediná určí přesně všechny proteiny, které se na složení depozit podílí. Vzhledem k vzácnosti této diagnózy je důležitá centralizace péče o nemocné pro zajištění co nejvyššího standardu diagnostiky i léčby. Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 16-31156A. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

ANÉMIE/CYTOPENIE

3006. NOVÉ POZNATKY V ETIOPATOGENEZI A LÉČBĚ IMUNITNÍ ANEMIE A TROMBOCYTOPENIE

Kozák T. (Interní hematologická klinika, 3. LF Univerzity
Karlovy v Praze a FN Královské Vinohrady, Praha)

Autoimunitní hemolytická anémie (AIHA) je způsobena rozpadem erytrocytů díky aktivitě autoprotilátek s aktivací komplementu nebo bez ní. Diagnostika AIHA je souhrnem klinických a laboratorních nespecifických a specifických vyšetření a opírá se zejména o průkaz autoprotilátek navázaných na erytrocyty, tzv. přímý antiglobulinový (Coombsův) test (PAT). Negativní výsledek PAT však ještě AIHA nevyklučuje. Více než polovina AIHA je spojena s jiným, základním, onemocněním, jde o sekundární AIHA. AIHA vzniká u více než 10% pacientů se SLE, u 18% pacientů s původně idiopatickou AIHA se vyvine maligní lymfom. Podle teploty, při níž reagují autoprotilátky s erytrocyty, se rozlišuje AIHA s tepelnými protilátkami (tzv. WA-AIHA), které se vážou na erytrocyt při teplotě 37°C, a AIHA s chladovými protilátkami (CA-AIHA), jejichž optimální teplota pro vazbu na erytrocyt je pod 30°C. AIHA s bifázickými protilátkami se vyskytuje např. u paroxysmální chladové hemoglobinurie (PCH). Incidence WA-AIHA je 1:100 000, CA-AIHA je ještě vzácnější onemocnění s incidencí 1:1000000. Pro klinický průběh AIHA je důležitý typ autoprotilátky. IgM protilátky dobře aktivují komplement, stejně tak isotypy IgG₁ a IgG₃. Protilátky IgG₂ a IgA aktivují komplement slabě, a isotypy IgG₄ komplement neaktivují. Protilátky CA-AIHA jsou většinou IgM, mají tendenci vázat komplement a pokud reagují při teplotě blízké 30°C, jsou klinicky významné. Erytrocyty s navázanými protilátkami IgG za přítomnosti komplementu C₃/C₃d nebo bez něho jsou po vazbě na receptor Fc fagocytovány ve slezině, erytrocyty s navázaným smotným komplementem C₃/C₃d jsou destruovány v játrech (extravaskulární hemolýza). Vazba IgM na povrch erytrocytu při teplotě blízké 30°C může vyvolat aktivaci komplementu až C6-9 (membránu atakující komplex - MAC) a způsobit hemolýzu intravaskulární. Diagnóza AIHA je postavena na klinickém průběhu s manifestací anemického syndromu a laboratorních nálezech. Pro akutní AIHA jsou v nátěru periferní krve typické mikrosférocyty a při delším trvání makrocyty. Retikulocytóza je typická, ale může chybět v akutní fázi, stejně tak v situaci, kdy je kostní dřeň insuficientní (např. při infiltraci nebo po chemoterapii). V séru je zvýšená hladina nepřímého bilirubinu, v moči uro-

bilinogen, při intravaskulární hemolýze je přítomna hemoglobinurie s detekovatelným hemosiderinem v moči i řadu dní po příhodě. Obvykle je přítomna výrazně zvýšená hladina LDH, nicméně její normální hodnota hemolýzu nevyklučuje, je snížen haptoglobin, je pozitivní PAT. Ve vzácných případech s klinicky jasnou AIHA není zachycena pozitivita v PAT. V tomto případě může pomoci např. nátěr krevního obrazu, přítomnost mikrosférocytů v něm podporuje diagnózu AIHA bez detekovatelných protilátek. Při léčbě AIHA stále platí tři zásady:

1. snažíme se vyhnout podávání transfuzí, pro riziko reakce s event. aloprotilátkami, neboť aloprotilátky v séru pacienta jsou z klinického hlediska důležitější než autoprotilátky - mohou vyvolat fulminantní hemolýzu.
2. Sekundární AIHA léčíme s ohledem na základní onemocnění
3. Imunosupresivní terapie je základní přístup k léčbě idiopatické AIHA

První linie léčby WA-AIHA obsahuje vždy kortikosteroidy. U steroid-refrakterních forem lze použít Rituximab, který v 2. linii na mnohých pracovištích nahradil splenektomii, ta je ale stále jednou z možných léčebných modalit. IVIG je možné použít u jinak nezvladatelné akutní AIHA, efektivní dávky však musí být často ještě vyšší než u ITP. Cytostatika s imunosupresivním potenciálem (cyklofosfamid, azathioprin) lze také použít u refrakterní AIHA, ale s nejistým efektem. Výzvou stále zůstává terapie symptomatické CA-AIHA, u které bývají kortikosteroidy a splenektomie bez efektu. Účinek má cyklofosfamid a zejména Rituximab, příznivý efekt byl popsán též u kombinace Rituximab + Bendamustin a také kombinace fludarabinu s Rituximabem byla úspěšně použita v léčbě CA-AIHA. U refrakterních forem je možné zvážit plazmaferézu, anekdotické údaje jsou o pozitivním efektu eculizumabu.

Patogeneze imunitní trombocytopenie má několik složek a úrovní, které zahrnují jak časnou destrukci trombocytu vlivem navázaných protilátek, tak nedostačnou trombopoézu v kostní dřeni. Specifita protilátek může být u ITP heterogenní, protilátky mohou být namířeny proti jednomu, dvěma nebo i více antigenům destičkového povrchu, většina autoprotilátek u ITP je namířena proti GPIIb/IIIa a GPIb/IX, přitom konformace GP IIB/IIIa není, na rozdíl od GPIb/IX, stabilní. Protilátky proti GPIb/IX se vyskytují u 20-40% pacientů

s ITP, patofyziologie jejich působení je zcela odlišná od běžnějších protilátek anti-IIb/IIIa. Protilátky proti glykorporo-*teinu* Ib (GPIb) působí destrukci trombocytu mechanismem nezávislým na Fc γ receptoru makrofágu, vedou jednak k vyšší expresi P - selektinu, tím k aktivaci trombocytu, jednak k desialylaci glykoproteinů destičkové membrány, zejména transmembránového uhlovodíkového zbytku GPIb α . Pozměněná struktura antigenu GPIb je rychle detekována jinými typy receptorů než Fc γ , zejména tzv. Aswell - Morellovým receptorem hepatocytu. V případě ITP s autoprotilátkami anti-Ib/IX tak zanikají trombocyty převážně v játrech, ale ne působením jaterních makrofágů, ale přímo v hepatocytech. Tento mechanismus také vysvětluje pomalou nebo žádnou odpověď na léčbu kortikosteroidy a/nebo IVIG u některých pacientů s ITP. Sialidáza, která způsobuje desialylaci glykoproteinů destičkové membrány je přítomna v trombocytu v relativně vysoké koncentraci a je možné ji inhibovat přirozenými nebo syntetickými inhibitory sialydáz. Přirozenou sialydázou je u savců lysozomální Neuraminidáza 1 (NEU1). Sialydázy produkuje řada bakterií a virů. Desialylace trombocytů a jejich zkrácené přežívání je prokázaným mechanismem vzniku trombocytopenie u těžkých pneumokových infekcí a u **infekce *Trypanosoma cruzi*** (Chagasova choroba), předpokládá se také, že tímto mechanismem vzniká trombocytopenie u infekce virem chřipky. Syntetickými inhibitory jsou DANA (2-deoxy-2,3-didehydro-N-acytelneuraminová kyselina) a také oseltamivir fosfát, užívaný primárně k léčbě infekce chřipkovým virem A a B. Existuje již také několik kazuistik o efektu oseltamiviru v léčbě refrakterní ITP.

Standardní léčba 1. linie ITP se stále opírá o kortikosteroidy, v poslední době jsou preferované spíše p.o., např. Prednison v dávce 0,5 - 2 mg/kg/den. V emergentních situacích je třeba aplikovat vysoké dávky IVIG spolu s kortikosteroidy a při život ohrožujícím krvácení též trombocyty. Léčba druhé linie je spojena s přetrvávajícím dilematem dnešní terapie ITP a tím je splenektomie oproti farmakoterapii. Realitou je, že v posledních letech ve druhé linii léčby ITP je příklon k léčbě nechirurgické, často používaným přípravkem je Rituximab. Splenektomii je obecně doporučeno provádět nejdříve 6 měsíců od diagnózy, u dětí po 12 měsících. Až 2/3 pacientů nemusí mít po splenektomii další léčbu ITP. V léčbě chronické ITP, která je refrakterní k jiným způsobům léčby, se s úspěchem používají TPO agonisté, t.č. Romiplostim nebo Eltrombopag, které dosahují odpovědi přes 80%. Jejich podávání musí být dlouhodobé, po vysazení dochází u většiny pacientů opět k poklesu počtu trombocytů.

3004. VROZENÉ SYNDROMY SELHÁNÍ KOSTNÍ DŘENĚ – SOUČASNÝ POHLED

Pospíšilová D. (Dětská klinika, FN a LF UP, Olomouc)

Do skupiny vrozených syndromů selhání kostní dřene (inherited bone marrow failure syndromes, IBMFS) jsou řazeny vzácné poruchy krvetvorby charakterizované: - geneticky podmíněným selháním funkce jedné nebo více hematopoetických linií (erytrocytární, granulocytární nebo trombocytární); - vrozenými anomáliemi nebo funkčními poruchami postihujícími různé tkáně a orgány: kůži, skelet, srdce, plíce, ledviny, centrální nervový systém, často doprovázené i malým vzrůstem; - zvýšeným rizikem vzniku maligních onemocnění: nejčastěji Akutní myeloidní leukémie (AML), Myelodysplastického syndromu (MDS) nebo solidních nádorů. Společným rysem těchto onemocnění je výrazná fenotypová variabilita jak hematologických tak i somatických změn. Závažnější formy onemocnění se zřetelnými vrozenými anomáliemi, časnou manifestací cytopenií a rozvojem selhání kostní dřene jsou obvykle diagnostikovány již v časném dětství v kojeneckém, batolecím nebo předškolním věku. Lehčí formy s nenápadnými anomáliemi a pozdní manifestací cytopenií mohou na druhé straně dlouho unikat pozornosti a jsou potom diagnostikovány až v dospělosti nebo dokonce až při vypuknutí maligního onemocnění. Znalost příznaků těchto vzácných nemocí je proto velmi důležitá pro jejich včasnou diagnostiku a správnou volbu léčebného postupu. Do skupiny vrozených syndromů setkání kostní dřene jsou řazena následující onemocnění: Fanconioho anémie (FA), Dyskeratosis congenita (DC), Diamondova-Blackfanova anémie (DBA), Shwachmanův-Diamondův syndrom (SDS), Těžká vrozená neutropenie (SCN), Syndrom hypoplastických chrupavek a vlasů (Cartilage - hair hypoplasia - CHH), Amegakaryocytární trombocytopenie (CAMT), Trombocytopenie s chyběním radia (TAR), Pearsonův syndrom (PS). Některá z těchto onemocnění byla definována na molekulární úrovni teprve v posledních letech díky rychlému rozvoji metod molekulární genetiky. Na jejich vzniku se podílejí mutace „provozních genů“ (housekeeping genes), které kódují proteiny účastníci se čtyř důležitých regulačních buněčných systémů: repa-race DNA (FA), udržování délky telomer (DC), biogeneze ribozomů (DBA, SDS, RD, DC) a regulace buněčného cyklu. Většinou se tedy nejedná o nitro-buněčné procesy specifické pouze pro hematopoezu a poruchy těchto důležitých dějů mají dopad i na řadu jiných buněčných systémů. Autorka podává přehled nejnovějších znalostí o jednotlivých skupinách uvedených onemocnění včetně přehledu dosud popsáných genetických změn.

2879. ETIOLÓGIA, DIAGNOSTIKA A LIEČBA SIDEROPENICKEJ ANÉMIE V MLADŠOM VEKU

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

Úvod Anémie z nedostatku železa (Fe), sideropenické anémie (IDA) patria k najčastejším ochoreniam v celosvetovom meradle. Ich charakteristickou črtou je mikrocytóza a hypochrómia erytrocytov. Najohrozenejšou skupinou sú deti a mladé ženy. V detskom veku sa IDA môže podieľať na psychomotorickej retardácii, v dospelosti dochádza často k adaptácii i na nízke hladiny hemoglobínu (Hb) a klinický obraz je nešpecifický, chudobný. Rozvoj IDA je dôsledkom troch vzájomne prepojených procesov: zvýšených nárokov organizmu na Fe, jeho nedostatočného prísunu a krvácania. Vznik tohto ochorenia má i socioekonomický rozmer: v rozvojových krajinách je najčastejšou príčinou nedostatočný prísun Fe a/alebo ochorenia parazitmi, vo vyspelých ekonomikách sú časté chronické krvné straty alebo vegetariánstvo. Diagnostika IDA je vo väčšine prípadov jednoduchá s výnimkou situácií, keď je združená so zápalovými ochoreniami alebo niektorými vzácnymi vrodenými genetickými poruchami. V liečbe sa využívajú soli Fe, ktoré majú pri perorálnom podaní obvyčajne veľmi dobrý účinok (nízke hladiny hepcidínu uľahčujú absorpciu Fe). V niektorých prípadoch je limitom perorálnej terapie jej intolerancia. Intravenózna aplikácia Fe umožní rýchlu normalizáciu celkovej hladiny Fe (často už po jednorazovej aplikácii) a je vyhradená pre špecifické situácie.

Patogenéza Fe je esenciálnym prvkom pre život a vyskytuje sa viazané v proteínoch (napr. hemové Fe), ktoré sa podieľajú na mnohých bunkových procesoch. Voľné Fe je naopak pre bunku toxické, pretože katalyzuje tvorbu kyslíkových radikálov. Fe má svoj podiel i na regulácii imunitných funkcií, umožňuje ale aj rast baktérií, replikáciu vírusov či proliferáciu nádorových buniek. V organizme je preto zaistovaná homeostáza Fe

Tab. 1 Príčiny vzniku sideropénie

zvýšené nároky organizmu na Fe
gravidita, rýchly rast
nedostatočný prísun Fe
malabsorpcia (celiakia)
maldigestia (atrofická gastritída, resekcie žalúdka, zvýšená hladina fytoátov v potrave)
malnutriícia (vegetariáni)
krvácanie
GIT, gynekologické straty, krvácanie do močového či respiračného traktu, epistaxie, hemodialýza, časté krvné odbery, automutilácia

(celkové zásoby u dospelého jedinca sa pohybujú okolo 3 - 5 g s denným obratom asi 0,5 mg (zvýšené nároky pri raste, gravidite, menštruácii), väčšina cirkulujúceho Fe však vzniká z rozpadnutých erytrocytov (recyklovateľné Fe). Organizmus dokáže ovplyvňovať spotrebu Fe a stav jeho zásob výhradne reguláciou príjmu, nemá však vytvorené ciele mechanizmy výdaja. Tok Fe v organizme je možné rozčleniť do niekoľkých krokov:

• absorpcia v duodene

- vstrebanie hemového Fe je jednoduchšie (doposiaľ neúplne objasnený mechanizmus), anorganické Fe³⁺ musí byť redukované na Fe²⁺ (ferrireduktáza, Dcytb)
- transport Fe do cytoplazmy enterocyty zabezpečuje transmembránový proteín DMT1
- Fe môže zostať v enterocyte (väzba na feritín) alebo je uvoľnené do obehu pomocou ferroportínu (transportuje Fe i z makrofágov či hepatocytov)
- oxidácia Fe²⁺ na Fe³⁺ pomocou hepcidínu

• transport Fe v plazme

- väzba Fe na transferín (apotransferín), po jeho obsadení dvoma molekulami Fe³⁺ vzniká holotransferín (saturovaný transferín ~ 30 %)

• utilizácia Fe erytroidnými bunkami

- naviazanie holotransferínu na transferínový receptor povrchu bunky
- tvorba endozómu, uvoľnenie Fe³⁺ z holotransferínu (následná redukcia erytrocytovou ferrireduktázou na Fe²⁺) a recyklácia apotransferínu i transferínového receptoru
- uvoľnenie Fe²⁺ z endozómu (erytrocytová DMT1) a prienik do mitochondrie (mitoferín-1), nasleduje inkorporácia do protoporfyrínu IX (pomocou ferochelatózy) a vzniká hem (ten je transportovaný do cytoplazmy a napokon spojený s globínovými reťazcami za vznik Hb)

• recyklácia Fe (erytrocytov)

- prebieha v makrofágoch sleziny, pečene a kostnej dreve; export Fe z makrofágov zaisťuje už zmieňovaný ferroportín a plazmová feroxidáza (ceruloplazmín) umožňuje naviazanie Fe³⁺ na apotransferín, časť Fe je umiestnená v RES vo forme feritínu

• regulácia homeostázy Fe (hepcidín)

- hepcidín je zrejme kľúčovou molekulou v procese homeostázy Fe, je produkovaný v pečeni a jeho syntéza je ovplyvnená zápalom alebo vysokou koncentráciou Fe
- po naviazaní hepcidínu na ferroportín dochádza k jeho degradácii a zastaví sa uvoľnenie Fe z enterocytov a makrofágov
- deficit Fe či hypoxia majú na produkciu hepcidínu antagonistický účinok

(upravené podľa: Horváthová M, Divoký V in Molekulární hematologie, Galén 2013)

Tab. 2 Prehľad laboratórných ukazovateľov pri IDA

sledovaný parameter	poznámka
krvný obraz (↓ Hb, ↓ MCV, ↓ MCH, ↑ RDW)	v úvode dochádza k ↓ MCV (až k - 60 fl) a neskôr i k hypochrómii
s-Fe (↓ hladina)	nešpecifický nález
s-transferín (↑ hladina)	
saturácia transferínu (↓)	
s-ferritín (↓ hladina)	najcennejší ukazovateľ (obvykle < 10 µg/l)
s-sTfR (↑ hladina)	
vyšetrenie kostnej drene (Perlova reakcia)*	neprítomnosť farbiteľného Fe v siderofágoch ↓ počtu sideroblastov (< 30 %)
Fe-absorbčný test*	hodnotenie vzostupu sérového Fe po p.o. podaní (u IDA vzostup > 80 µg/dl)

* vyšetrenie v nejasných prípadoch

Klinický obraz Iba malá časť pacientov prichádza k lekárovi pre vlastné príznaky anémie, zreteľné prejavy anemického syndrómu sa prejavujú až pri poklese Hb pod 80 g/l a aj v týchto prípadoch sú často nevýrazné (chronický stav s adaptáciou). Vyskytuje sa: bledosť kože a slizníc, pálenie jazyka, zvýšená lámavosť nechtov a koilonychia, ragády ústnych kútikov, Plummer-Vinsonov syndróm (dysfágia a angulárna stomatitída), vzácne tzv. pika.

Diagnostika Anemické stavy vo všeobecnosti majú celé spektrum príčin a chudokrvnosť je iba zriedkavo konečnou diagnózou ale skôr jedným z rôznorodých prejavov inej choroby. Základom diagnostiky je podrobná anamnéza a komplexné zhodnotenie zdravotného stavu pacienta. V niektorých prípadoch je odhalenie prvotného mechanizmu zložitá – najmä vtedy, keď je anémia podmienená multifaktoriálne súbehom viacerých ochorení. Základným prvkom je zhodnotenie hemogramu vrátane retikulocytového indexu a morfológie erytrocytov.

Diferenciálna diagnostika V prípade mikrocytových (príp. hypochrómných) anémii je veľmi dôležité zhodnotiť tkanivové zásoby Fe, ktoré dokážu pomôcť pri odlíšení IDA (znížené zásoby) a stavov s normálnymi alebo zvýšenými tkanivovými rezervami (talasémie, anémie chronických chorôb, sideroblastické anémie či niektoré hemoglobínopatie). Dôležitým momentom pre

ďalšie diagnostické úvahy je zhodnotenie refrakterity IDA k perorálnej liečbe Fe. Pokiaľ vylúčime základným endoskopickým vyšetrením krvácanie či nadužívanie NSAID je nutný podrobnejší diagnostický prístup.

Liečba V terapii IDA je najdôležitejšie odstrániť vyvolávajúcu príčinu rozvoja sideropénie. V zásade rozdeľujeme dve formy podania Fe:

• perorálne podanie

- v súčasnosti existuje veľké množstvo preparátov Fe, odporúča sa podanie dvojmocných foriem (sulfáty) 100 - 200 mg Fe/deň
- súčasné podanie kyseliny askorbovej zlepšuje absorbciu Fe
- hodnotenie liečby sa odporúča po 4 - 6 týždňoch (optimálny nárast Hb 0,1g/dl/deň), refrakterita je definovaná ako nedostatočný vzostup po podaní minimálne 100 mg elementárneho Fe počas tohto obdobia
- neodporúča sa ukončiť substitúciu Fe pri normalizácii hladiny Hb ale doplniť i tkanivové zásoby Fe (hladina ferritínu by mala byť stabilizovaná > 50 µg/l)
- pri chronických krvných stratách, ktoré nie je možné eliminovať, je nutná intermitentná substitúcia Fe

• intravenózne podanie

- parenterálna liečba Fe je indikovaná v špecifických situáciách – všeobecne pri zlyhaní či refrakterite k per-

Tab. 3 Diagnostický prístup pri refrakternej IDA

	H. pylori	autoimúna gastritída	celiakia	IRIDA
skrining	H. pylori (Ag)	anti-IF (Ab) anti-parietálne (Ab)	anti-gliadín (Ab)	anamnestické údaje
odporúčené vyšetrenie	gastroskopia biopsia ureázový test	gastroskopia biopsia	gastroskopia duodenálna biopsia	mutácie TMPRSS6
liečba	eradikácia		bezlepková diéta	

IRIDA = iron refractory iron deficiency anemia

(upravené podľa: Hershko C, Camaschella C, Blood 2014)

orálnemu podaniu Fe (porucha resorpcie, ochorenia GIT s iritáciou pri perorálnom podaní, významné krvné straty)

- intravenózne preparáty sú pripravené tak, že obsahujú centrálnu (jadrovú) časť s obsahom Fe a schránku z polysacharidového polyméru
- intravenózna liečba musí prebiehať formou pomalej infúzie s možným rizikom rozvoja anafylaktickej reakcie

Záver Úlohou hematológa je predovšetkým diagnostika a liečba „nevysvetliteľných“ IDA s dôrazom na refrakterné formy, pri ktorých je nutné prihliadnúť k etiopatogenetickému podielu *H. pylori*, autoimúnnej gastritídy, celiakie a niektorých vzácných hereditárnych foriem mikrocytových anémií súvisiacich s poruchami tvorby proteínov zapojených do homeostázy Fe v organizme.

LITERÁRNE ZDROJE

1. Camaschella C. How I manage patients with atypical microcytic anaemia. Br J Haematol. 2013; 160:12-24.
2. Hershko C, Camaschella C. How I treat unexplained refractory iron deficiency anemia. Blood 2014; 123:326-333.
3. Horváthová M, Divoký V. Metabolismus železa a jeho poruchy. In Molekulární hematologie, Galén 2013, 265-270
4. Jaspers A, Caers J, Le Gac G et al. A novel mutation in the CUB sequence of matriptase-2 (TMPRSS6) is implicated in iron-resistant iron deficiency anaemia (IRIDA). Br J Haematol. 2013; 160: 564-565.
5. Krč I. Anemie z nedostatku železa (sideropenické anémie). In Hematologie, Triton 2006, 33-37

Podporené grantom IGA_LF_2016_001 a MZ ČR – RVO (FNOL, 00098892).

2869. ANÉMIE CHRONICKÝCH CHOROB

Indrák K. (HOK, FN, Olomouc)

Anémie chronických chorob (ACD) predstavujú, spoločne se sideropenickou anémiou, najčastejšiu anémiu v populácii. U nemocných vyššieho veku tvorí ACD až tretinu anémií. Jedná sa väčšinou o mierne až stredne ťažkou normo-/hypochromiu a normocytárnu anémiu, ktorá ale u asi čtvrtiny nemocných prechádza v anémiu mikrocytárnu.

Etiopatogeneze:

Príčinou ACD je zvýšená aktivita bunčnej imunity vedúcej k nadbytku hepcidinu (Hepatic bacteriocidal protein) v krvi. Ťižka anémie koreluje s veľkosťou aktivity imunitného systému. Proteíny akútnej fázy akti-

vujú signálnu dráhu LPS (lipopolysacharid - endotoxin) a interleukinu 6 (IL-6), ktoré spoušťa, nezávisle na hladine železa, syndrom excesu hepcidinu. Hepcidin snižuje vstrebávanie železa v duodenu a interferenciou s ferroportinom a jeho degradáciou blokuje export železa hepatocytami a makrofágami a zvyšuje ukládanie železa v makrofágo-monocytovej (MaMo) systéme. V kostnej dreni je v dôsledku relatívne nízkej hladiny erythropoetinu, s ohľadom na ťižku anémie, znížená proliferatívna aktivita erythropoetiny. Počas prežívania erytrocytov býva zkrátený v dôsledku zvýšenej aktivity v MaMo systéme. Medzi vyvolávajúce príčiny ACD patrí infekcia (akútne a chronické), malignita, autoimunitná ochorenia, chronická ochorenia ledvín, ťažká traumata, diabetes mellitus, stáří, infarkty myokardu, veľké operácie a rada ďalších.

Diagnostika a diferenciálna diagnostika:

Objem (MCV) erytrocytov v krvnom obraze nemocných s ACD býva normálny, zatiaľ čo u sideropenie nachádzame mikrocytózu. U ACD býva znížená až normálna hladina sérového železa (Fe) a znížená alebo normálna celková väzobná kapacita (CVK) pro železo. U sideropenickej anémie je CVK železa zvýšená. Hladina ferritínu je u ACD normálna alebo zvýšená, u sideropenickej anémie je znížená. Hladina solubilného transferínového receptora (sTfR) je u ACD normálna a pomer sTfR a logaritmu ferritínu (sTfR/log ferritínu) býva znížený (<1). U sideropenickej anémie je hladina sTfR zvýšená a pomer sTfR/log ferritínu býva zvýšený (>2). Ďalej u ACD nachádzame zvýšenú hladinu hepcidinu, ktorá je u sideropenickej anémie znížená. Také hladiny cytokínov (TNF, IL-1, IL-6) je u ACD zvýšená, zatiaľ čo u sideropenickej anémie býva normálna. V diferenciálnej diagnostike je vedľa obecného odlišenia ACD a sideropenickej anémie nezbytné odlišit „čistú“ ACD od ACD provázenej sideropeniou. Odlišenie týchto dvoch jednotiek má zásadný význam pre voľbu liečebnej stratégie, pretože u „čistej“ ACD nepodávame preparáty železa a u ACD provázenej sideropeniou sú naopak preparáty železa často nezbytné. Hladina ferritínu >100 µg/l svedčí pro „čistú“ ACD, hladina ferritínu 50-100 µg/l ukazuje na možnú kombináciu ACD a sideropenie. K zpresneniu diagnostiky býva v tomto prípade nezbytné provést ďalšie vyšetrenie. Hladina ferritínu < 30-50 µg/l svedčí pro kombináciu ACD a sideropenie. Hladina sTfR < 2 mg/l svedčí pro „čistú“ ACD, hladina sTfR 2 - 5 mg/l ukazuje, že môže íť o kombináciu ACD a sideropenie, hladina sTfR > 5 mg/l ukazuje na prítomnosť ACD a sideropenie. Index sTfR/log ferritínu >2 a ferritin < 30 µg/l ukazuje na absolútny deficit železa, index sTfR/log ferritínu <2 a ferritin v séru ≥ 30 µg/l ukazuje na

relativní deficit železa, a index sTfR/log ferritinu <1 a ferritin v séru $\geq 30 \mu\text{g/l}$ ukazuje, že se jedná o „čistou“ ACD bez deficitu železa.

Léčba:

Léčebným cílem je u ACD, podobně jako u ostatních anémií, zvýšení hladiny hemoglobinu a tím i zlepšení kvality života pacienta. Dosud ale nebyl zcela přesně popsán vliv léčby anémie na přetížení železem v MaMo systému, vliv na imunitu, na tvorbu hydroxylových radikálů a na vyvolávající chorobu. Snížená nabídka železa je u ACD obranným mechanismem organismu, protože železo je růstovým faktorem pro mikroorganismy. Proti podávání železa u „čisté“ ACD mluví skutečnost, že pokud není přítomen deficit železa, je dodané železo přesouváno do zásobáren a stejně není pro krvetvorbu využitelné. Podávání preparátů železa pak může podporovat aktivitu onemocnění a může vést k orgánovému poškození svojí toxicitou. Nabídka železa nádorovým buňkám může stimulovat růst nádoru. Přísun železa do systému redoxních reakcí může stimulovat tvorbu volných hydroxylových radikálů. U autoimunitních chorob ale může železo inhibovat prozánětlivé imunitní efektorové dráhy a snižovat aktivitu choroby. Dle tíže anémie a klinických příznaků je proto třeba pečlivě zvažovat, zda ACD vyžaduje kromě léčby základního onemocnění i cílenou léčbu anémie. V cílené léčbě anémie se nejčastěji užívají krevní transfuze, erythropoezu stimulující proteiny (ESP), preparáty železa a zkoušejí se i nové léčebné přístupy. Přetížení železem v důsledku jeho substituce může být škodlivé u dialyzovaných nemocných, u nichž je toto přetížení provázáno zvýšeným rizikem vzniku infekčních komplikací: při hladině ferritinu pod $100 \mu\text{g/l}$ je riziko infekčních komplikací $<20\%$, při hladině ferritinu $>100 \mu\text{g/l}$ je riziko infekčních komplikací $>20\%$ resp. riziko sepsise je při hodnotě ferritinu $>100 \mu\text{g/l}$ 2.5x vyšší, než při nižších hodnotách. Železo obecně nesubstitujeme u ACD s ferritinem $>100 \mu\text{g/l}$. Erythropoetin je u ACD produkován v relativně menším množství v důsledku působení cytokínů či poškození ledvin. Navíc je popisována snížená citlivost erytroidních prekurzorů na erythropoetin a proto můžeme konstatovat, že ACD je charakteristická relativním deficitem erythropoetinu. Podání erythropoetin stimulujících proteinů (ESP) stimuluje erythropoezu, stimuluje tvorbu sTfR a tlumí tvorbu hepcidinu. Léčebná odpověď na podávání ESP závisí na chorobě vyvolávající ACD, na jejím stádiu, stupni imunitní aktivity a dostupnosti železa. U nádorů, infekcí a u autoimunitních chorob vede podávání ESP ke zvýšení hladiny hemoglobinu, která snižuje potřebu transfuzí i se snížením jejich

vedlejších nežádoucích účinků (přetížení železem). Je ale nutno říci, že biologická úloha erythropoetinu receptoru (EpoR) na nádorové buňky zatím nebyla zcela objasněna a existuje podezření, že by se zde mohlo podávání ESP projevit negativně. Proto se léčebná doporučení na podávání ESP u ACD omezují na jejich podávání u ACD při chronické renální insuficienci s cílovou hodnotou hemoglobinu $110-120 \text{ g/l}$ (při vyšších hodnotách hemoglobinu stoupá riziko vzniku trombotických komplikací), na ACD u nádorů léčených chemoterapií (solidní TU a lymfoproliferace), kde je indikováno podávání ESP při hladině hemoglobinu $<90 \text{ g/l}$ se stejnou cílovou hodnotou hemoglobinu ($110-120 \text{ g/l}$). ESP jsou indikovány i u revmatoidní artritidy, ulcerosní kolitidy (efekt u 60% nemocných), u myelodysplastického syndromu (MDS) typu refrakterní anémie (RA) a refrakterní anémie s excesem blastů - 1 (RAEB-1, počet blastů v kostní dřeni $<10\%$; efekt u 30 až 40% nemocných). Je ale popisováno, že téměř žádný efekt ESP nemůžeme očekávat u nemocných s MDS a s hladinou erythropoetinu v séru $>500 \text{ U/l}$. Některé práce dokonce uvádějí jako rozhodující pro neúspěch léčby hladinu erythropoetinu $>100-150 \text{ U/l}$. Zvláštní léčebný přístup si zaslouží ACD se sideropenií. Železo, které je nezbytné pro basální metabolismus, je zde blokováno v MaMo systému a díky tomu nemůže být ze zásob mobilizováno. U ACD se sideropenií je proto třeba zvažovat současnou substituci preparátů železa a ESP. Pro tuto kombinaci hovoří skutečnost, že zvýšení hladiny erythropoetinu zvyšuje nároky na dodávku železa do kostní dřeni a stimuluje tvorbu sTfR, zatímco nabídka železa použitelného pro krvetvorbu je u ACD snižena v důsledku působení cytokínů způsobujících jeho retenci v MaMo systému. Při špatné absorpci železa v duodenu je u ACD se sideropenií indikováno podávání železa intravenózně. K novým léčebným přístupům patří snaha o ovlivnění tvorby hepcidinu a jeho účinků pomocí antagonistů tvorby hepcidinu: inhibitory BMP (kostní morfogenní protein, který indukuje transkripci mRNA hepcidinu), protilátky proti receptoru pro IL-6; syntetické anti-sense oligonukleotidy, antagonisté účinku hepcidinu - neutralizující protilátky proti hepcidinu. Monoklonální protilátky proti ferroportinu blokující vazbu hepcidinu umožňují pokračování výdeje železa z buňky i za přítomnosti hepcidinu. Příkladem je Lxaptepid, antihepcidin l-oligoribonukleotid, který se váže na hepcidin a blokuje jeho účinek na cílovou molekulu ferroportin a tím brání blokádě výdeje železa z buňky. Jiným zkoušeným preparátem je erytroferon (ERFE), protein regulující účinek erythropoetinu na tvorbu hepcidinu, který zvyšuje sekreci erythropoetinu a vede ke stimulaci tvorby ERFE tlumivým efektem na

tvorbu hepcidinu. Důsledkem je zvýšený výdej železa uvolňovaný do cirkulace pro potřebu vystupňované erythropoezy.

Závěr:

Předpokladem správné léčby ACD je přesná diagnostika a odlišení ACD od ACD se sideropenií a od siderope-

nické anémie. Léčebné přístupy vycházejí u ACD z léčby vyvolávající choroby a dle tíže anémie se rozhoduje o cílené léčbě anémie substitucí erytromasy, pečlivě se zvažuje potřeba podávání železa a/nebo erythropoetin stimulujičích proteinů. Nové léčebné přístupy jsou v současnosti na úrovni klinických studií vesměs první fáze.

Posterová sekce

OŠETŘOVATELSTVÍ

P1/3007. KAZUISTIKA PACIENTKY S DIFÚZNÍM VELKOBUNĚČNÝM B-LYMFOMEM

Bujnochová P., Huserová M. (klinika hematookologie, FN Ostrava)

Naše kazuistika se týká 45leté ženy, která byla přijata v červenci 2015 na kliniku hematookologie - FN Ostrava s diagnózou difúzní velkobuněčný B-lymfom s exulcerací tumorózních mas v pravém třísele. Pacientce byla diagnóza a následná léčba započata v nemocnici v Novém Jičíně, ale z osobních důvodů, požadovala další léčbu ve FN Ostrava. U pacientky bylo provedeno PET vyšetření, kde zjištěny ložiska v pravém třísele, stehně, kosti kyčelní a obou plicích. Neustále se projevovala výrazná únava, nechutenství, svědění kůže a úbytek hmotnosti. V časových intervalech byly aplikovány postupně tři chemoterapie (R-ICE); (DA-EPOCH-R); (mini Dexamethason-BEAM). Tato léčba byla bez efektu. Defekt na stehně a třísele i po důkladném ošetřování a častých převazech se zvětšoval a nekrotizoval. Bylo nutné chirurgické ošetření. V říjnu z CT vyšetření nalezeny další ložiska v mediastinu a retroperitoneu. Byla zahájena již paliativní léčba. Pacientka byla s výsledkem své léčby srozuměna. Projevila přání poslední dny svého života strávit doma. Po důkladně nastavené analgetizaci a domluvě s mobilním hospicem Ondrášek, byla propuštěna do domácí péče. Desátý den po propuštění, v domácím prostředí a mezi svými blízkými, důstojně umírá. Naše práce se zaměřuje na psychosomatické problémy, jak u pacientky, tak i její rodiny. Chceme poukázat na psychické vypětí a komunikaci mezi pacientkou a zdravotním personálem, z důvodu, že se jednalo o osobu nám velmi blízkou - naši bývalou kolegyni.

P2/2948. VÝROBA DELEUKOTIZOVANÝCH RESUSPENDOVANÝCH ERYTROCYTŮ A JEJICH VÝHODY

Rousková M., Smital J., Otyepková M., Koukalová A., Galuszková D. (Transfuzní odd., FN, Olomouc)

Úvod: Hemoterapie představuje náhradu určité součásti krve, jejíž obsah je v cirkulaci snížený nebo došlo k poruše její funkce. Plná krev odebraná dárčům krve se v současnosti v hemoterapii již nepoužívá,

před jejím použitím pro pacienta probíhají dodatečné úpravy. Jednou z významných úprav je snížení obsahu leukocytů dárce ve výsledném transfuzním přípravku (TP). Leukocyty přítomné v transfuzním přípravku jsou odpovědné za řadu nežádoucích účinků, jejich redukce vede např. ke snížení rizika výskytu febrilní reakce, přenosu virových infekcí, HLA aloimunizace. Použití deleukotizovaných TP je tak výhodnější zejména pro imunosuprimované pacienty, chronicky transfundované pacienty nebo děti. Jedinou nevýhodou deleukotizovaných transfuzních přípravků je jejich vyšší cena. Cíl: Popsat produkci deleukotizovaných resuspendovaných erytrocytárních transfuzních přípravků na Transfuzním oddělení FNOL. Metody: U odebrané plné krve standardně probíhá dělení na erytrocyty a plazmu, odsátí vrstvy buffy coatu a nahrazení plazmy výživným roztokem pro erytrocyty (resuspenze). Tak vznikají erytrocyty bez buffy coatu resuspendované (EBR), což je v hemoterapii nejběžnější erytrocytární transfuzní přípravek. Pokud je při odběru plné krve od dárce použit navíc leukocytární filtr, vzniknou erytrocyty resuspendované deleukotizované bez buffy coatu (ERD). Dodatečně lze deleukotizovat přes filtr také již vyrobené EBR, vzniknou potom erytrocyty bez buffy coatu resuspendované deleukotizované (EBRD). Deleukotizované erytrocyty lze odebrat dárči i pomocí separátoru, získáme potom erytrocyty z aferézy resuspendované deleukotizované (EARD). ERD, EBRD a EARD se tedy liší jen způsobem výroby, výsledný produkt je stejný. Jakostní parametry: Reziduální obsah leukocytů v deleukotizovaných erytrocytárních TP musí být menší než 1×10^6 . Kontrolní laboratoř TO FNOL provádí kontrolu jakosti u 1 % všech vyrobených transfuzních jednotek, nejméně 10 jednotek měsíčně. Výsledky: Z vyrobených deleukotizovaných erytrocytárních TP na TO FNOL převažují ERD (89%), EBRD (10%) se vyrábějí převážně jen pro pokrytí většího výdeje konkrétní krevní skupiny, EARD (1%) se vyrábějí nejméně. Ze všech vydaných erytrocytárních TP z TO FNOL tvoří v současnosti deleukotizované přípravky asi 20% (21% v roce 2015, 20% v roce 2014, 18% v roce 2013). Většina směřuje k pacientům Hemato-onkologického oddělení a Kardiochirurgického oddělení, také transfuzní přípravky vydávané na Dětskou kliniku jsou povětšinou

deleukotizované. Kontroly kvality deleukotizovaných transfuzních přípravků vycházejí dlouhodobě bezproblémově. Závěr: Z hlediska bezpečné hemoterapie přináší deleukotizované erytrocytární transfuzní přípravky významné výhody, vliv deleukotizace na snížení výskytu nežádoucích účinků transfuze byl prokázán v řadě studií. V ideálním případě můžou zcela nahradit nejběžněji používané EBR, což by ovšem naráželo na zvýšenou finanční zátěž. V řadě zemí na světě probíhá deleukotizace všech transfuzních přípravků již běžně. Navýšení výroby deleukotizovaných erytrocytárních transfuzních přípravků je jedním z dlouhodobých cílů kvality TO FNOL.

P3/ 2936. IMPLEMENTACE MANAŽERKY I.V. VSTUPŮ NA TRANSFUZNÍ ODDĚLENÍ S CÍLEM TRVALÉHO SNIŽOVÁNÍ KOMPLIKACÍ U DÁRCŮ

Koukalová A., Žochová R., Galuzsková D. (Transfuzní odd., FN, Olomouc)

Úvod: Příspěvek prezentuje nově zavedenou funkci manažerky i.v. vstupů a její význam pro chod Transfuzního oddělení Kvalifikační požadavky kladené na manažerku i.v. vstupů na TO : specializační vzdělání, praxe v oboru min. 3 roky praxe na odběrovém sále, kurz v péči o i.v. vstupy nebo jiné školení v dané tématice. Cílem: implementace manažerky i.v. vstupu na naše oddělení je trvalé snižování komplikací u Její úkolem je identifikovat příčiny komplikací, stanovit jednotný postup při stanování nápravných nebo preventivních opatřeních. Vstupně jsou definovány jednotlivé druhy komplikací (přepichy, nedokončené odběry, problém v žíle, odběr nad 10 min., nevolnost, kolaps, technické komplikace a příměs erytrocytů při přístrojových odběrech.), ty jsou po odběru zaznamenány všeobecnou sestrou. Výsledky: Od roku 2004 je sledování komplikací pravidelně vyhodnocováno za celý rok. Kompetence manažerky i.v. vstupů 1. Zaškolení nelékařského personálu v rámci adaptačního procesu ve správné technice venepunkce. 2. Periodické proškolení nelékařského personálu v technice venepunkce 1 x ročně. 3. Zavedení techniky odběrů v odběrové místnosti krevních vzorků: volba slabší žíly k odběru krevních vzorků a ponechání kvalitnějšího žilního vstupu k odběru (plné krve nebo přístrojovému odběru). 4. Na základě vyhodnocení sledovaných komplikací spolupracovat na stanovování nápravných opatření. Tabulka sledovaných komplikací Jednotlivé sledované komplikace hlavně u aferetických odběrů vykazují za 11 let klesající trend a to zřejmě vlivem pečlivého hodnocení vhodnosti dárce pro aferézy. U odběrů plné krve=běžné odběry

dárců je trend komplikací kolísavý a to v závislosti na počtech prvodárců, jejich přípravy před odběrem a zaškolení nových zaměstnanců na odběrovém sále. Nápravné opatření: stanovení přísnějších kritérií ve výběru zaměstnanců na odběrový sál a získávání prostřednictvím náborových aktivit nových dárců s důrazem na edukace vzhledem ke příjmu potravy a pitného režimu před odběrem. Závěr: Implementací funkce manažerky i.v. vstupů a sledováním komplikací u dárců je dosaženo naplnění cílu snižovat, respektive předcházet komplikacím v průběhu všech odběrů u dárců.

P63/2856. KAZUISTIKA U HIV POZITIVNÍHO PACIENTA S DIAGNÓZOU NON-HODGKINŮV LYMFOM

Konupčíková P., Uvázlová E., Labudíková M., Machová R. (Hematoonkologická klinika, Fakultní nemocnice, Olomouc)

V září roku 2014 jsme se na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice v Olomouci poprvé setkali s HIV pozitivním pacientem, u něhož byl nově diagnostikován non-Hodgkinův lymfom. V posledním desetiletí po zavedení vysoce aktivní antiretrovirové terapie došlo k signifikantnímu snížení rizika vzniku lymfomu u HIV pozitivních nemocných. Výskyt non-Hodgkinových lymfomů (NHL) je u HIV pozitivních pacientů zvýšen 60-200x (dle WHO). K nejčastěji diagnostikovaným lymfomům patří agresivní B-lymfomy, především Burkittův lymfom a Difuzní velkobuněčný B-lymfom, který byl z provedené kožní biopsie diagnostikován u našeho pacienta. Non-Hodgkinské lymfomy jsou nádorová onemocnění, která vycházejí z nekontrolovatelného bujení lymfatických buněk zodpovědných za imunitu, postihují nejen lymfatické uzliny, ale kterýkoliv jiný orgán v těle. Difuzní velkobuněčný B-lymfom je nejčastější a vysoce maligní. Přes svoji agresivitu bývá dobře citlivý na léčbu. Více než polovinu pacientů s nepokročilým postižením a nízkým indexem rizika je možno zcela uzdravit intenzivní chemo-imunoterapií. U naprosté většiny pacientů nelze příčinu onemocnění určit. Zvýšený výskyt lze sledovat u pacientů s oslabenou imunitou po provedených transplantacích, podíl mohou mít i infekce, vyvolané např. virem Epstein-Barrové, Helicobakter pylori v případě lymfomu žaludku, nebo právě u nemocných s HIV. HIV= human immunodeficiency virus = vir lidského imunodeficitu, tedy vir napadající lidskou obranyschopnost. Virus HIV napadá v lidském organismu skupinu bílých krvinek T-lymfocyty, ve kterých se množí, později je zabíjí a snižuje tak jejich počet v těle nakaženého člověka. T-lymfocyty hrají důležitou roli

v obranyschopnosti lidského organismu, jejich pokles vede k selhání imunity a rozvoji onemocnění, které bylo poprvé popsáno v roce 1981 ve Spojených státech Amerických a které dostalo později název AIDS. HIV virus byl objeven v roce 1983. V současné době jsou známy dva typy lidských virů způsobujících toto onemocnění a to HIV-1 a HIV-2. Za světovou pandemií HIV infekce je zodpovědný hlavně virus HIV-1, který se vyskytuje

v Evropě a na Americkém a Asijském kontinentu. HIV-2 zůstává lokalizován zejména v oblastech západního pobřeží Afriky. Základem léčby je antivirová terapie, jejím cílem je alespoň zpomalit množení viru HIV a předejít tak zhroucení imunitního systému. Konečný cíl protiretrovirové terapie – eliminace viru v organismu není zatím vyřešen.

MNOHOČETNÝ MYELOM

P4/2871. ZKUŠENOSTI S LÉČBOU VZÁCNÉ GAMAPATIE SCHNITZLER SYNDROMU A ERDHEIMOVY-CHESTEROVY CHOROBY INHIBITOREM RECEPTORU INTERLEUKINU-1, PREPARÁTEM ANAKINRA

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

Schnitzler syndrom je velmi vzácné onemocnění provázené monoklonálním imunoglobulinem. Pro stanovení této diagnózy byla přijata Štrasburská kritéria (neinfekční horečka, chronická kopřivka, změny kostní struktury, leukocytóza a zvýšená hodnoty zánětlivých markerů – CRP a přítomnost monoklonálního imunoglobulinu většinou typu IgM, zcela výjimečně IgG). Léčbou volby pro tuto nemoc je blokáda účinků interleukinu-1. V praxi je nejčastěji využíván antagonist receptoru pro interleukin-1, anakinra. V současnosti se objevují zprávy i o použití dalších léků blokujících účinek interleukinu-1, canakinumab a rilonacept. Dlouhodobě léčíme 4 pacienty preparátem anakinra (108, 72, 33 a 32 měsíců). U všech nemocných jsme začali s aplikací anakinry v dávce 100 mg 1x denně. Při dávkování 100 mg 1x denně vymizely kompletně všechny příznaky u 3 nemocných, pouze u jednoho nemocného došlo k ústupu příznaků asi o 75 % nikoliv však k úplnému vymizení. Tento pacient by zřejmě potřeboval navýšení dávky alespoň ve dnech se spontánním zintenzivněním potíží. U jednoho ze 3 pacientů, u nichž příznaky při dávkování 1x denně zcela vymizely, se po roce léčby ukázalo dostačující podávat anakinru ve 48hodinových intervalech. Delší prodloužení intervalu mezi aplikacemi však netoleruje. V průběhu léčby jsme nezaznamenali žádné nežádoucí účinky anakinry a v průběhu léčby nedochází k poklesu účinnosti, aplikace anakinry jsou stejně účinné jako na začátku léčby, v průběhu let se však zvyšuje koncentrace monoklonálního imunoglobulinu a v literatuře jsou

popsány transformace nejčastěji v lymfoplazmocytární lymfom a proto kontrolujeme dřeň trepanobiopsií při závažném vzestupu koncentrace monoklonálního IgM. Erdheimova-Chesterova choroba je nemoc ze skupiny xanthogranulomu. Způsobuje také teploty, bolesti kostí hlavně dlouhých a způsobuje také fibrózu v oblasti tělních dutin a fibrotické změny cévních stěn. Popsaných léčebných alternativ je více (2-chlorodeoxyadenosin, thalidomid, lenalidomid) ale také anakinra. U jednoho z našich pacientů nereagovala jeho nemoc na žádnou z podaných léčebných alternativ vyjma anakinra. Od roku 2011 je léčen anakinrou (KINERET) a díky kterému jsou normální parametry zánětu a hlavně dle CT hodnocení jsou fibrotické změny retroperitonea stabilní, bez progresu, které pacienty ohrožuje hydronefrózou. Anakinra je přínosem minimální pro dvě krevní choroby - Schnitzler syndrom a Erdheimovu-Chesterovu chorobu.

P5/2875. DIAGNOSTIKA A PROGNOSTICKÁ STRATIFIKACE PACIENTŮ S WALDENSTRÖMOVOU MAKROGLOBULINÉMIÍ - ZKUŠENOSTI JEDNOHO CENTRA

Křupková L., Pika T., Divoká M., Orviská M., Minařík J., Papajík T. (Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc)

Úvod: Waldenströmova makroglobulinémie (WM) je vzácná hematologická malignita definovaná jako lymfoplazmocytární lymfom s infiltrací kostní dřeně a přítomností monoklonálního imunoglobulinu IgM v séru. U více než 90 % pacientů s WM je přítomna bodová mutace L265P v genu MYD88 a současně jedna třetina těchto pacientů nese frameshift (WHIM-FS) nebo non-sense (WHIM-NS) mutaci v genu CXCR4. Mutace v genu CXCR4 způsobují vznik předčasného stop kodonu, což má za následek zkrácení výsledného proteinového produktu a hyperaktivaci CXCR4-zprostředkované

Tab. 1: Mediány laboratorních parametrů u WM pacientů s nemutovaným a mutovaným genem CXCR4.

	MYD88 ^{MUT} CXCR4 ^{WHIM-WT}	MYD88 ^{MUT} CXCR4 ^{WHIM-MUT}
Hladina paraproteinů [g/l]	14,3 (3,7-32,2)	25,4 (10,6-30,9)
Infiltrace kostní dřeně [%]	25 (10-72,4)	64 (10-96)
Hladina volných lehkých řetězců [mg/l]	103,5 (26-633)	341 (317-507)
IPSS	1 (n=6); 2 (n=5); 3 (n=1)	2 (n=1); 3 (n=3)
Hemoglobin [g/l]	112,5 (89-149)	111,0 (90-117)
Trombocyty [x10 ⁹ /l]	258 (37-585)	189 (15-281)

signalizace. Přítomnost a typ mutací v genech MYD88 a CXCR4 mají význam v diagnostice a prognostické stratifikaci pacientů s WM a také ovlivňují klinickou manifestaci onemocnění. Cíle: Analyzovat mutační stav genů MYD88 a CXCR4 u pacientů s WM, porovnat výsledky s laboratorními parametry a zhodnotit prognostickou stratifikaci pacientů s ohledem na mutační status analyzovaných genů. Metody: Analyzovaná DNA byla izolována z mononukleární frakce buněk kostní dřeně v době diagnózy. Mutační stav sledovaných genů byl stanovován pomocí alelově-specifické PCR (v případě MYD88) a pomocí přímého Sangerova sekvenování (v případě CXCR4). Všechny nalezené mutace byly potvrzeny restričním štěpením za definovaných podmínek. Výsledky: Analyzovali jsme skupinu pacientů s WM (n=16). U 15 pacientů (93,8 %) jsme potvrdili přítomnost mutace L265P v genu MYD88 a současně u 4 pacientů (25 %) i mutaci v genu CXCR4 (1 pacient byl nositelem WHIM-FS mutace a 3 byli nositeli WHIM-NS mutace). Přítomnost CXCR4 mutace byla spojena s agresivnější chorobou (vyšší IPSS, pancytopenie, vyšší hladina paraproteinů a volných lehkých řetězců v séru, vyšší infiltrace kostní dřeně; Tab. 1), naopak pacienti s nemutovaným CXCR4 byli často asymptomatictí. CXCR4 mutace byly také spojeny s horší léčebnou odpovědí (2 pacienti byli rezistentní a 2 měli částečnou odpověď na prvoliniovou terapii). Závěr: Analýza mutačního stavu genů MYD88 a CXCR4 je nepostradatelnou součástí diagnostiky a prognostické stratifikace pacientů s WM a umožňuje hlubší pochopení molekulární patogeneze tohoto onemocně-

ní. V souladu s publikovanými daty jsme potvrdili, že mutace v genu CXCR4 jsou asociovány s agresivnějšími projevy onemocnění a ovlivňují léčebnou odpověď.

Tato práce byla podpořena grantem IGA-LF-2016-001.

P6/2882. STUDIUM SÉROVÝCH PROTEINOVÝCH PROFILŮ U MONOKLONÁLNÍ GAMAPATIE NEJASNÉHO VÝZNAMU A MNOHOČETNÉHO MYELOMU

Schneiderová P., Pika T., Gajdoš P., Fillerová R., Krömer P., Kudělka M., Minařík J., Papajík T., Študla V., Kriegová E. (Ústav imunologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc; Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc; Katedra informatiky, Fakulta elektrotechniky a informatiky, Vysoká škola báňská - Technická univerzita, Ostrava)

Monoklonální gamapatie jsou velmi heterogenní skupinou onemocnění, která jsou charakteristická proliferací diferencovaných B-lymfocytů. U těchto nemocí se stále hledají neinvazivní biomarkery, vhodné pro spolehlivou diagnostiku jednotlivých typů a v případě maligních gamapatií ke sledování léčebné odpovědi. S cílem popsat sérové profily charakteristické pro monoklonální gamapatii nejistého významu (MGUS) a mnohočetný myelom (MM) a jeho změny po autologní transplantaci krvetvorných buněk (ASCT) jsme analyzovali proteinové profily 92 kandidátních nádorových biomarkerů pomocí inovativní, vysoce senzitivní „Proximity Extension ImmunoAssay“ (Proseek

Multiplex, Olink). Soubor tvořili pacienti s MGUS (n=16), MM (n=16) a kontrolní zdraví jedinci (n=7); u pacientů s MM byly analyzovány také párové vzorky po ASCT (den 100). Pro statistické zpracování dat jsme použili Mann-Whitney-Wilcoxon test s korekcí P-hodnot metodou FDR (Benjamini-Hochberg) a klasifikační algoritmy. U pacientů s MM byly pozorovány vyšší hladiny adrenomedullinu (Pcorr=0,0004), GDF15 (Growth differentiation factor 15, Pcorr=0,003) a solubilního MICA (Major histocompatibility complex class I-related chain A, Pcorr =0,023), které přispívají k přežívání myelomových buněk, ve srovnání s MGUS. Zajímavý je nálezní zvýšené hladiny aktivačního faktoru pro B-buňky BAFF (B-Cell Activating Factor, Pcorr=0,00006) u MM pacientů po ASCT ve srovnání s párovým MM při diagnóze; sérový profil po ASCT byl charakteristický zvýšenými hladinami řady pro-nádorových. Prioritní je také popis zvýšené hladiny angiogenního a antiapoptotického faktoru midkin (Pcorr=0,0007) ve skupině MGUS oproti zdravým kontrolám. Popsali jsme sérové profily charakteristické pro MGUS, MM a MM po ASCT. Znalost proteinových profilů asociovaných s MGUS a MM může přispět k identifikaci klíčových molekul, které přispívají k přežívání myelomových buněk a které by se mohly stát novými terapeutickými cíli. Grantová podpora: MZ ČR VES16-32339A, LFUP_2016_001, LFUP_2016_011.

P7/2887. KONTINUÁLNÁ LIEČBA LENALIDOMIDOM PRI RELABOVANOM MNOHOPOČETNOM MYELÓME

Masárová K., Bátorová A., Mistrík M., Štefániková Z. (Klinika hematológie a transfuziológie, Univerzitná nemocnica, Bratislava)

Zavedenie talidomidu, bortezomibu a lenalidomidu významne zmenilo liečbu mnohopočetného myelómu (MM). Lenalidomid má duálny mechanizmus účinku: priamo spôsobuje smrť nádorových buniek a navyše má významný imunomodulačný účinok, ktorý prispieva k udržaniu remisie. U pacientov s relabovaným alebo refraktérnym MM lenalidomid v kombinácii s dexametazónom signifikantne predĺžil čas do progresie, zvýšil celkové odpovede aj mieru kompletných remisí a predĺžil celkové prežívanie v porovnaní so samotným dexametazónom. Navyše lenalidomid je obvykle dobre tolerovaný, s iniciálnou myelosupresiou ako najvýznamnejšou toxicitou. Lenalidomid nemá kumulatívnu toxicitu, čo umožňuje kontinuálnu liečbu. Tieto závery potvrdzuje aj kazuistika 51-ročnej pacientky s relabovaným mnohopočetným myelómom (MM), diagnostikovaným v roku 2008, ktorá je od januára 2011 liečená kombináciou lenalidomid+ +dexameta-

zón+cyklofosfamid v štvrtej línii. U tejto značne predliečenej pacientky sa dosiahla PR, ku dnešnému dňu dostala 33 cyklov, liečbu toleruje dobre. Po 20 cykloch sme dávku lenalidomidu redukovali z pôvodných 25 mg na 15 mg. V prestávkach liečby, zapríčinených prolono-govaným procesom schvaľovania úhrady v poisťovni vždy dochádza k zvýšeniu hladiny CB, M-Ig aj počtu plazmatických buniek v kostnej dreni, po opätovnom nasadení terapie sa prejavuje pokles uvedených hodnôt.

P8/2888. DLOUHÉ NEKÓDUJÍCÍ RNA V PATOFYZIOLOGII MNOHOČETNÉHO MYELOMU

Sedlaříková L., Gromesová B., Kubaczková V., Radová L., Almáši M., Penka M., Adam Z., Pour L., Krejčí M., Hájek R., Ševčíková S. (Babáková myelomová skupina, UPF, LF MU, Brno; Ceitec, Masarykova univerzita, Brno; Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Brno; Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Brno; Klinika hematookologie, Fakultní nemocnice, Ostrava)

Úvod: Tato práce si klade za cíl zjistit, zda dysregulace signálních drah, které jsou příznačné pro mnohočetný myelom (MM) by mohly být alespoň částečně způsobeny podskupinou nekódujících RNA, tzv. dlouhými nekódujícími molekulami RNA (lncRNA). Tyto více než 200 nukleotidů dlouhé molekuly se nacházejí především v jádře buněk a podílejí se na významných buněčných procesech jako je např. proliferace, diferenciace a apoptóza. Zdá se, že tyto molekuly mají klíčovou roli v patogenezi lidských onemocnění, včetně nádorových, kde se podílejí na nádorové transformaci a progresi onemocnění. Cílem studie bylo identifikovat profil buněčných lncRNA souboru pacientů s MM a zdravých dárců (ZD) a porovnat je s klinickými parametry. Materiál a metody: Celkem bylo získáno padesát vzorků CD138+ buněk od pacientů s MM v době diagnózy a od ZD. Screeningová fáze práce zahrnovala analýzu 83 lncRNA a byla provedena u 6 pacientů s MM a 6 ZD pomocí RT2 lncRNA PCR Array – Human lncRNA Finder (Qiagen). Statisticky významně (p<0,05) deregulované lncRNA mezi MM a ZD byly validovány s využitím qPCR a přístupu relativní kvantifikace 2-ΔCt na větším souboru pacientů a ZD. ROC analýza (Receiver Operating Characteristic) byla provedena pro stanovení specifity a sensitivity každé lncRNA. P hodnoty <0,05 byly považovány za statisticky významné. Výsledky: Profilování pomocí RT2 lncRNA PCR Array odhalilo 27 deregulovaných lncRNA (všechny p<0,01) mezi MM pacienty a ZD. Hladiny exprese ZFAS1, UCA1, BDNF-AS, NEAT1

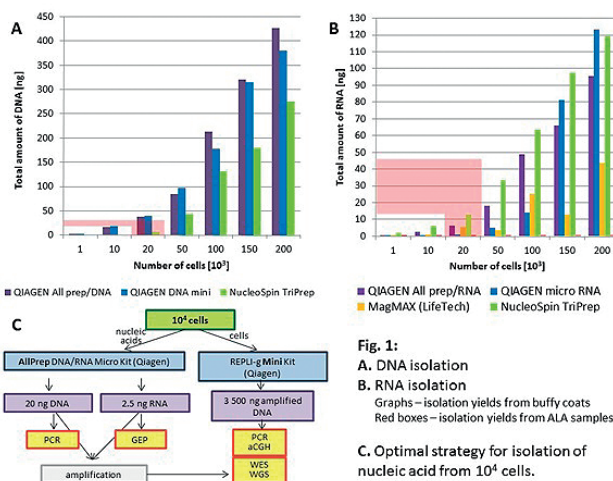
a FAS-AS1 byly dále validovány na větším souboru MM pacientů a ZD. Hladina exprese UCA1 byla významně snížena ($p < 0,0001$), hladiny exprese NEAT1 a BDNF-AS byly naopak zvýšeny u MM pacientů ve srovnání se ZD (obojí $p < 0,0000001$). Pro odlišení MM od ZD byla provedena analýza ROC. Ta odhalila 100% senzitivitu a 100% specificitu s AUC (area under curve) 1,000 pro NEAT1 a BDNF-AS expresi. A dále 95,24% senzitivitu a 75% specificitu s AUC 0,905 pro expresi UCA1. Závěr: Naše data naznačují, že lncRNA UCA1, NEAT1 a BDNF-AS mohou být zapojeny do patofyziologických procesů probíhajících v MM buňkách a podněcují tak další studie této problematiky. Podpořeno grantem: AZV 15-29508A

P9/2914. SAMPLE PRE-PROCESSING FOR DOWNSTREAM APPLICATION IN AL AMYLOIDOSIS

Filipová J., Growková K., Kufová Z., Ševčíková T., Hanusová H., Vrublová P., Kryukova E., Zahradová L., Kryukov F., Hájek R. (Faculty of Medicine, University, Ostrava; Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University, Ostrava; Blood Cancer Research Group, Department of Haemat oncology, University Hospital, Ostrava)

Introduction: Immunoglobulin light chain amyloidosis (ALA) is clonal plasma cell dyscrasia. Abnormal plasma cell (aPC) clones produce Ig light chains, which are stored in the affected organs and leads to their malfunction. ALA is characterized by lower PCs infiltration (mean 3,87 %; range 0,17 - 9,34) compared to multiple myeloma (Hu et al., 2014). Due to low number of target cells and incidence approx. 10 cases per million per year (Merlini & Palladini, 2013), correct

sample pre-processing is essential for all downstream application. Objective: To optimize protocol for sample processing in ALA research for a future examination by molecular biology techniques. Methods: This study was approved by institutional ethical review boards and all individuals provided written informed consent. The bone marrow was obtained during routine diagnostic procedure. Buffy-coats of healthy donors were kindly presented by Blood Centre, UH Ostrava. Mononuclear cells (MNC) were isolated by density gradient centrifugation. MNC were frozen in FBS containing 10% DMSO. Prior to nucleic acid isolation, samples were thawed and prepared for fluorescence activated cell sorting. Subsequent DNA/RNA processing optimization was done using buffy-coats of healthy donors and following kits: AllPrep DNA/RNA Micro Kit, QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), NucleoSpinTriPrep (Macherey-Nagel), RNeasy Micro Kit (Qiagen), MagMAX Total RNA Isolation Kit (Life Technologies), microMACS mRNA Isolation Kit (MiltenyiBiotec). Amplification kits: REPLI-g Mini Kit, REPLI-g Single Cell Kit (Qiagen). Nucleic acid concentrations were measured using Qubit® 3.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific) and RNA integrity number (RIN) was evaluated using Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). DNA amplification specificity and reproducibility was checked by PCR and quantitative PCR on LightCycler® 480 (Roche). ALA BM aPC (CD45dimCD38+CD19-CD56+/-) were sorted by FACS Aria III (Becton Dickinson) and DNA/RNA were isolated by AllPrep DNA/RNA Micro Kit. Results: Comparison of DNA/RNA isolation kits is presented in Fig. 1A, B. Based on these results, best strategy for ALA pre-processing was chosen and three samples were prepared. Total PC infiltration was 0,5 - 4,3 %. Population of aPC (CD45dimCD38+CD19-CD56+/-) with infiltration of 57,3 - 90,8 % from PC was sorted. Number of sorted cells ranged between 15 371 - 22 846. DNA yield was 20,6 - 27,6 ng, RNA yield was 14,4 - 46 ng (RIN >9,5). DNA was amplified using REPLI-g Mini Kit with yield 2 060 - 4 300 ng and amplification specificity was checked by PCR. Optimal strategy for sample pre-processing for molecular biology applications including high-throughput “omics” is presented in Fig. 1C. Conclusion: The proposed lab guideline for ALA sample processing was prepared to present the optimal way of cells collection and proper handling in order to maximize sample quality for further use. This guideline can be used to standardized research in the field of molecular biology for not only ALA samples but also for other haematological malignancies. Acknowledgment: Supported by The Ministry of Education, Youth and Sports (Specific university research of the Faculty of Medicine, University



of Ostrava) project no. SGS03/LF/2015-2016, SGS09/LF/2016-2017; Development Plan of University of Ostrava (IRP201550); MH CZ - DRO - FNOs/2015-2016 and by the Ministry of Health (15-29667A).

P10/2924. ANALÝZA VARIANTNÍCH NÁLEZŮ POČTU SIGNÁLŮ PŘI URČENÍ TRANSLOKACE T(4;14) METODOU FICTION U NEMOCNÝCH S MNOHOČETNÝM MYELOMEM POSTER

Balcárková J., Mlynářčiková M., Mičková P., Ščudla V., Pika T., Bačovský J., Minařík J., Jarošová M. (*Hemato-onkologická klinika, FN, Olomouc*)

Mnohočetný myelom (MM) je charakterizován četnými chromozomovými změnami prognostického významu. Jednou z nich je translokace t(4;14) (p16.3;q32.3), která je spojena s nepříznivou prognózou. Jejím důsledkem je deregulace genů MMSET a FGFR3. Cílem práce bylo analyzovat geny IgH, FGFR3 a MMSET metodou FICTION v souboru nemocných s MM, určit frekvenci translokace t(4;14) a variantních nálezů počtu signálů této translokace, u opakovaně vyšetřených nemocných studovat klonální vývoj a vyhodnotit význam variantních nálezů. V souboru 533 nemocných s MM byla t(4;14) potvrzena u 66 (12,4 %) nemocných, z toho u 21 (32 %) nemocných byla zjištěna abnormalita v počtu signálů. Abnormalita v počtu signálů při vyšetření přestavby IgH genu byla zjištěna u 15 z 21 (71 %) nemocných, zatímco analýza genů FGFR3 a MMSET potvrdila variantní nález u 12/21 nemocných (57 %). Současně s variantním nálezem t(4;14) byly u všech nemocných nalezeny další přídatné chromozomové změny, nejčastěji delece 13q a zmnóžením oblasti 1q21. U 3 z 9 opakovaně vyšetřených nemocných byl pozorován klonální vývoj. Naše výsledky upozorňují na existující heterogenitu FICTION nálezů při určení t(4;14) a na skutečnost, že změny v počtu signálů při vyšetření přestavby genu IgH, způsobené především delecí, mohou maskovat translokaci, a proto je nutné pro určení translokací u MM používat specifické translokační sondy. Přestože nález variantních počtů signálů při určení translokace nepotvrdil statisticky významný vliv na celkové přežití nemocných, vzhledem k prognostické významnosti translokace t(4;14) neurčení změny může také významně ovlivnit terapeutický přístup. Práce byla podporována grantem IGA MZČR NT/14400-3, IGA_LF_2016_001.

P11/2938. BUNĚČNÁ ANALÝZA PLASMACYTOIDNÍCH DENDRITICKÝCH BUNĚK U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

Králová R., Říhová L., Všianská P., Krchniaková M., Piskáček M., Pacasová R., Penka M., Adam Z., Pour L., Knight A. (*Lékařská fakulta, Ústav patologické fyziologie, Masarykova univerzita, Brno; Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice, Brno; Tkáňové a transfuzní oddělení, Fakultní nemocnice, Brno; Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Brno; Klinika hematoonkologie, Fakultní nemocnice, Ostrava*)

Úvod: Plasmacytoidní dendritické buňky (pDC) jsou malou populací leukocytů. Ve zdravém organismu hrají důležitou roli jako antigen prezentující buňky, díky produkci interferonu typu I aktivují další složky imunitního systému k boji proti nádorově transformovaným buňkám. Mnohočetný myelom (MM) je maligní onemocnění, postihující zejména starší pacienty okolo věku 65 let. Klonálně zmnóžené plazmatické buňky produkují patologický imunoglobulin tzv. paraprotein. Je známo, že pDC u pacientů s MM akcelerují proliferaci maligních myelomových buněk a způsobují nežádoucí rezistenci k používané myelomové terapii (Chauhan et al., 2009). Cíl: Cílem projektu bylo určení počtu pDC v periferní krvi (PK) a kostní dřeni (KD) pacientů s novou diagnózou MM a srovnání s frekvencí pDC zdravých dárců ve stejné věkové skupině. Druhým cílem bylo určení fenotypu pDC u zdravých dárců a srovnání s fenotypem pDC u pacientů s MM. Pacienti a metody: Do studie bylo zahrnuto 10 párových vzorků KD a PK pacientů s MM ve věku (48-81 let; medián 65 let), zastoupení mužů/žen = 5/5. Jako reference sloužily vzorky periferní krve zdravých dárců, n = 17, věk (56-72 let; medián 64 let), zastoupení M/Ž = 12/5. Z PK či KD pacientů a dárců byly izolovány PBMC (nebo BMNC) metodou gradientové centrifugace. Analýza vzorků byla provedena průtokovou cytometrií pomocí monoklonálních protilátek na cytometru FACS CantoII (BD Biosciences). pDC byly definovány s použitím CD123 (klon AC145), CD303 (AC144) a CD304 (AD5-17F6). Jejich aktivní fenotyp byl určen kombinací znaků HLA-DR (Immu-357) a CD45RA (HI100), kdy aktivované pDC jsou na oba znaky pozitivní. Bylo analyzováno minimálně 250-7500 živých pDC. Výsledky byly analyzovány pomocí FlowJo software, (TreeStar, verze 10.1). Výsledky: Procentuální zastoupení pDC v krvi zdravých dárců bylo identifikováno v rozmezí 0,022-0,27 % (medián 0,068 %). V krvi pacientů s MM se nacházelo 0,028-0,31 % pDC; (medián 0,0635 %). Všechny vzorky krve zdravých dárců měly aktivní celou populaci pDC na rozdíl od

pacientů s MM, kdy $n = 4$ (100% aktivace pDC), $n = 4$ ($> 80\%$) a $n = 2$ ($< 50\%$ aktivovaných pDC). V kostní dřeni MM pacientů bylo určeno pDC v rozmezí 0,045-0,22%; (medián 0,0875%), kdy poměr aktivovaných buněk v populaci pDC byl: $n = 4$ (100% aktivovaných pDC), $n = 3$ ($> 80\%$) a $n = 3$ (60-70%). V současné době probíhá analýza dalších párových vzorků pacientů s MM a zdravých dárců. Závěr: Mediány pDC v krvi zdravých dárců a pacientů s MM jsou ve stejných hladinách a statisticky se neliší. V kostní dřeni MM pacientů bylo určeno zvýšené procento pDC než v periferní krvi ($p = 0,12$). Naše předběžné výsledky ukazují rozdíly fenotypu pDC u zdravých dárců a pacientů s MM přítomných jak v PK, tak KD, které budou dále ověřeny ve funkčních esejích. Rozdíly v zastoupení a v aktivaci populace pDC v kostní dřeni u zdravých dárců a pacientů by mohly hrát důležitou roli pro patologickou funkci pDC v nádorovém mikroprostředí myelomu.

P12/2942. ANALÝZA EXPRESIE RECEPTOROV EPHA1 A EPHA2 U NÁDOROVÝCH BUNKOVÝCH LÍNIÍ

Krchniaková M., Králová R., Piskáček M., Knight A.
(*Lékařská fakulta, Ústav patologické fyziologie, Masarykova univerzita, Brno*)

ÚVOD: Ephriny představují největší známou rodinu tyrozínkinázových receptorů a jejich ligandů. Bývají hojně produkovány zejména počas embryonálního vývoje, zatímco v dospělých tkáních jsou nacházeny jen v nízkých hladinách. K jejich hlavním funkcím patří regulace růstu buněk, jejich proliferace a migrace. Tieto vlastnosti sú však v dospělých tkáních prirodzene malígnym bunkám, a preto je väčšina ephrinových proteínov považovaných za onkogény. Ich abnormálne vysoká expresia je spájaná so vznikom a vývojom solídnych nádorov najmä epiteliálneho pôvodu, zvýšeným rizikom vzniku metastáz a zníženým prežívaním pacientov. Doposiaľ však nie je známa expresia ephrinov a ich receptorov u hematooonkologických ochorení ako je mnohopočetný myelóm. **CIEĽ:** Cieľom bola analýza povrchovej expresie receptorov EphA1 a EphA2 pomocou viacfarebnej flow cytometrie a paralelna analýza expresie proteínov pomocou Western blotu v modelovom systéme komerčných nádorových bunkových línií. Ako kontrola slúžili bežne dostupné línie zdravých buniek. **MATERIÁL A METÓDY:** Boli analyzované suspenzné nádorové línie mnohopočetného myelómu (KMS11, EJM), chronickej B-lymfocytárnej leukémie (MEC1), chronickej myeloidnej leukémie (KYO-1, LAMA-84), akútnej monoblastickej leukémie (CTV-1a) a lymfómu (U937). Nádorové bunky boli zo suspenzných kultúr izolované

v exponenciálnej fázi ich rastu. Ďalej boli analyzované adherentné nádorové línie renálneho karcinómu (A-498), karcinómu prostaty (DU-145), kolorektálneho adenokarcinómu (HT-29), karcinómu prsníku (MCF-7) a multiformného glioblastómu (U373). Ako kontrola boli zaradené zdravé bunkové línie, a to ľudské astrocyty (pasáž 4) a ľudské fibroblasty (MRC-5, pasáž 38). Bunky z adherentných kultúr boli izolované v približne 80% konfluencii pomocou Trypsín-EDTA. Analýza povrchovej expresie EphA1 a EphA2 (R&D Systems) prebiehala na prietokovom cytometri FACS Canto II (BD, Becton Dickinson), pričom pri akvizícii bolo analyzovaných minimálne 100 000 udalostí živých buniek. Získané dáta boli analyzované pomocou programu FlowJo (TreeStar; verzia 10.1). **VÝSLEDKY:** Epiteliálne nádorové línie (A-498, DU-145, HT-29) vykazovali silnú pozitivitu na EphA2, zatiaľ čo na EphA1 boli len slabozpozitívne. Línia MCF-7 bola na oba receptory slabozpozitívna. Glioblastomová línia U373 vykazovala negativitu na EphA1 aj EphA2. Leukemické a myelómové suspenzné nádorové línie boli negatívne na EphA1 aj EphA2, iba línia LAMA-84 vykazovala slabú pozitivitu na EphA1. Čo sa týka línií zdravých buniek, MRC-5 aj ľudské astrocyty boli pozitívne na EphA2, ale negatívne na EphA1. V súčasnosti prebieha u bunkových línií analýza expresie proteínu EphA2 pomocou Western blotu. **ZÁVER:** Naše výsledky potvrdili povrchovú expresiu receptorov EphA1 a EphA2 u nádorových línií epiteliálneho pôvodu, akými sú agresívny karcinóm prostaty (DU-145), čreva (HT-29) či obličiek (A-498). Na rozdiel od adherentných línií, leukemické a myelómové línie boli na dané receptory negatívne. V súčasnosti je analyzovaná kohorta pacientov s mnohopočetným myelómom. Naše novo získané dáta tak po prvýkrát ukážu expresiu ephrinových receptorov nielen na primárnych nádorových bunkách pacientov, ale aj na ďalších populáciách buniek nádorového mikroprostredia vrátane stromálnych a dendritických buniek.

P13/2950. ZMENY METABOLIZMU ŽELEZA PRI MNOHOPOČETNOM MYELÓME PRED A PO TRANSPLANTÁCII KOSTNEJ DRENE

Nosál M., Štefániková Z., Stecová A., Gáboríková M., Pospíšilová D., Holub D., Ladická M. (*Nem. Staré Mesto UNB, Bratislava; Klinika hematologie a transfuziologie LFUK, UNB, SZU, Nem.sv. Cyrila a Metoda, Bratislava; Medirex s.r.o, Bratislava - SR; Dětská klinika LFUP a FN Olomouc - CZ; Ústav molekulární a translační medicíny, LFUP, Olomouc -CZ*)

Úvod: Hepcidin je nízkomolekulový peptidický hormón objavený pred 15 rokmi, ktorý pozostáva z 25 ami-

nokyselín (AMK) a je hlavným regulátorom homeostázy železa (Fe). Zaisťuje komunikáciu medzi miestami ukladania Fe (hepatocyty a makrofágy) a miestami vstrebávania Fe (enterocyty) a spotreby (erytroidné bunky) alebo recykluje a uvoľňuje Fe do krvného obehu (makrofágy). Syntéza hepcidinu je riadená podnetmi, ktoré reagujú na zápal, aktivitu erytropoézy, hladinu Fe, jeho zásoby v organizme a napätie kyslíka. Kľúčovú úlohu v expresii hepcidinu hrajú prozápalové cytokíny IL-6, IL-10, TNF-a a LPS. Zvýšenie hladiny hepcidinu vedie k zadržaniu Fe v enterocytoch a makrofágoch a ku zníženiu jeho hladiny v plazme. Štúdie u pacientov s mnohopočetným myelómom, Hodgkinovým lymfómom, akútnou leukémiou a Waldenstromovou makroglobulinémiou, poukazujú na zvýšené hladiny sérového hepcidinu a nepriamo korelujú s hladinou hemoglobínu. Cieľ: zistiť zmeny metabolizmu železa pri mnohopočetnom myelóme, aké sú zmeny pred a po trasnsplantácii kostnej drene. Metodika: vyšetrili sme 67 pacientov s mnohopočetným myelómom, 15 pacientov s anémiou chronických ochorení pri zápalových ochoreniach, 18 pacientov kontrol, bez hematologického ochorenia. Vyšetřili sme FeS, Trf., sat.Trf., Feritin, solub.Trf.receptor, index = solub.Trf.rec./log., Feritin, IL-6, CRP, Epo, Hepcidin ELISA a SOLDI-TOF HPLC. Výsledky: Dosiahli sme nasledujúce hodnoty pre: Feritín pre skupinu kontrola 57,2 (15,5 - 257), Myelom 223,7 (18,6 - 2 489), ACD 988,1 (92,3 - 2 680). Hodnoty sú prezentované ako medián (min - max). Kontrola vs. ACD $p < 0,001$; Kontrola vs. myelóm $p = 0,003$; ACD vs. myelóm $p = 0,154$. IL-6 kontrola 2,85 (2,83 - 6,22), Myelom 5,47 (4,06 - 96,6), ACD 27,29 (11,43 - 1102). Kontrola vs. ACD $p < 0,001$; Kontrola vs. myelom $p = 0,024$; ACD vs. myelóm $p > 0,05$. Hepcidin ELISA kontrola 10,5 (0,12 - 33,2), Myelom 20,9 (0,33 - 78,2), ACD 35,6 (4,91 - 51,0). Kontrola vs. ACD $p = 0,30$; Kontrola vs. myelom $p = 0,46$; ACD vs. myelóm $p = 0,94$. Hemoglobín významne negatívne koreloval s hodnotami hepcidínu meranými oboma metódami. Silnejšie s Chromatograficky meranou. Hepcidin ELISA vs. Hb $\rho = -0,50$ 95% interval spoľahlivosti (-0,79 to -0,02) $p = 0,045$ Hepcidin Chromatografia vs. Hb $\rho = -0,75$ 95% interval spoľahlivosti (-0,92 to -0,34) $p = 0,004$ Záver: ztistili sme zmeny najmä hladiny feritínu, prozápalového cytokína - IL-6 a negatívnu koreláciu medzi hemoglobínom a hepcidinom tzn., že čím je vyšší hepcidín, tým je nižšia hladina hemoglobínu. Zazmenanali sme významné zlepšenie metabolizmu železa po trasplantácii kostnej drene.

P14/2954. PLASMA CELL DYSCRASIAS AND BONE MARROW MICROENVIRONMENT

Flodr P., Minařík J., Flodrová P., Pika T., Bačovský J., Krhovská P., Ščudla V. (Department of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc; Department of Hematology, University Hospital, Olomouc)

Objective: Neoplastic niche is an important micro-environment for growth, retention/adhesivity, survival, resistency or sensitivity to a therapeutic approach in all malignant diseases. We contextually studied neoplastic cells and their non-neoplastic supportive tissue in multiple myeloma and MGUS according to expressions of MIP1alfa, Annexin A2, TRAP, DKK-1, RANK, RANKL, OPG, Sclerostin, Activin A, NFkappaB proteins, p62, MMP9 and RUNX2. Methods: Bone marrow trephine biopsy specimens (n=96) with multiple myeloma (de novo and relapsed) or MGUS were included in our prospective study. FFPE tissues were processed in app. 5mm sections and placed on plus charged slides. The indirect immunohistochemistry was applied after antigen retrieval. Primary antibodies were used for the detection of observed proteins. Standard secondary antibody and ABC method were included in visualisation. The detected expressions were analysed. Results: Bone marrow specimens showed variable positivity of observed proteins with high levels in MIP1alfa, Annexin A2, RANK, RANKL, Sclerostin, p52 (cytoplasmic), p62 (cytoplasmic), p65 (cytoplasmic), RUNX2 and low levels in TRAP, DKK-1, OPG, Activin A, p50 (cytoplasmic), MMP9. Conclusion: The exact and contextual knowledge of engaged signaling pathways and their plasticity may suggest more specific or tailored therapeutic approaches (e.g. anti-RANKL, anti-DKK-1, anti-Sclerostin, anti-Activin A) in each individual case with corresponding regressive, stabile or progressive behavior mirrored in complex interactions between multiple cell types, both neoplastic and non-neoplastic origin. Supported by NT 14393.

P15/2949. APLIKACE HEVYLITE REAGENTS V HISTOLOGICKÉM VYŠETŘENÍ TREPANOBIOPTICKÝCH TKÁŇOVÝCH VZORKŮ

Flodrová P., Flodr P., Pika T. (Ústav klinické a molekulární patologie LF UP, Olomouc; Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc)

Úvod Primární protilátky, které se váží současně na těžký a lehký řetězec imunoglobulinu, patří mezi nové reagentie s využitím mimo jiné v imunohistoločce

standardně odvápňených trepanobiopsických vzorků a u jednoho pacienta s LPL také na vzorku lymfatické uzliny. Panel imunohistochemického vyšetření zahrnoval primární protilátky anti-CD138, anti-kappa, anti-lambda, anti-CD79a, anti-IgM, anti-IgG, anti-IgA a duální protilátky proti těžkému/lehkému řetězci (IgGkappa, IgGlambda, IgMkappa, IgMlambda, IgA kappa). Kombinace duální protilátky proti těžkému/lehkému řetězci byla vybrána pro konkrétní vzorky podle dříve diagnostikovaného typu produkovaného lehkého řetězce. Výsledky CD138+ buňky byly ve vzorcích zastoupeny v rozmezí 30-90%. V polovině případů jsme pozorovali pozitivitu všech tří duálních protilátek, ve zbývajících čtyřech vzorcích byly pozitivní dvě duální protilátky (IgMkappa nebo IgMlambda, IgGkappa nebo IgGlambda). Při vyšetření protilátkami proti samostatným těžkým řetězcům byly ve všech vzorcích detekovány nádorové buňky s pozitivitou IgG, IgA pozitivita se vyskytovala pouze u případu IgA myelomu a IgM pozitivní buňky byly zjištěny pouze u lymfoplazmocy-

tárního lymfomu. Diskuze a závěr V pilotní studii o používání duálních heavy/light chain primárních protilátek jsme zjistili vysoké zastoupení falešně pozitivních výsledků. Vzorky od pacientů s IgG myelomem byly pozitivní také v reakci s duální protilátkou s těžkým řetězcem IgM a IgA, ačkoliv samostatné stanovení anti-IgM a anti-IgA bylo negativní. Současnou pozitivitu IgM/lehký řetězec a IgG/lehký řetězec u vyšetřených LPL nelze spolehlivě hodnotit, neboť v těchto neoplastických buňkách je exprese obou těžkých řetězců popisovaná. Jeden trepanobiopsický vzorek s LPL však byl pozitivní také s anti-IgAlambda, přičemž vyšetření anti-IgA bylo negativní. Z našich výsledků vyplývá, že použití heavy/light chain protilátek u vzorků kostní dřeně je značně limitováno s předpokladem neduální „single“ vazby jedné součásti duální protilátky. Předpokládáme i možný vliv preanalytické fáze zpracování vzorků při procesu odvápňení trepanobiopsických tkání. Tyto hypotézy je nutno ověřit v pokračování studie. Grantová podpora: IGA_LF_2016_013.

AKUTNÍ LEUKEMIE/ CHRONICKÁ MYELOIDNÍ LEUKEMIE

P16/2996. MOLEKULÁRNÍ ODPOVĚĎ JAKO PROGNOSTICKÝ FAKTOR U PACIENTŮ S AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ A SE ZVÝŠENOU EXPRESÍ WT1

Polák J., Petrboková R., Šálek C., Hájková H., Kouba M., Mertová J., Soukup P., Válková V., Cetkovský P. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Úvod. WT1 patří mezi antigeny spojené s leukémií. Měření jeho exprese může být využito ke sledování minimální reziduální nemoci (MRN) zejména těch pacientů, jimž nebyl identifikován specifický molekulární markér. Cíl. Posouzení prognostického vlivu míry exprese genu WT1 při diagnóze a v průběhu léčby. Pacienti a metody. Studie zahrnuje kohortu 84 pacientů (medián věku 52 let, rozpětí 21-66 let; medián doby sledování 1,9 let, rozpětí 0,6-7,1 let), kteří byli léčeni od r. 2008 do r. 2014. Pacienti měli vysokou expresi genu WT1 při diagnóze a dosáhli hematologické remise po 1 až 2 cyklech indukční chemoterapie. Konsolidační chemoterapie se skládala z 3-4 cyklů chemoterapie nebo z alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT) v závislosti na cytogenetických a molekulárních charakteristikách a na odpovědi na první cyklus indukční chemoterapie. Pro kvantifi-

kaci exprese genu WT1 byla použita standardizovaná metodika podle doporučení Evropské leukemické sítě (ELN). Horní normální limit byl definován jako exprese ≤ 50 kopií genu WT1/10x4 kopií referenčního genu ABL v periferní krvi. Pro monitorování MRN byli vhodní jen pacienti s expresí genu WT1 při diagnóze větší než 500 kopií WT1/10x4 ABL. Molekulární odpověď (MR) byla definována jako pokles exprese genu WT1 pod hodnotu < 50 kopií/10x4 ABL. Výsledky. Pacienti s expresí genu WT1 při diagnóze v rozmezí > 500 a ≤ 5000 kopií WT1/10x4 ABL měli 3leté přežití (OS) 70 % a přežití bez události (EFS) 50 %, zatímco pacienti s > 5000 kopiemi měli OS 50 % a EFS 25 % ($p=0,036$ pro OS a $0,030$ pro EFS). Nedosažení MR bylo silným prognostickým faktorem pro přežití v celkové kohortě (3leté OS 63 % vs. 27 %, $p<0,001$; 3leté EFS 38 % vs. 0 %, $p<0,001$); u pacientů léčených pouze chemoterapií (3leté OS 66 % vs. 34 %, $p=0,002$; 3leté EFS 31 % vs. 0 %, $p=0,009$); jakož i u pacientů, kteří podstoupili HSCT v první kompletní remisi (3leté OS 70 % vs. 30 %, $p=0,009$; 3leté EFS 62 % vs. 12 %, $p<0,001$). Medián doby do dosažení MR byl 3,0 měsíce (95%CI 2,8-3,1) a nebyl závislý na míře exprese WT1 před léčbou. Dosažení MR před započítáním konsolidační terapie nebylo prognosticky významné (3leté OS 67 % vs. 51 %; $p=0,089$). Ze 43 WT1 pozitivních pacientů v tomto

časovém okamžiku jich 33 (77 %) dosáhlo MR po další fázi léčby (chemoterapii nebo HSCT). Z 27 pacientů, kteří byli pozitivní před I. konsolidací a kteří obdrželi další konsolidační cyklus, jich 22 (81 %) dosáhlo MR po II. konsolidaci. Nebyl nalezen rozdíl v přežití mezi pacienty, kteří nikdy nedosáhli MR a mezi těmi s molekulárním relapsem. Za použití vícerozměrné analýzy byly jako signifikantní prognostické faktory pro OS a EFS identifikovány hladina exprese genu WT1 při diagnóze a schopnost dosáhnout MR. Provedení HSCT v první linii léčby bylo dalším pozitivním prognostickým faktorem pro EFS. Expresí genu WT1 před provedením HSCT byla jediným signifikantním prognostickým znakem pro OS a EFS u transplantovaných pacientů. Závěr. Expresí genu WT1 při diagnóze koreluje s přežitím. Monitorování exprese WT1 je citlivým nástrojem pro sledování MRN u pacientů s jeho zvýšenou expresí při diagnóze. Neschopnost dosáhnout MR je silným indikátorem relapsu. Tito pacienti mohou profitovat z další intenzifikace léčby.

P17/2984. SROVNÁNÍ SIMPLEX RT-PCR A KVANTITATIVNÍ RT-PCR PŘI SLEDOVÁNÍ HLADINY TRANSKRIPTU NUCLEOPHOSMINU NPM1 U PACIENTŮ S AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ V HEMATOLOGICKÉ REMISI

Navrátilová J., Szotkowski T., Raida L., Lipert J., Indrák K., Papajík T. (Laboratoř molekulární biologie HOK FNOL, Olomouc)

Úvod: Prognostický význam mutací genů CEBP α , FLT3-ITD, NPM1 či přítomnosti fúzních genů typu PML/RAR α , RUNX1/RUNX1T1 a některých dalších je poměrně dobře znám. Určení typu mutace podílející se na nádorové transformaci hematopoetické kmenové buňky napomáhá nejen s určením správné diagnózy, klasifikací velké a poměrně heterogenní skupiny akutních myeloidních leukemií do menších a lépe definovaných skupin, ale především se stanovením prognózy. Tyto molekulární markery umožňují také sledování minimální reziduální nemoci (MRD) u kurativně léčených pacientů. MRD je důležitým parametrem, který u některých mutací či fúzních genů umožňuje identifikovat skupinu pacientů s vyšším rizikem relapsu či počínající relaps onemocnění odhalit. Zaměřili jsme se na detekci MRD u skupiny akutních myeloidních leukemií s normálním karyotypem (NK-AML) nesoucích mutaci v nukleofosminu (NPM1). U nemocných s izolovanou mutací (bez přítomnosti interní tandemové duplikace FLT3) jde o chorobu s řazenou do podskupiny příznivou prognózou. Přítomnost MRD po terapii je podle našich zkušeností spojena s vyšším rizikem relapsu. Cíle:

Cílem práce bylo zavedení citlivější metody pro detekci MRD u NK-AML pacientů po chemoterapii a následně po alogenní transplantaci, kteří jsou v hematologické remisi onemocnění. Metodika: Jako základní metoda pro detekci a kvantifikaci mutací v genu NPM1 u NK-AML byla v Laboratoři molekulární biologie Hematoonkologické kliniky FN a LF UP Olomouc zavedena metoda jednobáňové polymerázové řetězové reakce s fluorescenčně značenými primery. Výsledný PCR produkt je podroben fragmentační analýze (kapilární elektroforeze) na genetickém analyzátoru ABI3100 a elektroforetogramy jsou vyhodnoceny v programu GeneMapper. Výsledky pilotní analýzy: Otestovali jsme vzorky 3 pacientů s NK-AML s izolovanou mutací v NPM1. Dva pacienti kvůli relapsu onemocnění podstoupili alogenní transplantaci. Pro kvantitativní RT-PCR byly vybrány vzorky z období po chemoterapii, kdy byla u pacientů dosažena hematologická remise onemocnění. Zároveň jsme analyzovali vzorky po alogenní transplantaci. Všechny vzorky byly podrobeny simplex PCR a zároveň qRT-PCR (Ipsogen NPM1 MutA MutaQuant kit). U některých vzorků, kde pomocí simplex PCR nebyla MRD již zachycena, byla pomocí qRT-PCR zjištěna NPM1 pozitivita. Jde tedy o metodu vhodnější pro sledování MRD. Diskuze: Fluorescenční simplex PCR je dostatečně citlivou a spolehlivou metodou, která je vhodná pro základní detekci v době diagnózy, kdy je množství nádorových buněk vysoké. V době remise onemocnění je ovšem nezbytnou součástí panelu vyšetření citlivější metoda kvantifikace. Dnes jsou již na trhu dostupné komerčně dodávané kity pro kvantitativní RT-PCR. Proto jsme se rozhodli porovnat obě metody a kvantitativní PCR přidat do spektra nabízených vyšetření. Práce je podporována grantem IGA-LF-2016-001.

P18/2955. ABERÁCIE CHROMOZÓMU 11 U AKÚTNEJ MYELOIDNEJ LEUKÉMIE /KAZUISTIKA/

Blahová A., Lengyelová K., Verchovodková V., Žákovičová A., Juríková K. (odd. genetiky, Medirex, Bratislava – SK)

Úvod: Cytogenetické zmeny sú dôležitými determinantmi akútnych myeloidných leukémií (AML). V čase diagnózy sa vyskytujú u cca 70 až 80% pacientov s AML. K častým zmenám patria t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q12), inv(16)(p13q22) a prestavby chromozómu 11 resp. oblasti 11q23. Tieto prestavby zahŕňujú delécie, zmnoženia a translokácie s rôznymi chromozómami. Translokácie sú spájané so zlou prognózou, vplyv delécie 11q23 na prognózu nie je jednoznačný. Kazuistika: Prezентujeme zaujímavý prípad mladej

pacientky s AML, ktorej bola v čase diagnózy detekovaná na cytogenetickej úrovni translokácia t(11;17)(q23;q25). Do translokácie bol zahrnutý gén KMT2A a na chr. 17 pravdepodobne gén SEPT9. Prestavba 11q23 bola potvrdená aj na FISH úrovni. Pacientka bola liečená a transplantovaná, no po čase relabovala a k primárnej zmene pribudla ďalšia sekundárna zmena - delécia dlhého ramena aj druhého chromozómu 11-del(11)(q14).

P19/2941. MUTAČNÍ ANALÝZA PACIENTŮ S AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ - OPTIMALIZACE HODNOCENÍ SEKVENAČNÍCH DAT A PŘEDBĚŽNÉ VÝSLEDKY NÁRODNÍ STUDIE

Janečková V., Ježíšková I., Tlamková T., Budinská E., Kosařová Z., Čulen M., Folta A., Cetkovský P., Žák P., Sztokowski T., Jindra P., Ráčil Z. (*Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Brno; Institut biostatistiky a analýz Lékařské a Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity, Brno; Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno; Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická a onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Brno; Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha; IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice, Hradec Králové; Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice, Olomouc; Hematologicko-onkologické oddělení, Fakultní nemocnice, Plzeň*)

Problematika: U pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) představuje molekulární testování v době diagnózy a následné sledování identifikovaných genových aberací standardní součástí diagnosticko-terapeutického procesu. Kromě rutinně vyšetřovaných znaků rekurentních se zřejmým prognostickým významem byly nedávno v souvislosti s AML identifikovány nové genové mutace. Sekvenování nové generace (NGS) má potenciál stanovit frekvenci těchto nově popsanych mutací u jednotlivých pacientů a v rámci populace a zjistit jejich vzájemnou koexistenci a prognostický význam. Práce je součástí rozsáhlého projektu mutační analýzy pacientů s AML, do něhož jsou zapojena velká hematologická centra České republiky. Cíl: Provést mutační analýzu genů se vztahem k AML na pilotním souboru AML pacientů a navrhnout metodu bioinformatického zpracování, která bude dále využita pro hodnocení dat z velkého počtu vzorků. Metodika: Ze vzorků leukocytů periferní krve a kostní dřeně odebraných v průběhu onemocnění byla pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) izolována DNA. Pro přípravu DNA knihoven byl použit kit ClearSeq AML založený na principu Haloplex - cíleném sekvenování (Agilent Technologies). Design kitu pokrývá celkem 48 exonů

20 nejčastěji mutovaných genů u pacientů s AML, resp. myelodysplastickým syndromem: ASXL1, CSF2R, CBL, CEBPA, DNMT3A, EZH2, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NPM1, NRAS, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SRSF2, TET2, TP53, U2AF. DNA knihovny byly sekvenovány na přístrojích MiSeq a NextSeq (Illumina). Výsledky: Pro sledování vývoje mutací byly vybrány vzorky z doby diagnózy (záhytu), remise a hematologického relapsu onemocnění, případně primární rezistence. Analýza sekvenačních dat byla provedena softwarem SureCall (Agilent Technologies), který je výrobcem kitu přímo navržen pro hodnocení panelů ClearSeq AML. Výsledky byly porovnány s výsledky z rutinní molekulární diagnostiky genů NPM1, IDH1, IDH2, FLT3-ITD, NRAS a DNMT3A, stanovené konvenčními metodami. Srovnání dat ukázalo, že program SureCall není schop optimálně detekovat např. méně frekventované mutace v genu NRAS a nedetekuje správně inserce/delece, např. inserce v genu NPM1 a dlouhé inserce v genu FLT3 (mutace FLT3-ITD). Proto byl vybrán a optimalizován jiný software a vytvořen celkový algoritmus bioinformatického hodnocení sekvencí ve formátu FASTQ. Součástí algoritmu je 1) filtrace a kontrola kvality dat, 2) mapování na referenční sekvenci hg38, kontrola kvality mapování, 3) remapování na inserce-delece, 4) detekce variant a jejich anotace (programy Pindel a GATK-HaplotypeCaller). Celkem bylo sekvenováno 28 vzorků od celkem 15 pacientů. Průměrné pokrytí cílů v jednotlivých bězích bylo minimálně 531x s 97 % bází pokrytých alespoň 30x a 95 % bází pokrytých alespoň 100x. Záhyt a frekvence mutací se v krvi a kostní dřeni testovaných vzorků významně nelišil. V sekvenovaných oblastech bylo v době diagnózy detekováno 35 potenciálně patogenních mutací s mediánem 2,5 (0-6) mutace na pacienta, s průměrnou variantní frekvencí 15,06 % (VAF 7-57 %). Provedená analýza umožnila nastavit postup pro bioinformatické zpracování dat. Optimalizovaný přístup bude nyní aplikován využít pro analýzy dalších klinických vzorků zařazených do projektu. „Podpořeno z projektu MUNI/A/1028/2015 a programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15-25809A. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.“

P20/2939. CÍLENÁ LÉČBA REZISTENTNÍ A RELABUJÍCÍ AKUTNÍ LEUKÉMIE U DĚTÍ – KDE JSOU HRANICE?

Šrámková L., Hrušák O., Mejstříková E., Žaliová M., Trka J., Kolenová A., Sedláček P., Horáková J., Pospíšilová D., Štěrba J., Timr P., Blažek B., Votava T., Procházková D., Hak J., Starý J. (Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2.LF a FN Motol, Praha - CZ; Klinika detskej hematológie a onkológie, DFNSP, Bratislava - SK; Dětská klinika, FN Olomouc - CZ; Klinika dětské onkologie, FN, Brno - CZ; Dětská klinika, Nemocnice, České Budějovice - CZ; Klinika dětského lékařství FN, Ostrava - CZ; Dětská klinika, FN, Plzeň - CZ; Dětská klinika, Masarykova nemocnice, Ústí nad Labem - CZ; Dětská klinika, FN, Hradec Králové - CZ)

Akutní leukémie rezistentní na standardní chemoterapii nebo opakovaně relabující byla donedávna považována za nevléčitelné onemocnění. S rozšířením klinického použití nových cílených léků se posouvají hranice toho, kdy pacienty označíme za nevléčitelné a indikujeme pouze k paliativní péči. Nedílnou součástí zavádění nových léků je i zahájený program screeningu všech pacientů s rezistentní a relabující akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) k detekci potenciálně léčebně ovlivnitelných molekulárně-genetických změn. Hodnotíme období 2/2014-2/2016, kdy jsme začali používat některé nové léčebné přístupy v každodenní praxi. Za toto období jsme léčili 4 pacienty s ALL ve věku 5-17 let bispecifickou monoklonální protilátkou blinatumomab. U všech se jednalo o použití blinatumomabu ve 3. nebo 4. linii léčby, 2 pacienti byli léčeni pro relaps po alogenní transplantaci hematopoetických buněk (HSCT), 2 pro rezistentní 1. relaps ALL, jejich léčba byla při protražované dřeňové aplázii komplikována život ohrožujícími infekcemi. Hematologické odpovědi jsme dosáhli u 3 pacientů, 2 z nich dosáhli i molekulárně genetické remise, 1 pacient zemřel jako non-responder. Přes dosažení rychlé hematologické odpovědi prodělala 1 pacientka extramedulární relaps v průdušních žlázách, který jsme léčili s dobrým efektem monoklonální protilátkou antiCD22 konjugovanou s kalicheamicinem (inotuzumab ozogamicin), 1 pacientka zrelabovala v kostní dřeni krátce po skončení 2. cyklu blinatumomabu, dosáhla 3. remise po chemoterapii a byla transplantována, poslední pacient je v remisi s krátkou dobou sledování. Do léčby 1. relapsu ALL standardního rizika jsme v rámci léčebné studie IntReALL-SR zavedli randomizované podání antiCD22 protilátky (epratuzumab) v konsolidační terapii. Kromě použití monoklonálních protilátek na našem pracovišti jsme navázali spolupráci s NIH v Bethesdě, USA a 1 pacienta s recidivujícím

relapsem ALL v centrálním nervovém systému (CNS) po sourozenecké transplantaci jsme zařadili do studie s použitím T buněk s CD19 chimerickým antigenním receptorem a po dosažení remise podstoupil 2.HSCT. Problematickou zůstává nadále skupina pacientů s relabující T-ALL, kde jsou možnosti cílené léčby velmi omezené. U 2 pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) jsme použili antiCD33 protilátku konjugovanou s kalicheamicinem (gentuzumab ozogamicin) v konsolidační terapii před HSCT, 1 pacientka s FLT3-ITD pozit. AML M5 byla při non response na indukční chemoterapii a současném anurickém renálním selhání léčena sorafenibem v monoterapii s dosažením hematologické remise po 2 týdnech podávání, které umožnilo zlepšení celkového stavu a pokračování další terapie. Nové léky umožňují u části opakovaně relabujících nebo rezistentních pacientů s akutní leukémií dosáhnout remise onemocnění a překonat závažné komplikace předchozí léčby. Smyslem této terapie je ve většině případů přemostění období do potenciálně kurativní HSCT. Podpořeno MZ ČR - RVO, FN v Motole 00064203

P21/2899. SROVNÁNÍ SÉROVÝCH KONCENTRACÍ CYTOKINŮ A ADHEZNÍCH MOLEKUL S PROGNOSTICKÝMI FAKTORY U PACIENTŮ S NOVĚ DIAGNOSTIKOVANOU AKUTNÍ LYMFOLASTICKOU LEUKÉMIÍ

Horáček J. M., Kupsa T., Vaněk J., Jebavý L., Žák P. (Katedra vojenského vnitřního lékařství a vojenské hygieny, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové; Katedra informatiky a kvantitativních metod, Fakulta informatiky a managementu Univerzity Hradec Králové, 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. Cílem studie bylo srovnání sérových koncentrací cytokinů, cytokinových receptorů a adhezních molekul se vstupními charakteristikami a prognostickými faktory u pacientů s nově dg. akutní lymfoblastickou leukémií (ALL). Metodika: Do studie bylo zařazeno 30 pacientů s nově dg. ALL (medián věku 46, rozpětí 22-75 let, 20 mužů). Ve studii byly hodnoceny sérové koncentrace celkem 31 analytů, a to 21 cytokinů, 4 solubilní cytokinové receptory, 5 solubilních adhezních molekul a matrix metaloproteináza 9 (MMP-9). Z cytokinů byly měřeny hladiny interleukinů (IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-23), Epidermal Growth Factor (EGF), Granulocyte Macrophage Colony

Stimulating Factor (GM-CSF), Interferon-gamma (IFN-gamma), Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha (MIP-1 alpha), Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), Tumour Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), dále solubilní receptory pro IL-2 (sIL-2R alpha), IL-6 (sIL-6R), TNF typu 1 a 2 (sTNFR-1,2). Z adhezních molekul byly měřeny hladiny solubilního E-selektinu (E-SEL), L-selektinu (L-SEL), P-selektinu (P-SEL), Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) a Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1). Všechny analyty byly měřeny biočipovou technologií na analyzátoru Evidence Investigator (Randox). Hladiny testovaných analytů byly porovnány se vstupními charakteristikami pacientů – věk, pohlaví, typ ALL (imunofenotyp, cytogenetika, molekulární genetika), vstupní riziko podle GMALL, procento blastů v kostní dřeni, parametry krevního obrazu (leukocyty, hemoglobin, trombocyty, procento blastů), biochemické parametry (LDH, CRP) a další. Statistické zhodnocení bylo provedeno erudovaným statistikem pomocí softwaru R 3.2.3. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné. Výsledky: V souboru bylo 29 B-ALL a 1 T-ALL. Normální karyotyp mělo 8 pacientů, 16 pacientů mělo cytogenetickou změnu a u 6 pacientů nebyl karyotyp získán. 12 pacientů bylo BCR/ABL+, 1 pacient měl přestavbu MLL/AF4 a 1 pacient E2A/PBX1. Hyperleukocytoza (nad 30 000/μl u B-ALL, nad 100 000/μl u T-ALL) byla přítomna u 8 pacientů. Dle kritérií GMALL mělo vstupně 9 pacientů standardní riziko (SR), 9 pacientů vysoké riziko (HR) a 12 pacientů velmi vysoké riziko (VHR). U pacientů s nově dg. ALL byla prokázána silná negativní korelace IL-7 s počtem leukocytů ($r = -0,633$; $p = 0,032$), procentem blastů v periferní krvi ($r = -0,695$; $p = 0,004$) a LDH ($r = -0,604$; $p = 0,075$). Dále byla nalezena velmi silná pozitivní korelace IL-7 s počtem trombocytů ($r = 0,801$; $p < 0,0001$) a silná korelace VCAM-1 s LDH ($r = 0,664$; $p = 0,012$). Ostatní korelace testovaných analytů se vstupními charakteristikami ALL nedosáhly statistické významnosti. Závěr: Naše výsledky ukazují, že sérové koncentrace některých cytokinů a adhezních molekul korelují se vstupními charakteristikami pacientů s nově dg. ALL. U pacientů s aktivní ALL jsou nízké hladiny IL-7 spjaté s hyperleukocytozou, vyplavováním blastů do periferní krve a zvýšením sérového LDH. U žádného z testovaných analytů nebyla prokázána statisticky významná korelace s cytogenetickými nebo molekulárně genetickými změnami. V další kroku budou studovány korelace s léčebnou odpovědí a přežitím pacientů. K posouzení prognostického a prediktivního potenciálu změn v systému cytokinů a adhezních interakcí budou potřebné další studie na větších počtech pacientů. Podpořeno z projektu RO 1011 (FVZ).

P22/2898. SÉROVÝ PROFIL CYTOKINŮ, CYTOKINOVÝCH RECEPTORŮ A ADHEZNÍCH MOLEKUL U PACIENTŮ S NOVĚ DIAGNOSTIKOVANOU AKUTNÍ LYMFBLASTICKOU LEUKEMIÍ A U ZDRAVÝCH JEDINCŮ

Horáček J. M., Kupsa T., Vaněk J., Jebavý L., Žák P. (Katedra vojenského vnitřního lékařství a vojenské hygieny, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové; Katedra informatiky a kvantitativních metod, Fakulta informatiky a managementu Univerzity Hradec Králové, Hradec Králové; 4. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové)

Úvod: Signální mikroprostředí hraje důležitou roli u řady chorob včetně hematologických malignit. Poznatky získané ze studia cytokinů a adhezních interakcí by mohly umožnit zlepšení diagnostiky a léčby těchto onemocnění, protože cytokiny nebo jejich receptory mohou představovat cíle pro specifickou protinádorovou léčbu na molekulární úrovni. Cílem studie bylo porovnání sérového profilu cytokinů, cytokinových receptorů a adhezních molekul u pacientů s nově dg. akutní lymfoblastickou leukémií (ALL) a u zdravých jedinců. Dále byly hodnoceny vzájemné korelace jednotlivých analytů zvláště v obou skupinách. Metodika: Do studie bylo zařazeno 30 pacientů s nově dg. ALL (medián věku 46, rozpětí 22–75 let, 20 mužů) a 15 zdravých dárců krve jako kontrolní skupina (medián věku 41, rozpětí 25–58 let, 11 mužů). Hodnotili jsme sérové koncentrace celkem 31 analytů, a to 21 cytokinů, 4 solubilní cytokinové receptory, 5 solubilních adhezních molekul a matrix metaloproteinázu 9 (MMP-9). Z cytokinů byly měřeny hladiny interleukinů (IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-23), Epidermal Growth Factor (EGF), Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Interferon-gamma (IFN-gamma), Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha (MIP-1 alpha), Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), Tumour Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), dále solubilní receptory pro IL-2 (sIL-2R alpha), IL-6 (sIL-6R), TNF typu 1 a 2 (sTNFR-1,2). Z adhezních molekul byly měřeny hladiny solubilního E-selektinu (E-SEL), L-selektinu (L-SEL), P-selektinu (P-SEL), Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) a Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1). Všechny analyty byly měřeny biočipovou technologií na analyzátoru Evidence Investigator (Randox). Statistické zhodnocení bylo provedeno erudovaným statistikem pomocí softwaru R 3.2.3 (R Core Team 2015). Hodnoty

$p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné. Výsledky: U pacientů s nově dg. ALL jsme ve srovnání se zdravými jedinci zjistili statisticky významné zvýšení sérové koncentrace IL-6, IL-8, IL-15, MIP-1 alpha, MCP-1, sIL-2R alpha, sIL-6R, sTNFR-1, sTNFR-2, L-SEL, ICAM-1 a VCAM-1 ($p < 0,01$). Dále jsme u pacientů s ALL zjistili statisticky významné snížení sérové koncentrace IL-3, IL-4 a GM-CSF ($p < 0,01$). Ve skupině pacientů s ALL jsme prokázali statisticky významné korelace mezi sTNFR-1 a sTNFR-2 ($r=0,805$; $p < 0,0001$), IL-1 alpha a IL-4 ($r=0,700$; $p=0,008$), sTNFR-2 a MIP-1 alpha ($r=0,657$; $p=0,037$), sTNFR-2 a VCAM-1 ($r=0,652$; $p=0,044$). V kontrolní skupině byly prokázány statisticky významné korelace mezi EGF a IL-7 ($r=0,876$; $p=0,009$), EGF a IL-8 ($r=0,856$; $p=0,022$). Závěr: Naše výsledky ukazují, že sérové koncentrace některých cytokinů, cytokinových receptorů a adhezních molekul jsou významně odlišné u pacientů s nově dg. ALL ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých jedinců, a mají vztah k aktivitě onemocnění. Dále jsme zjistili statisticky významné korelace mezi některými analyty. Není jasné, zda tyto změny mohou sloužit jako prognostické ukazatele u ALL. Další studie na větším počtu pacientů a srovnání se zavedenými prognostickými faktory budou nezbytné. Práce byla podpořena z projektu RO 1011 (FVZ).

P23/2897. AKTIVACE BUNĚK ENDOTELU A SÉROVÉ HLADINY CYTOKINŮ A SOLUBILNÍCH ADHEZNÍCH MOLEKUL U AKTIVNÍ AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIE A V KOMPLETNÍ REMISI

Kupsa T., Vaněk J., Jebavý L., Žák P., Horáček J. M. (*Katedra vojenského vnitřního lékařství a vojenské hygieny, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové; Katedra informatiky a kvantitativních metod, Fakulta informatiky a managementu Univerzity Hradec Králové, Hradec Králové; 4. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové*)

Cíl: 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-a) s buňkami endotelu a následná zvýšená exprese adhezních molekul. V této studii jsme ověřovali hypotézu, že hladiny cytokinů a solubilních adhezních molekul souvisí s aktivací buněk endotelu u AML. Metodika: Byl studován soubor 84 nemocných s nově zjištěnou AML. U 45 z nich byl vyšetřen vzorek séra odebraný v době kompletní remise (CR). Alogenně transplantovaní pacienti nebyli v době CR

hodnoceni. Hodnotili jsme sérové hladiny celkem 29 analytů: interleukiny (IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15), Epidermal Growth Factor (EGF), Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Interferon-gama (IFN-gama), Macrophage Inflammatory Protein-1a (MIP-1a), Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), TNF-a, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), E-selektin (E-SEL), P-selektin (P-SEL), Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9), solubilní IL-2 receptor-a (sIL-2Ra), solubilní receptory pro IL-6 (sIL-6R) a TNF-a typ I a II (TNFR-1,2). Biomarkery byly měřeny za použití proteinového biočipu na analyzátoru Evidence Investigator (Randox). Odchytky s $P < 0,05$ byly považovány za statisticky signifikantní. Výsledky: U aktivní AML koreloval VCAM-1 s ICAM-1 ($P < 0,0001$), E-SEL ($P = 0,0011$), počtem leukocytů ($P = 0,0006$), TNF-a ($P < 0,0001$), TNFR-2 ($P < 0,0001$), TNFR-1 ($P = 0,0047$), LDH ($P < 0,0001$), IL-2Ra ($P = 0,0224$) a IL-6R ($P = 0,0240$). Hladiny ICAM-1 korelovaly s E-SEL ($P = 0,0285$), TNFR-1 ($P = 0,0007$) a LDH ($P = 0,0344$). E-SEL koreloval s P-SEL ($P < 0,0001$), počtem leukocytů ($P < 0,0001$), LDH ($P < 0,0001$), TNFR-1 ($P = 0,0152$) a TNFR-2 ($P = 0,0202$). Hladina CRP korelovala s IL-6 ($P < 0,0001$), ICAM-1 ($P = 0,0122$) a negativně s hladinou albuminu ($P = 0,0175$). Počet trombocytů koreloval s IL-7 ($P < 0,0001$), EGF ($P < 0,0001$) a VEGF ($P = 0,0025$). Věk ani hladina hemoglobinu nekorelovaly s žádným z hodnocených analytů. V době CR byly při normalizaci počtu trombocytů hladiny IL-7 ($P < 0,0001$), EGF ($P < 0,0001$) a VEGF ($P < 0,0001$) vyšší než u aktivní AML. Hladiny IL-6 byly nižší, korelace s CRP nebyla přítomna. Hladiny VCAM-1, ICAM-1, E-SEL a P-SEL byly nižší, po Bonferroniho korekci P však statisticky nevýznamně. P-SEL koreloval s počtem trombocytů ($P < 0,0001$) a IL-8 ($P < 0,0001$), což u aktivní AML nebylo prokazatelné. VCAM-1 koreloval s ICAM-1 ($P = 0,0027$), ale ne s E-SEL nebo P-SEL. E-SEL a P-SEL nekorelovaly. Závěr: Věk ani hladina hemoglobinu nemají zásadní vliv na nádorové mikroprostředí u AML. Důležitým zjištěním je vzájemná korelace hladin adhezních molekul u aktivní AML ukazující na celkovou aktivaci adhezních interakcí v souvislosti s počtem leukocytů, LDH a některými cytokiny. Pochopení změn v regulaci signálního mikroprostředí s ohledem na aktivitu AML je důležitější než prosté porovnání hladin vyšetřovaných analytů. Naše data ukazují, že endotel je u aktivní AML aktivován. Aktivované endotelie jsou zdrojem E-SEL i P-SEL. V CR jsou hlavním (a fyziologickým) zdrojem P-SEL trombocyty, E-SEL a P-SEL nekorelují. Aktivace endotelu souvisí s rezistencí AML k terapii. U faktorů

souvisejících s aktivací endotelu u AML bude následně zkoumána možnost jejich využití jako nových prognostických markerů. Práce byla podpořena z projektu RO 1011 (FVZ).

P24/2889. PROJEKT AML NA SEVERNÍ A STŘEDNÍ MORAVĚ

Starostka D., Szotkowski T., Adamová D., Kadlčková E., Brejcha M., Janek D., Jochymek R., Vaculová J., Rytikova N., Vinklárková K. (Oddělení klinické hematologie, Nemocnice s poliklinikou, Havířov, p.o.; Hematoonkologická klinika FN, Olomouc; Hematologicko-transfúzní oddělení, Slezská nemocnice, Opava, p.o.; Hematologicko-transfúzní oddělení, Krajská nemocnice T. Bati, Zlín, a.s.; Hematologické oddělení, Nemocnice, Nový Jičín, a.s.; Hematologicko-transfúzní oddělení, Nemocnice s poliklinikou, Karviná - Ráj, p.o.; Hematologicko-transfúzní oddělení, Nemocnice, Třinec, p.o.; Hematologicko-transfúzní oddělení, Nemocnice, Frýdek - Místek, p.o.; Hematologická ambulance, Sdružené zdravotnické zařízení, Krnov, p.o.; Hematologicko-transfúzní oddělení, Nemocnice, Hranice, a.s.)

Úvod: Primárním cílem projektu byl sběr údajů o výskytu AML a její léčbě na severní a střední Moravě. Sekundárním cílem projektu bylo zpřesnění diagnostiky a prognostické stratifikace AML v uvedeném regionu. Metody: Údaje o nově diagnostikovaných případech AML byly evidovány po dobu 1 roku v regionu s populací 2,1 milionu obyvatel. Sledované údaje zahrnovaly: pohlaví, věk v době diagnózy, kategorie AML dle WHO klasifikace, rozlišení na primární a sekundární MDS, komorbidita a způsob léčby. Výsledky: Celkem bylo diagnostikováno 73 nových případů AML. Incidence AML byla 3,5 případů na 100 tisíc obyvatel (63% mužů, 37% žen). Věkový medián v době diagnózy byl 68 let (minimum 29 let, maximum 91 let). Výskyt jednotlivých diagnostických kategorií: AML s rekurentními genetickými abnormalitami 26.0%, AML s myelodysplastickými změnami 27.4%, AML spojená s léčbou 13.7%, AML asociovaná s Downovým syndromem 1.4%, AML nespecifikované 31.5%. Diagnostická shoda primárního a sekundárního cytologického vyšetření byla 100%. Diagnostická shoda cytologického a histologického vyšetření byla 84%. Primární AML se vyskytla v 58 %, sekundární AML ve 42 %. Signifikantní komorbidita byla přítomna u 82% nemocných: kardiovaskulární 63%, endokrinologická 33%, gastrointestinální 11%, významná chronická nemoc ledvin 5,5%, revmatologická onemocnění 1.3%, plicní komorbidita 10%, neurologická a psychiatrická onemocnění 8%. Nádorová duplicita se vyskytla ve 38% (po odečtení MDS 21%).

Léčba zahrnovala transfúze erytrocytů a/nebo trombocytů, chemoterapii, epigenetickou léčbu a allo-BMT nebo jejich kombinaci. Závěr: V rámci Projektu AML na severní a střední Moravě byly zmapovány základní demografické ukazatele, diagnostická, prognostická a léčebná data týkající se AML. Dalším výsledkem bylo zpřesnění diagnostiky a prognostické stratifikace AML v uvedeném regionu.

P25/2866. ALLOGENEIC HAEMATOPOIETIC CELL TRANSPLANTATION IN PATIENTS WITH FLT3-ITD MUTATED AML: TRANSPLANTATION IN 1ST CR IS THE DECISIVE FACTOR FOR GOOD OUTCOME

Jindra P., Karas M., Szotkowski T., Lysák D., Raida L., Jungová A., Kuba A., Hrabětová M., Černan M., Steinerová K. (University Hospital, Pilsen; University Hospital, Olomouc)

Introduction: 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 in 2 Czech centres since 2003 is to refer all FLT3-ITD+ AML pts to upfront alloHCT in CR1. The aim of this study was to analyze the outcomes of this strategy. Material (or patients) and methods: 73 consecutive adults with FLT3-ITD+ CN-AML allografted in 2 centres (56+17 pts) from 2003-2014 either with matched sibling (MSD, n=23, 32%) or unrelated donors (UD, n=50, 68%) were studied. Conditioning regimen was either RIC (n=54) or myeloablative (MAC, n=19). The median age of cohort was 53 years (20-68). 33 (45%) were NPM1mutated. The original aim of our policy was to perform HCT in CR1 (n=56), however in some patients due to various reasons (donor availability, disease resistance or patient preference), HCT was performed in more advanced stage (n=17, 1xPR1, 2xCR2/PR2, 4xPIF, 10xREL). Median interval dg. - HCT was 5 months (2-13) with median of 2 (1-5) cycles of chemotherapy before HCT. For analysis, the status at the time of HCT was classified as either early (CR1) or advanced (CR2, PR1, PR2, REL, PIF) Results: With median follow up of 44 months (range 5-135) altogether 35 pts (48%) has died mainly of relapse (n=26, 74%). The 5-year probabilities of OS and DFS were 49% and 47%. Cumulative incidences of relapse (RI) and NRM at 5-y were 37% and 17%, respectively. Cox regression hazard model identified status at HCT outside the CR1 (=advanced disease) as the strongest factor predicting extremely poor OS/DFS (HR 6.665, p<0.0001/HR 5.474, p<0.0001) and RI (HR

8.270, $p < 0.0001$). The estimated 5-y OS for patients transplanted in CR1 was 62% vs. 0% for pts transplanted outside CR1. The higher patient age (cut-off 57 years) predicted higher NRM (HR 5.496, $p = 0.0136$) as well as the higher aGVHD grade (HR 2.577, $p = 0.0058$). The presence of chronic GVHD was associated with superior OS/DFS (HR 0.178, $p = 0.0059$ /HR 0.238, $p = 0.01$) probably because of the relapse protection (HR 0.214, $P = 0.0145$). No association of patient age, NPM mutational status, time to HCT, no. of cycles pre-HCT, donor type (MSD vs. UD), donor age and sex, conditioning regimen (MAC vs. RIC), stem cell source, CD34+ cell dose and CMV status on the main outcomes was detected. Multivariable analysis identified HCT outside CR1 as the key factor for poor OS (HR 5.419, $p < 0.0001$), DFS (HR 4.415, $p = 0.0002$) and high RI (HR 8.080, $p < 0.0001$). aGVHD grade \geq III predicted higher NRM (HR 3.798, $p = 0.059$) as well as inferior OS (HR 2.041, $p = 0.0079$) and DFS (HR 1.693, $p = 0.0439$). Conclusion: Despite the limitations of a retrospective study, our data suggests alloHCT is a valuable therapeutic option for FLT3-ITD mutated CN-AML patients with potential to provide durable remission if patient is transplanted in CR1. Until prospective studies are completed, our study strongly supports to prioritize the allografting in CR1 regardless of donor type, i.e. alloHCT should be regarded as the urgency in CR1 in this subset of AML patients.

P26/2956. NERVOVĚ-SVALOVÉ NEŽÁDOUCÍ PROJEVY TYROZINKINÁZOVÝCH INHIBITORŮ V LÉČBĚ PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ - ZKUŠENOSTI JEDNOHO CENTRA

Rudnay M., Žáčková D., Zmoraj V., Adamová B., Semerád L., Weinbergrová B., Ráčil Z., Mayer J. (Interní hematologická a onkologická klinika Fakultní nemocnice Brno; Neurologická klinika Fakultní nemocnice Brno, Středoevropský technologický institut (Central European Institute of Technology - CEITEC), Masarykova univerzita, Brno)

Zavedení tyrozinkinázových inhibitorů (TKI) do léčby pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) zásadním způsobem zlepšilo prognózu těchto nemocných. Vysoce účinná terapie TKI však není prosta výskytu nežádoucích účinků (NŮ). Jedněmi z nejčastějších jsou nervově-svalové projevy, charakteru svalových bolestí, křečí či slabosti. Provázejí zejména léčbu imatinibem (u více než 50 % pacientů). Třebaže dosahují spíše mírné či střední intenzity, mohou významně narušit kvalitu života pacientů. Jejich patogeneze nebyla dosud objasněna. Cíl. Prospektivně analyzovat

nervově-svalové NŮ léčby imatinibem a nilotinibem včetně detailního laboratorního rozboru ve snaze objasnění jejich podstaty. Metody. Pacienti s CML léčení imatinibem nebo nilotinibem v první linii byli před zahájením terapie a dále v jejím průběhu (v měsíci 1 a 3 od zahájení terapie, následně á 3 měsíce) podrobeni důkladnému klinickému (anamnéza, popis a stanovení tíže svalových projevů dle CTCAEv4.03, myodynamické testy – dřep a stand-up test) a laboratornímu vyšetření s důrazem na ukazatele svalového postižení, tj. kreatinínázu (CK) a myoglobin (Mb), iontogram v séru i moči (Ca, Mg, P) a vybrané hormony (PTH, fT4 a TSH). Výsledky. V období 3/2012 – 1/2014 bylo do projektu zařazeno 59 pacientů s nově zjištěnou CML (30 žen a 29 mužů, mediánu věku 60 let; rozmezí 22 – 90). Léčba imatinibem byla zahájena u 32 a nilotinibem u 27 pacientů. Svalové potíže se vyskytly u 19 (59,4 %) pacientů léčených imatinibem (slabost/křeče/bolesti u 2/14/3 pacientů) a u 8 (29,7 %) pacientů léčených nilotinibem (slabost/křeče/bolesti u 0/7/1 pacienta). Pouze u 3 pacientů léčených imatinibem a 1 léčeného nilotinibem byly obtíže stupně 3 závažnosti. Podíl pacientů s obtížemi u obou přípravků v průběhu sledovaného období narůstal. Myodynamické testy nebyly v průběhu léčby ani jedním z preparátů významně alterovány. Léčba imatinibem byla provázena signifikantním vzestupem CK oproti vstupním hodnotám (Tabulka), přičemž pouze ve 3 případech dosahoval stupně 2 závažnosti. Významný byl i pokles v koncentraci sérového magnézia v celém průběhu sledování. Pokles hladiny fosfátu dosahoval statistické významnosti pouze v měsíci 1, zatímco při léčbě nilotinibem jsme zaznamenali časný nástup poklesu hladiny fosfátu a její setrvalý charakter ve smyslu trvajících signifikantního poklesu oproti vstupním hodnotám, a to i přesto, že 6 (22 %) pacientů bylo v průběhu terapie nilotinibem substituováno p.o. přípravky fosfátu. Změny v koncentraci kreatinínázy, sérového Ca a Mg v průběhu léčby nilotinibem nabývaly spíše hraniční významnosti, a to jen v některých časových milnících (Tabulka). Zajímavým zjištěním byl významný vzestup koncentrace parathormonu ve 3. měsíci léčby oběma přípravky, zatímco koncentrace TSH a fT4 nejevila významného rozdílu oproti vstupním hodnotám. Léčba ani jedním z přípravků nebyla provázena významnými změnami v odpadech sledovaných iontů v moči. Závěr. I přes statisticky významné odchylky některých sledovaných parametrů potenciálně souvisejících s nervově-svalovými NŮ TKI se ukázalo, že změny v naprosté většině případů nedosahují klinického významu ve smyslu dosažení stupně 2 a více dle CTCAE. Samotné nervosvalové NŮ, které převažovaly ve skupině léčené imatinibem, ne-

Tabulka. Vývoj laboratorních parametrů v průběhu léčby imatinibem a nilotinibem

	Start (M0) Median (rozmezí)	n	M1 Median (rozmezí)	n	P (proti startu)	M3 Median (rozmezí)	n	P (proti startu)	M6 Median (rozmezí)	n	P (proti startu)	M9 Median (rozmezí)	n	P (proti startu)	M12 Median (rozmezí)	n	P (proti startu)	M15 Median (rozmezí)	n	P (proti startu)	M18 Median (rozmezí)	n	P (proti startu)
Imatinib (N = 32)																							
CK (ukat/l)	1,15 (0,41 – 6,20)	26	1,7 (0,81 – 5,02)	28	0,08	2,47 (0,69 – 8,85)	26	<0,01	2,79 (0,95 – 7,73)	28	<0,01	2,49 (1,28 – 6,53)	23	<0,001	3,07 (1,49 – 8,96)	17	<0,001	3,71 (1,20 – 8,02)	11	<0,01	3,96 (2,43 – 7,35)	12	<0,0001
MyoGb (µg/l)	36,1 (21 – 100,3)	25	29,7 (21 – 162)	27	0,51	38 (21 – 80,7)	26	0,77	36,1 (21 – 69,8)	26	0,91	37,9 (<20 – 382,2)	24	0,23	36,7 (21 – 85,2)	16	0,53	35,4 (25,2 – 93,3)	12	0,54	36,9 (21,9 – 101,0)	11	0,66
Ca (mmol/l)	2,36 (2,05 – 2,78)	28	2,27 (2,0 – 2,55)	28	0,21	2,26 (2,09 – 2,46)	24	0,12	2,28 (2,11 – 2,51)	29	0,27	2,32 (2,13 – 2,46)	26	0,49	2,25 (2,16 – 2,45)	19	0,22	2,25 (2,06 – 2,45)	15	0,31	2,35 (2,13 – 2,53)	15	0,75
Mg (mmol/l)	0,85 (0,6 – 1,0)	28	0,82 (0,7 – 0,95)	30	0,02	0,8 (0,61 – 0,94)	29	0,01	0,82 (0,66 – 1,03)	29	0,02	0,86 (0,64 – 0,92)	26	0,02	0,78 (0,67 – 0,98)	19	<0,01	0,77 (0,71 – 0,9)	15	<0,01	0,79 (0,69 – 0,88)	15	<0,01
P (mmol/l)	1,22 (0,7 – 1,71)	26	0,9 (0,48 – 1,34)	29	<0,01	0,94 (0,46 – 1,19)	27	0,24	0,9 (0,56 – 1,41)	29	0,32	0,9 (0,44 – 1,28)	26	0,42	0,87 (0,41 – 1,30)	19	0,31	0,87 (0,45 – 1,21)	15	0,42	0,89 (0,48 – 1,32)	15	0,35
PTH (pmol)	4,50 (1,6 – 6,6)	21	NA	NA	NA	6,9 (2,8 – 11,5)	25	0,001	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Nilotinib (N = 27)																							
CK (ukat/l)	1,18 (0,39 – 6,58)	21	1,30 (0,39 – 4,86)	24	0,83	1,57 (0,39 – 5,62)	23	0,42	1,98 (0,89 – 6,08)	17	0,02	2,74 (0,86 – 5,55)	13	0,02	3,47 (0,77 – 5,07)	14	<0,01	2,07 (1,14 – 6,04)	8	0,17	2,54 (1,44 – 7,55)	6	0,03
MyoGb (µg/l)	33 (21 – 52,4)	18	30,7 (21 – 90,1)	22	0,52	30,8 (21 – 70,9)	19	0,47	38,9 (21 – 92,3)	16	0,21	2,3 (2,2 – 2,48)	14	0,94	50,9 (21 – 116,8)	12	0,05	37 (21 – 50,0)	8	0,81	51,45 (23 – 60,4)	6	0,08
Ca (mmol/l)	2,35 (2,16 – 2,55)	26	2,29 (2,14 – 2,47)	25	0,04	2,31 (2,13 – 2,48)	25	0,04	2,36 (2,16 – 2,57)	19	0,77	2,3 (2,2 – 2,48)	14	0,94	2,34 (2,19 – 2,54)	15	0,98	2,36 (2,3 – 2,5)	10	0,21	2,45 (2,28 – 2,56)	7	0,11
Mg (mmol/l)	0,85 (0,78 – 0,96)	26	0,83 (0,63 – 1,08)	25	0,28	0,84 (0,7 – 0,92)	26	0,04	0,82 (0,71 – 0,91)	20	<0,01	0,85 (0,72 – 0,96)	14	0,29	0,84 (0,79 – 1,14)	15	0,88	0,84 (0,71 – 1,05)	10	0,45	0,79 (0,73 – 0,91)	7	0,05
P (mmol/l)	1,16 (0,71 – 1,39)	23	0,9 (0,59 – 1,25)	24	<0,00001	0,92 (0,36 – 1,24)	24	<0,0001	0,86 (0,56 – 1,21)	20	<0,00001	0,86 (0,51 – 1,06)	14	<0,0001	0,85 (0,59 – 1,1)	15	<0,00001	0,94 (0,8 – 1,47)	10	0,02	0,91 (0,57 – 1,27)	7	<0,01
PTH (pmol)	3,50 (1,9 – 5,9)	14	NA	NA	NA	7,2 (4,9 – 12,1)	16	<0,00001	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

byly závažného charakteru a u žádného z pacientů si nevytýkaly změnu na jiný preparát. Otázka významu vzestupu hladiny parathormonu při léčbě oběma přípravky a též hypofosfatémie dominantně po nilotinibu, přetrvávající v průběhu celého sledování i přes léčebnou substituci bude předmětem dalšího výzkumu.

P27/2917. ANALÝZA DÉLKOVÝCH POLYMORFISMŮ AMPLIFIKOVANÝCH DNA FRAGMENTŮ ASOCIOVANÝCH S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ V KOMBINACI S NGS ODHALILA POLYMORFISMY V REPETITIVNÍCH OBLASTECH A V LOKUSECH SPJATÝCH SE VZNIKEM RAKOVINY

Koblihová J., Šrůtová K., Jarušková M., Klamová H., Machová Poláková K. (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha)

Genetické predispozice a molekulární mechanismy vzniku chronické myeloidní leukémie (CML) a rezistence na léčbu inhibitory tyrozinkináz (TKI) jsou celosvětově předmětem intenzivního zájmu. Vysokokapacitní techniky, jako je sekvenování nové generace (NGS) umožňující celogenomové analýzy, mají své limity v náročném bioinformatickém zpracování a vyhod-

nocení velkého množství získaných dat. V této práci jsme s využitím kombinace vysoce reprodukovatelné metody AFLP (amplifikace délkových polymorfismů) a NGS analyzovali CML genomy a identifikovali tak polymorfni oblasti asociované s onemocněním a rezistencí k imatinibu (IM). AFLP analýzy byly provedeny u 65 pacientů léčených IM v první linii (39 pacientů s optimální odpovědí; 26 pacientů se selháním léčby) a 30 zdravých dárců; pro potvrzovací analýzy Sangerovým sekvenováním bylo přidáno dalších 30 kontrol. Věkový medián pacientů byl 55 let (rozsah 18-84 let). AFLP analýzy byly provedeny s použitím restričních endonukleáz MseI a EcoRI a komerčně dodávaných kitů a protokolů. Fragmentační analýza probíhala na sekvenátoru ABI PRISM 3130. Délky DNA fragmentů byly odečítány v GeneMapperu. Četnost DNA fragmentů mezi pacienty a zdravými dárci byla počítána pomocí exaktního binomického testu. Devět vybraných fragmentů bylo dále charakterizováno pomocí NGS a získaná data byla hodnocena v NextGENU. Polymorfismy v identifikovaných fragmentech byly potvrzeny Sangerovým sekvenováním. AFLP analýzy celkově poskytly 3912 AFLP markerů/DNA fragmentů diverzifikovaně se vyskytujících napříč souborem pacientů a zdravých jedinců, z čehož 199 fragmentů bylo významně spjata s onemocněním a 5 s odpovědí na

léčbu IM. Pomocí NGS jsme charakterizovali 7 lokusů spojených s CML a 2 s odpovědí na léčbu IM. Fragment CAC_ACC_25, u kterého jsme potvrdili SNP rs113864098 (C/T) odpovědné za vznik EcoRI restrikčního místa, se nachází na chromosomu 1 a je součástí LIMC1 a AluSz repetitivních elementů. Významně vyšší četnost alely rs113864098-T byla nalezena v kohortě pacientů (60 %) oproti zdravým kontrolám (13 %; $P = 0,016$). U fragmentu CAT_ACC_54, lokalizovaném na chromosomu 10 mezi geny NRAP a CASP7SNP, bylo potvrzeno SNP rs7906704 (G/T), které dává vznik novému MseI restrikčnímu místu. Četnost minoritní alely rs7906704-T byla významně vyšší u CML pacientů (38 %; $P = 0,04$) v porovnání se zdravými kontrolami. Podle Li et al. (2012) má lokus rs7906704 vliv na apoptotickou dráhu v tumorigenezi pankreatu. Dále jsme identifikovali fragment CTT_ACA_57, který se významně vyskytoval u pacientů s optimální odpovědí na IM (65 %) oproti pacientům, kterým léčba selhala (19 %; $P = 0,03$). Tento fragment je součástí satelitní sekvence ALR/ALpha vyskytující se v centromerních oblastech chromosomů s největší četností přiřazení sekvence na chromosomu 5. Genomové aberace v tomto satelitu byly nalezeny u chronické lymfocytární leukémie (Kim et al., 2010). V této práci jsme použili celogenomovou fragmentační analýzu a NGS k nalezení polymorfismů v DNA, které jsou asociované s CML a odpovědí na léčbu IM. Podařilo se nám identifikovat a potvrdit dvě SNP významně spjaté s CML a 1 polymorfismus v repetitivní oblasti asociovaný s odpovědí na léčbu IM. Kombinace AFLP/NGS představuje vhodný postup pro identifikaci lokusů v genomu pacientů spjatých s CML, ale i dalších onemocnění, jako vhodné alternativy k celogenomovému sekvenování. Podporováno projektem IGA MZ ČR NT11555 a projektem 00023736.

P29/2892. ÚSPĚŠNÁ DLOUHODOBÁ TERAPIE PONATINIBEM U PACIENTA S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ V CHRONICKÉ FÁZI S VÝVOJEM MUTACÍ T315I A MUTACEMI Y253HWT A L364FWT PO II. LINII LÉČBY

Černá O. (IHK FNKV, Praha)

Chronická myeloidní leukémie je raritní hematologické maligní onemocnění, které se řadí do skupiny myeloproliferativních onemocnění. Diagnosticky je charakterizována přítomností Ph chromosomu s translokací mezi chromosomy 9 a 22 a vznikem fúzního genu BCR-ABL. Tento poznatek vedl k vývoji tyrosinkinázových inhibitorů. Zavedení tyrosinkinázových inhibitorů do terapie chronické myeloidní leukémie znamenalo převrat v léčbě tohoto onemocně-

ní. Imatinib, tyrozinkinázový inhibitor první generace, je stále zlatým standardem v léčbě chronické fáze CML. Tímto se výrazně zlepšila prognóza pacientů a jejich celkové přežití je téměř srovnatelné s přežitím populace bez CML. U 25-30 % pacientů však dochází k selhání léčby, vzniku resistance, a to nejčastěji na podkladě vzniku mutací v kinázové doméně. Řada mutací je citlivá na TKIs druhé generace: nilotinib, dasatinib a bosutinib, apod. Mutace T 315I je však většinou na tyto preparáty resistantní. Ponatinib je tyrozinkinázový inhibitor 3. generace. Navozuje dle řady studií i klinického sledování v reálném životě vysoké procento hematologických, cytogenetických i molekulárně genetických odpovědí u pacientů předléčených více liniemi léčby, zejména v chronické fázi CML, a to s výskytem multiresistentní mutace T 315I i bez ní. Terapie tímto lékem může být spjata s rizikem rozvoje arteriálních trombóz. Výskyt těchto komplikací je v 17-27 % v průběhu 3 let. To je však do značné míry závislé na dávce, se snížením dávky se vznik těchto komplikací snižuje. Je nutné pečlivé a cílené sledování pacientů stran výskytu kardiovaskulárních komplikací. Kasuistika: 70ti letý muž, u kterého byla ve věku 64 let diagnostikována chronická myeloidní leukémie v chronické fázi s typem transkriptu b3a2 a vysokým rizikovým Sokalovým, Hasfordovým i EUTOS skóre. Po iniciální cytoredukci hydroxyureou pro hyperleukocytózu byla zahájena terapie I. linie imatinibem. Pro suboptimální efekt léčby po 13 měsících pokračoval pacient terapií II. linie nilotinibem se stabilní hlubokou molekulární remisí. Po 13 měsících byla mutační analýzou při nárůstu transkriptu BCR-ABL prokázána mutace T315I. Došlo postupně ke ztrátě molekulární, cytogenetické i hematologické remise i po vysazení tyrozinkinázových inhibitorů a při terapii maximálními dávkami INF. Byl zaznamenán až vývoj v akcelerovanou fázi CML s nutností kombinace s HU a krátkodobě s dasatinibem. V tomto období byla zahájena terapie ponatinibem s iniciální dávkou 30 mg na den a při cytopenii byla dávka ještě přechodně krátce snižována. Dále pokračoval dávkou 30 mg a při normalizaci krevního obrazu byla léčba plně dávkována na 45 mg. Při této dávce se objevila dermatologická toxicita grade 2. Dále byla proto ponechána při průběžném poklesu transkriptu BCR-ABL dávka 30 mg na den. Terapie byla velmi dobře tolerována, bez ischemických komplikací či jiných projevů toxicity. Pacient dosáhl opět kompletní hematologické, cytogenetické a i velké molekulární remise dle monitorace BCR-ABL. Mutace T 315I však persistuje. Toto kazuistika dokumentuje velice úspěšnou a dobře tolerovanou terapii ponatinibem, bez výskytu vážnějších komplikací léčby. Toto je podmíněno pravidelným sledováním pacienta, úpra-

vou dávkování a event. konkomitantní profylaktickou terapií vzniku ischemickým komplikací. Terapie ponatinibem (Iclusigem) patří nyní dle SPC mezi terapie

2. a 3. generace u pacientů CP CML. Úhrada je zatím dostupná na základě žádosti dle paragrafu 16 u zdravotní pojišťovny.

TRANSPLANTACE

P30/2965. PRVNÍ AUTOLOGNÍ PODÁNÍ PROMYTÝCH HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK (HSC) POMOCÍ SEPAX 2 PACIENTOVI S TĚŽKÝM POŠKOZENÍM LEDVIN

Adamusová L., Kořístek Z., Smejkalová J., Vrublová P., Grebeníček L., Michalíková M., Hájek R. (Klinika hematookologie, Fakultní nemocnice Ostrava; Lékařská fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava)

Úvod: Plně automatizovaný přístroj Sepax 2 (Biosafe, Švýcarsko) patří mezi nejmodernější systémy používané pro promytí kryoprezervovaných hematopoetických kmenových buněk (HSC). Díky specificky vytvořenému programu SmartWash dochází k efektivnímu promytí transplantátu s minimálním vlivem na kvalitu a počet převáděných progenitorů krvetvorby. Promývání transplantátů s sebou přináší mnohé výhody pro pacienta: odstranění DMSO a toxicity s ním spojené, snížení objemu podávaných transplantátů, možnost podání transplantátu bez nutnosti využít centrální žilní katetr, výrazné snížení toxicity pro pacienty s renálním selháním. Kazuistika: Jedná se o 43letého pacienta, u něhož byla v roce 2011 diagnostikována amyloidóza s vícečetným postižením orgánů (ledviny – těžký nefrotický syndrom 15 g/l a renální insuficience, srdce, rektum, játra, polyneuropatie). V době indikace vysokodávkované chemoterapie s autologní transplantací HSC byl nemocný po 3 liniích léčby (VMP, tedy bortezomib, melfalan, prednison; CD, tedy cyklofosamid, dexametazon; RD, tedy lenalidomid, dexametazon), kterou absolvoval na jiném pracovišti, nemoc i přesto progredovala. Pacient v té době již s terminálním renálním selháním s anurií, v chronickém dialyzačním programu. Transplantát získán po mobilizaci G-CSF 10 µg/kg/den, pro nedostatečné vyplavování (poor mobilizer) nutné posílení mobilizace plerixaforem. Během 4 aferéz získán bezpečný transplantát, celkem 2,07x10x6 CD34+ buněk/kg, z technických důvodů (koncentrace

leukocytů) bylo nutné transplantát zamrazit v celkem 12 kryovacích. Před vysokodávkovanou chemoterapií ještě podány 4 cykly VTD (bortezomib, thalidomid, dexametazon). V říjnu 2015 byl za plné podpůrné péče podán melfalan v dávce 100 mg/m² (redukce s ohledem na renální selhání). Prvních 6 vaků s transplantátem (celkem 1,13x10x6 CD34+ buněk/kg) bylo podáno ve dvou dnech, vždy s následnou dialýzou, a bylo provázené polymorfními nežádoucími účinky, z nichž většinu bylo možné připsat toxicitě DMSO: kolísání tlaku, dráždění v krku, pachuť v ústech, bušení srdce, svírání na prsou, slabost a teplota. Zbytek transplantátu, 0,94x10x6 CD34+ buněk/kg, obsažený v celkem 6 kryovacích bylo se souhlasem pacienta promyto bez komplikací pomocí přístroje Sepax 2. Výsledkem bylo odstranění DMSO a významná redukce objemu transplantátu, ze 720 ml na 200 ml. Podání promytého transplantátu se obešlo bez projevů nežádoucích účinků DMSO a bylo velmi dobře tolerováno. Další potransplantačním průběh nebyl zatížen významnými komplikacemi, restituce krvetvorby byla rychlá a úplná (leukocyty > 1x10x9/l den +11, granulocyty > 0,5x10x9/l den+12, trombocyty > 20x10x9/l bez substituce den +14). Závěr: V průběhu roku 2015 byla na našem pracovišti zavedena moderní metoda promývání rozmražených hematopoetických kmenových buněk pomocí přístroje Sepax 2. Validace potvrdily, že se jedná o metodu účinnou a spolehlivou co se do zachování množství a vitality hematopoetických progenitorů týče. Vzápětí se nám naskytla možnost si výhody této metody ověřit i v praxi u prvního pacienta, kterému jsme promyté transplantáty mohli podat. Zdravotní stav pacienta, zejména jeho významné poškození ledvin, bylo první indikací k co možná největší snaze o snížení zatížení ledvin a celého organismu několika násobnými transplantacemi. Díky přístroji Sepax 2 jsme toho mohli docílit jak významným snížením objemu podávaného transplantátu, tak odstraněním toxického vlivu DMSO, bez toho aniž bychom ovlivnili kvalitu podávaného autologního štěpu.

MALIGNÍ LYMFOMY/CHRONICKÁ LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIE

P31/2992. DLOUHODOBÉ VÝSLEDKY APLIKACE SEKVENČNÍHO PROTOKOLU (IMUNO)CHEMOTERAPIE V PRVNÍ LINII LÉČBY DIFUZNÍHO B VELKOBUNĚČNÉHO LYMFOMU

Kubová Z., Procházka V., Fürst T., Papajík T.
(Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc)

Úvod: Difuzní velkobuněčný B lymfom (DLBCL) je nejčastějším typem maligního lymfomu v ČR. Celosvětovým standardem léčby je podání imunochemoterapie R-CHOP, který však u nemocných středního a vyššího rizika dle IPI nedosahuje uspokojivých výsledků. Optimální režim intenzivní indukční terapie v této populaci je předmětem studií. Cíl: Analýza dlouhodobých výsledků riziku uzpůsobené léčby DLBCL Sekvenčním protokolem (SQ). Metoda: Vyhodnotili jsme data 163 konsekutivně zařazených nemocných, kteří byli na základě stanovení rizika lymfomu indikováni pro léčbu SQ protokolem s / bez konsolidace vysokodávkovanou chemoterapií (BEAM200) a autologní transplantací (ASCT). Nemocní byli indikováni pro intenzivní terapii s/bez ASCT na základě IPI a přídatných rizikových faktorů (B symptomy, mimouzlinové postižení u primárně nodálního lymfomu, velká nádorová masa, vyšší hladina beta-2-mikroglobulinu, sérové tymidinkinázy, Ca125, nižší hladiny hemoglobinu pod 120 g/l, přítomnost 17p-, komplexních cytogenetických změn, Ki67 nad 50%, exprese bcl2 proteinu a přechod Folikulárního lymfomu v DLBCL). Celkem bylo analyzován soubor 90 mužů a 73 žen, věku 18-65 let (medián 48 let), kteří byli léčeni v letech 2000-2015. Celkem 119 případů (73,0 %) bylo pokročilého stadia (III/IV dle Ann Arbor), systémové symptomy byly přítomny v 94 případech (57,7 %). U 111 (68,1 %) pacientů bylo zaznamenáno mimouzlinové postižení a u 29 (17,8 %) postižení kostní dřeně. Největší masa nádoru dosahovala v průměru 9,6 cm (medián 9,2 cm). Distribuce dle IPI skóre: L (48, 29,4 %), IL (49, 30,1 %), HI (47, 28,8 %), H (19, 11,2 %). Chemoterapie byla zakončena ASCT u 98 (60,1 %) pacientů, konsolidační radioterapie byla využita ve 14 (8,6 %) případech. Rituximab byl do léčby zařazen od roku 2003, celkem byl aplikován u 125 (76,7 %) nemocných. Výsledky: Po indukční léčbě bylo dosaženo 85,9 % CR/uCR, 6,7 % PR, 1,8 % SD a 4,9 % nemocných na léčbě progredovalo, u 1 pacienta nebyla odpověď hodnocena. Během sledování (medián

88,1 měsíců) došlo k progresi/relapsu lymfomu u 42 (25,8 %) a k úmrtí u 36 (22,1 %) nemocných. Interval do progresu (PFS) v 5 - ti letech dosáhl 74,8 % (95% CI 68,0-81,2) a celkové přežití (OS) pak 81,8 % (95% CI 75,8-87,8). Aplikace rituximabu významně prodloužila 5 - ti leté PFS (50,0 % vs. 80,6%, $p < 0,001$) i OS (60,5 % vs. 86,7%, $p < 0,001$). Provedení ASCT v rámci konsolidace vedlo k menšímu počtu relapsů/progresí (5 - leté PFS 66,5 % vs. 77,9 %, $p = 0,033$), což se promítlo do lepšího celkového přežití (5 - leté OS 73,6 % vs. 85,2 %, $p = 0,032$). Závěr: Sekvenční protokol chemoimunoterapie aplikovaný v rámci filozofie riziku uzpůsobené léčby vede k vysokému procentu kompletních remisí a dlouhodobé kontrole DLBCL. Prezentace na konferenci bude doplněna intention-to-treat analýzou a popisem toxicity režimu. Dedikace: Podpořeno grantem IGA_LF_2016_001

P32/2989. IMUNOCHEMOTERAPIE PODLE SEKVENČNÍHO PROTOKOLU JAKO VHDNÁ ALTERNATIVA INTENZIVNÍ LÉČBY MCL

Obr A., Procházka V., Jirkuvová A., Papajík T.
(Hemato-onkologická klinika FN, Olomouc; LF UP, Olomouc)

Lymfom z buněk pláštové zóny (MCL) je obvykle agresivní lymfoproliferativní onemocnění se značnou biologickou i klinickou variabilitou. Mladší nemocní s pokročilou chorobou a bez významné komorbiditity by měli v první linii léčby podstoupit vysocedávkovanou imunochemoterapii s následnou autologní transplantací periferních kmenových buněk (ASCT). Ideální složení indukční imunochemoterapie zůstává předmětem diskuse. V naší unicentrické retrospektivní analýze jsme hodnotili výsledky intenzivní terapie podle sekvenčního protokolu (SQ) u nemocných s MCL. Vyhodnotili jsme data 34 nemocných (25 mužů, 9 žen) léčených SQ protokolem (3 x PACEBO, 1 x IVAM a 1 x HAM) v letech 2000 - 2015. Medián věku v době diagnózy byl 57,5 let (38,4 - 63,5). Pokročilé stádium choroby podle Ann Arbor (III + IV) mělo 33 (97 %) pacientů. Podle mezinárodního prognostického indexu pro MCL (MIPI) bylo 19 nemocných s vysokým (56%), 8 se středním a 7 s nízkým rizikem. Kompletní SQ protokol dokončilo 33 nemocných, 1 zprogredoval na léčbě. Rituximab byl jako součást polychemoterapie v 1. linii u 32 (94%) léčených. ASCT podstoupilo 29 nemocných. 21 nemocných (62%) dosáhlo po léčbě CR, 8 (23%) PR, 4 (12%) PD či SD a 1 (3%) zemřel během terapie pro progresi lymfomu.

Léčebná odpověď byla hodnocena u transplantovaných v den +100, u netransplantovaných s odstupem 5-6 týdnů po ukončení terapie 1. linie. Při mediánu sledování 41,4 měsíců (3,5 roku) žije 22 (65%) pacientů, z toho 20 bez známek relapsu MCL. 3-leté přežití bez progresu/relapsu (PFS) dosáhlo 74% (95% CI 0,58 - 0,89). 3-leté celkové přežití (OS) 78% (95% CI 0,62 - 0,92). Křivka PFS dosáhla plateau po 4,5 letech na úrovni 54%, křivka OS pak po 6-ti letech na úrovni 61%. Intenzivní imunochemoterapie podle sekvenčního protokolu +/- ASCT má při přijatelné toxicitě srovnatelné výsledky léčebných odpovědí a přežití s Nordickým protokolem (Geissler 2012) nebo s imunochemoterapií dle protokolu R-hyperCVAD/MA (Romaguera 2005). Indukce R-SQ protokolem se jeví u naší populace jako vhodná alternativa jiných léčebných režimů. Podpořeno granty: IGA_LF_2016_001 a IGA-MZ NT/13072-4

P33/2982. INFEKČNÍ KOMPLIKACE PŘI LÉČBĚ INHIBITORY PŘENOSU SIGNÁLU Z B-BUNĚČNÉHO RECEPTORU U NEMOCNÝCH S RELABUJÍCÍ CHRONICKOU LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIÍ

Urbanová R., Turcsányi P., Ryznerová P., Kubová Z., Procházka V., Papajík T. (Hemato-onkologická klinika LF UP a FN, Olomouc)

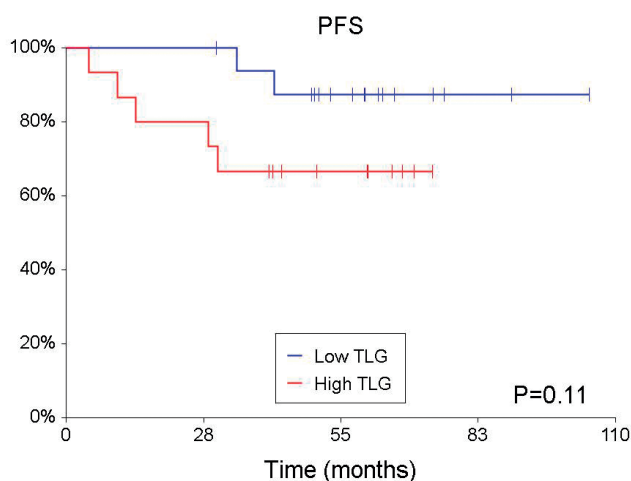
Úvod: U rizikových nemocných s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) s časným relapsem onemocnění, u delece 17p- nebo mutace p53 v první linii léčby nebo v relapsu je indikována moderní, vysoce účinná terapie inhibitory přenosu signálu z B-buněčného receptoru (BCR), ibrutinibem (ibru) nebo idelalisibem (idel) v kombinaci s rituximabem (R). Materiál a metody: Referujeme výskyt infekčních komplikací u 18ti nemocných s relapsem CLL léčených ibru a R-idel na HOK LF UP a FN Olomouc od 12/2014, kdy jsme léky začali používat. Medián věku nemocných byl 65 let (rozmezí: 52 - 74 let), zastoupení mužů/žen 13/5. Výskyt 17p-/11q-/komplexních změn byl u 5/9/10 nemocných, nemutovaný stav IGHV mělo 16 nemocných, klonální vývoj nemoci byl zaznamenán u 7 nemocných. Medián počtu předchozích linií léčby byl 4 (rozmezí: 2 - 8), relaps/refrakterní (R/R) onemocnění mělo 12 nemocných. Medián délky léčby inhibitory BCR je 7 měsíců (rozmezí: 2,5 - 14 měsíců). Celkový počet dosažených léčebných odpovědí (ORR) byl velmi vysoký, 93 %, přestože se jednalo o rizikové, značně předléčené nemocné. Zemřelo 5 nemocných, z toho 3 na infekční komplikaci, 1 nemocný na sekundární karcinom a 1 na transformaci onemocnění do DLBCL. Medián celkového přežití (OS) od zahájení léčby ibru a R-idel byl 9,3 měsíce, pravděpo-

dobnost OS v 6ti měsících byla 84 %. Výsledky: U 9 z 10 nemocných na ibru byly pozorovány před zahájením léčby recidivující infekce (z toho u 8 nemocných stupně 3 a 4), v průběhu léčby ibru byly infekce zaznamenány u 7 z 10 nemocných (u všech 7 stupně 3 - 5). U nemocných léčených R-idel byly infekce před léčbou u všech 8 (u 4 stupně 3 a 4), během léčby R-idel se vyskytly u 5 nemocných (u 3 z nich stupně 3 a 4). Rituximab v doporučeném počtu 8 cyklů v rámci R idel pro infekce nedokončili 3 z 5 hodnocených nemocných. Letální infekční komplikace byly: sepse s komplikujícím infarktem myokardu, progresivní multifokální encefalopatie (PML) a kryptokoková infekce. Dva případy letálních infekčních komplikací budou rozebrány podrobně. Případ 52letého nemocného s časným relapsem onemocnění po 2 liniích léčby, který zemřel krátce po zahájení terapie ibru na PML ve stádiu aktivní CLL a případ 66letého nemocného, po 8 liniích předchozí léčby s R/R chorobou, s anamnézou recidivujících infekcí, který zemřel na kryptokokovou infekci na léčbě ibru ve stádiu stabilní nemoci. Závěr: Moderní léčba inhibitory přenosu signálu z BCR přinesla naději rizikovým a relabujícím nemocným s CLL. Díky dosažení velmi dobré léčebné odpovědi jsme u jednotlivých nemocných pozorovali zmírnění průběhu infekčních komplikací, přesto popisujeme závažné infekce stupně 3 a 4 často. Stejně tak zůstávají infekce ve sledovaném období častou příčinou úmrtí. První zkušenosti s léčbou v reálné klinické praxi nás nutí k zamyšlení, zda by indikace léčby inhibitory BCR u časnějších relapsů CLL nevedla ke snížení rizika závažných infekcí a zlepšení celkových výsledků této jinak vysoce účinné terapie. Podpořeno IGA LF 2016 001

P34/2973. STANOVENÍ KVANTITATIVNÍCH UKAZATELŮ FDG-PET U NEMOCNÝCH S HODGKINOVÝM LYMFOMEM

Šustková T., Procházka V., Henzlová L., Buriánková E., Ptáček J., Papajík T. (Lékařská fakulta UP, Olomouc; Hemato-onkologická klinika FN a LF UP, Olomouc; Klinika nukleární medicíny FN a LF UP, Olomouc)

Úvod: Pozitronová emisní tomografie (PET) je standardní metodou stanovení stádia lymfomu a léčebné odpovědi u nemocných s Hodgkinovým lymfomem (HL). Využití kvantitativních dat (QT-PET) o objemu nádoru (Metabolic Tumor Volume, MTV) a jeho metabolismu (Total Lesion Glycolysis, TLG) při diagnóze představuje nový atraktivní biomarker pro odhad prognózy nemocných. Cíl: retrospektivní analýza pilotních dat QT-PET u nově diagnostikovaných nemocných s HL Metoda: Analyzovali jsme PET skeny nemocných s klasickým HL. Všechna vyšetření



byla provedena na shodném kalibrovaném přístroji (Siemens Biograph-16), analýza dat byla realizována pomocí Siemens Workstation, programu Syngo.via a software PET Compare. Standardizace vyšetření byla realizována měřením hodnot SUVmax, SUV mean a MTV pomocí fantómu NEMA IEC Body phantom. Oblasti analýzy (Regions-of-Interest, ROIs) byly definovány jako voxely s aktivitou 41 % SUVmax a vyšší. Hodnota TLG byla vypočítána jako součet součinů MTV a SUVmean ze všech PET+ lokalit. Výsledky: Celkem jsme analyzovali data 32 nemocných, 12 mužů a 20 žen s mediánem věku při dg. 34,6 let (rozmezí 18,4-58 let). Histologické subtypy HL: nodulární skleróza u 22 (69 %), smíšená buněčnost u 8 (25 %) a na lymfocyty bohatý HL u 2 (6%). Stádia dle německé skupiny pro studium HL (GHSG): časná u 3 (9%), střední u 11 (34%) a pokročilá u 18 (56 %) nemocných. Bulk byl přítomen u 18 (56 %) pacientů. Chemoterapie byla podána u 31 nemocných dle protokolu: BEACOPPesc u 22 (69 %), ABVD u 5 (16 %), Stanford V u 2 a COPP/ABV u 1 nemocného. Kompletní remise byla dosažena u 28 (88%), parciální u 2 (6 %) a 2 (6 %) nemocní na léčbě progredovali. Během sledování souboru (medián 60,4 měsíců) došlo k progresi/relapsu u 7 (22 %) pacientů a 3 nemocní zemřeli. Přežití bez progresu v 5-ti letech (PFS) dosáhlo 77,5 %, celkové přežití v 5-ti letech 89,5 %. QT-PET data: průměrná hodnota TLG dosáhla 600,79±630,7; medián 354,9. Průměrná hodnota MTV 80,3±82,2 cm³; medián 53,0 cm³. Korelace QT-PET se stádii dle GHSG nebyla nalezena pro TLG (p=0,60), v případě MTV byl trend vyššího zastoupení pokročilých forem nemoci u vysokého MTV (p=0,18). Přítomnost bulku korelovala s vyšším MTV a TLG (p=0,036 pro obě proměnné). Kvalita léčebné odpovědi celkově nekorelovala s MTV a TLG (p=0,29 pro obě proměnné), nicméně 3 ze 4 non-CR nemocných měli vyšší MTV i TLG. Nemocní, u nichž došlo

k progresi/relapsu měli při dg častěji vyšší MTV a TLG (p=0,047). Nemocní s vyšším MTV a TLG (nad medián) měli trend s horším 5-ti letému PFS (66,7% vs 87,5 %, p=0,11). Závěr: Nemocní s HL mají při diagnóze velmi variabilní hodnoty kvalitativně měřených parametrů lymfomu, které jen volně korelují se standardně používanými parametry pro stanovení rozsahu nemoci. Pilotní soubor naznačuje možný prediktivní potenciál QT-PET. Výsledky budou dále rozvíjeny na větším souboru nemocných. Dedikace: Podpořeno programem Studentské vědecké odborné činnosti (SVOČ) LF UP a granty: IGA_LF_2016_001 a Takeda IISR-2015-101289.

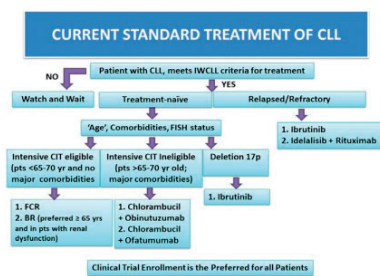
P35/2957. LÉČBA RIZIKOVÉ CLL A POSTAVENÍ ALOGENNÍ TRANSPLANTACE V ÉRE NOVÝCH INHIBITORŮ

Fečková Mihályová J., Zuchnická J. (Klinika hematologie, Fakultní nemocnice, Ostrava)

Úvod: Pacienti s chronickou lymfocytární leukemií s vysokým cytogenetickým rizikem (del 17p a/nebo mutaci TP 53, nemutovaný IGVH, del 11q) špatně reagující na chemoimunoterapii (CIT) patří do skupiny pacientů, pro které inhibitory B buněčného receptoru (BCR) jsou vyhlídkou na zlepšení prognózy. Management terapie není jednoduchý a rozhodnout se mezi terapií inhibitory nebo alogenní transplantací je ovlivněné více faktory. Od roku 2012 byl na naší klinice ambulantně sledovaný muž (37let). V době stanovení diagnózy klinické stadium (KS) II dle Raie, B dle Bineta, Matutes 4/5, del 13q, del 17p, nemutovaný IGVH gen, status p53 funkční, CIRS1. O 30 měsíců později dosáhl indikační kritéria k léčbě (doubling time lymfocytů, progresse lymfadenopatie, B symptomy) a byl iniciovaný do studie fáze II idelalisib + rituximab. V centrální laboratoři del 17p opakovaně nebyla potvrzena a u pacienta byla zahájena terapie FCR ve standardních dávkách. Po 4 cyklech dosáhl hematologickou remisi, dle velikosti LU ale přetrvávala stable disease (SD). Navrženou alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (aloHSCT) v té době odmítl. Současně byla odeslána žádost na pojišťovnu ke schválení idelalisibu, která byla negativní. Jako 5. cyklus a následně další 2 cykly jsme aplikovali režim RCD. Po 8 cyklech (7 měsíců od zahájení léčby), byla dosažena parciální remise (PR) a pacient byl zařazený do transplantačního programu s nepříbuzenským HLA shodným dárce v dubnu 2016 (10 měsíců od zahájení léčby). Co by bylo jinak? Negativní výsledek del 17p v centrální laboratoři neumožnil v 1. linii aplikaci idelalisib+rituximab. Diskrepance mezi nálezem byla 70% pozitivních buněk s del 17p zjištěných metou FISH vs. threshold 7%. Objasnit negativitu tohoto

studie	follow up (měsíc)	počet pacientů	regimn	ORR (%)	median PFS	median OS
GS-US-312-0116 (NCT01339512)	17	220	rituximab+/- idelalisib	74,5 vs. 34,5	u 95% nebyl dosažen vs. 5,5 měsíců	nebyl dosažen
POC-1112-CA (NCT01578707)	16	391	ibrutinib vs. ofatumumab	90 vs. 25	u 95% nebyl dosažen vs. 8 měsíců	nebyl dosažen

výsledky studií u pacientů s R/R léčených BCR inhibitory, poslední up date: 4/2015 a 11/2015 (GS-US-312-0116 a POC-1112-CA)



Nitin Jain a Susan O'Brien, Targeted therapies for CLL: Practical issues with the changing treatment Paradigm, 2015

Studie	regimn	del 17p
DUO (NCT02004522)	duvelisib vs. ofatumumab	+/-
HELIOS (NCT01611096)	BR +/- ibrutinib	-
ACE-CL-006 (NCT02477696)	ACP-196 vs. ibrutinib	+/- del 11q
TG Therapeutics (NCT02301156)	ibrutinib +/- ublituximab	+/- del 11q/ mutation TP53
GS-US-312-0115 (NCT01569295)	BR +/- idelalisib	+/-
Abbvie/Roche (NCT02035471)	Ezetodaxif vs. BR	+/-

studie	Regimn	del 17p	vek (roky)
RESONATE-2 (NCT01722487)	ibrutinib vs. Chlorambucil	-	>65
POC-1130-CA (NCT02264574)	ibrutinib + obinutuzumab vs. chlorambucil + obinutuzumab	+/-	>68
ALLIANCE A01202 (NCT01888272)	ibrutinib vs. IR vs. BR	+/-	>65
GS-US-312-0118 (NCT01980875)	idelalisib + obinutuzumab vs. chlorambucil + obinutuzumab	+/-	>68
GS-US-312-0123 (NCT01980888)	BR +/- idelalisib	+/-	>68
ACE-CL-007 (NCT02475681)	ACP-196 vs. ACP-196 + obinutuzumab vs. Chlorambucil + obinutuzumab	+/-	>68
Abbvie/Roche (NCT02429482)	venetoclax + obinutuzumab vs. Chlorambucil + obinutuzumab	+/-	>68

probíhající a plánované studie fáze III pro pacienty v primoléčbě

výsledku se nám nepodařilo. Odmítnutí aloHCST pacientem a neschválení idelalisibu vedlo k aplikaci dalších 3 cyklů chemoterapie a opětovnému směřování pacienta k transplantaci. Do transplantačního programu byl zařazen v době dosažení PR, 2 měsíce před plánovaným převodem transplantátu. AloHCST představuje zatím jedinou potencionálně kurativní modalitu i když její postavení v éře BCR inhibitorů a dalších nových molekul bude modifikované. Z hlediska lepší léčebné odpovědi je transplantace po CIT plánovaná v čase dosažení první remise. Dle retrospektivní studie European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) a prospektivní studie German CLL Study Group (GCLLSG) je OS a PFS ve 2 letech 70 a 28 % (EBMT), ve 3 letech 79 a 33% (GCLLSG). Renesanci v léčbě CLL přinesli inhibitory BCR. Idelalisib a ibrutinib již byli schváleny v terapii v terapii R/R CLL. Idelalisib v kombinaci s rituximabem i jako primoléčba pacientů s del 17p a/nebo mutaci TP53, kteří nejsou vhodní k chemoimunoterapii. Popřední místo má ale ibrutinib, je indikovaný k primoléčbě pacientů s del 17p (Farooqui et al. uvádí skupinu 35 pacientů léčených v 1. linii ibrutinibem, ORR 97%, 12% CR, PFS 91% ve dvou letech). Další inhibitory BCR, které jsou předmětem více studií jsou uvedené v tabulce 1. Uplatnění v léčbě budou mít i nové monoklonální

protilátky, Bcl-2 antagonisti, imunomodulační léky a některé další (chimerický antigenní receptor (CAR) T cells). Závěr: Postavení aloHCST nestrácí svůj význam, měla být zvažovaná u pacientů s vysokým rizikem léčebných některým z nových inhibitorů a u pacientů rezistentních vůči těmto inhibitorům. Jestli transplantovat v době nejlepší léčebné odpovědi nebo vyčkat progresu není aktuálně jasné.

P36/2946. HODNOCENÍ IMUNITNÍCH DEFEKTŮ U NEMOCNÝCH S CHRONICKOU LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIÍ: PILOTNÍ VÝSLEDKY

Vodárek P., Andrýs C., Jurenková A., Motyčková M., Řezáčová V., Souček O., Šimkovič M., Vokurková D., Belada D., Žák P., Smolej L. (IV. interní hematologická klinika, FN a LF UK, Hradec Králové; Ústav klinické imunologie a alergologie, FN a LF UK, Hradec Králové)

ÚVOD: Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je spojená s významným kombinovaným imunodeficitem. Ten je příčinou zvýšeného výskytu infekcí, které jsou nejčastější příčinou úmrtí nemocných s CLL. Řada mechanismů imunosuprese u CLL však není dosud dobře prozkoumána. CÍLE: Komplexní zhodnocení buněčné a humorální imunity u nemocných s neléčenou CLL. NEMOCNÍ A METODIKY: Imunitní funkce byly prospektivně hodnoceny u neléčených nemocných s CLL sledovaných na IV. interní hematologické klinice FN a LF UK Hradec Králové. Dosud bylo vyšetřeno 41 nemocných (28 mužů, medián věku 67 let, nízké/střední/vysoké modifikované riziko dle Raie u 7/16/18 nemocných). Parametry buněčné imunity (absolutní počty Th lymfocytů (1y), Tc-1y, polyklonálních B-ly a NK buněk) byly hodnoceny průtokovou cytometrií (cytometr Navios, Beckman Coulter). Sérové koncentrace cytokinů (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-33 a IFN-gamma) byly stanoveny metodou X-MAP (Luminex). Humorální imunita byla hodnocena měřením koncentrací jednotlivých tříd a podtříd imunoglobulinů (IgG1-4, IgM a IgA) imunonefelometricky pomocí kitů Image Immunochemistry System (Beckman Coulter), a dále testem aktivace komplementu pomocí kitů Wieslab Complement System Screen (Euro Diagnostica). Zároveň byly sbírána klinická data o prodělaných infekcích. Při statistické analýze dat humorální imunity byl využit kontrolní soubor 46 zdravých dárců krve (27 mužů, medián věku 40 let). VÝSLEDKY: U nemocných s CLL byla ve srovnání se zdravými kontrolami výrazně zvýšená aktivace komplementu lektinovou a alternativní cestou (p=0,005 a p=0,0028). Nemocní s CLL měli dále výrazně vyšší koncentrace IL-4,

IL-6, IL-10 a IFN-gamma ($p < 0,0001$). Nemocní, kteří prodělali závažné infekce ($n=8$) měli významně nižší relativní počet T-ly, Th-ly, polyklonálních B-ly a NK buněk ($p=0,03$, $p=0,017$, $p=0,005$ a $p=0,046$) a také nižší koncentrace celkového IgG a IgG2 ($p=0,108$ a $p=0,063$). Nemocní s progresí CLL ($n=25$) měli významně nižší koncentrace IgG2 a IgM ($p=0,011$ a $p=0,05$). ZÁVĚR: Naše pilotní výsledky ukazují na vliv relativních (ne však absolutních) počtů lymfocytárních populací na vývoj infekcí. To lze vysvětlit imunopresivním vlivem leukemického klonu, od jehož velikosti se relativní počty lymfocytů odvíjejí. Dále byla u nemocných pozorována významně zvýšená aktivace komplementu lektinovou a alternativní cestou a významné zvýšení sérových koncentrací IL-4, IL-6, IL-10 a IFN-gamma. Nižší koncentrace sérového IgG včetně podtříd byly spojeny s progresí onemocnění a vyšším rizikem závažných infekcí. Budou prezentována aktualizovaná data. Podpořeno RVO MZ ČR (FNHK, 00179906) a grantem Vnitřní soutěže Lékařské fakulty UK v Hradci Králové „Prognostický význam exprese HLA-G na buňkách chronické lymfocytární leukémie.“

P37/2943. NOVÁ KOMBINACE ANTIGENŮ VHDNÁ PRO SLEDOVÁNÍ MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ NEMOCI U VLASATOBUNĚČNÉ LEUKEMIE METODOU PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

Chovancová J., Hrabčáková V., Osičková J., Borský M., Dvořáková D., Doubek M. (CEITEC, Brno)

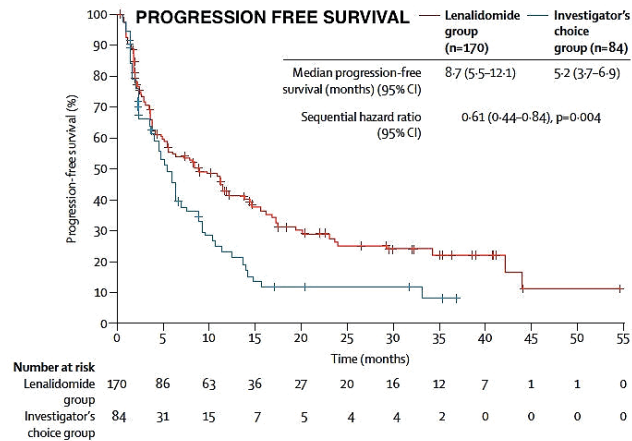
Úvod: Vlasatobuněčná (trichocelulární; hairy-cell) leukémie (HCL) je vzácné onemocnění vyskytující se převážně u starší populace obyvatel. Podle WHO klasifikace z r. 2008 se jedná o lymfoproliferativní onemocnění ze zralých B-lymfocytů. Buňky HCL vykazují typické morfologické a imunohistochemické znaky. Leukemické buňky jsou dobře detekovatelné i pomocí průtokové cytometrie za použití specifických monoklonálních protilátek proti povrchovým antigenům a imunoglobulinových řetězcům. Molekulární analýza DNA umožňuje prokázat také přeskupení genu pro imunoglobulinové řetězce a detekovat získanou mutaci protoonkogenu BRAF V600, která je prokázaným spolehlivým markerem tohoto onemocnění. Na našem pracovišti se v rámci diagnostických protokolů setkáváme s pacienty, u kterých byla dg. vlasatobuněčná leukémie prokázána molekulárně, a také pomocí specifického fenotypu. Existuje ale skupina pacientů s fenotypem, který splňuje kritéria pro tzv. wild-type HCL či jinou zralou B-lymfoproliferaci, přičemž odlišení od fenotypu „klasické“ HCL není vždy jednoznač-

né. V minulých letech se diagnostika HCL pomocí průtokové cytometrie zaměřovala hlavně na detekci exprese antigenů CD11c, CD103, CD25 včetně pan-B-lymfocytárních znaků (CD19, CD20, CD22, CD79a). Kombinace pozitivita více antigenů současně v rámci jedné analýzy je považována u této diagnózy za vysoce specifickou metodu. V porovnání s fyziologickými B-lymfocyty jsou jednotlivé antigeny exprimovány na povrchu leukemických buněk s rozdílnou mírou exprese. Na našem pracovišti jsme se zaměřili na srovnání relevance sledování nově popsáných antigenů typických pro pacienty s HCL a výsledky molekulární analýzy mutace BRAF V600. Moderní terapeutické protokoly zvyšují nároky na monitorování minimální reziduální nemoci (MRD), a tím včasné odhalení relapsu onemocnění. V naší práci navrhuje kombinaci vhodných antigenů, které umožní vysoce citlivou detekci MRD, a tedy zlepšení predikce odpovědi na léčbu nebo pokračující remise. Metodika: Do studie bylo zatím zahrnuto 10 pacientů s nově diagnostikovanou HCL, u kterých byla zjištěna mutace genu BRAF V600, a 10 zdravých kontrol. Metodou osmibarevné průtokové cytometrie byla na vzorcích periferní krve (PK) sledována exprese povrchových antigenů CD11c, 19, 20, 25, 48, 103, 123, 160, 200 a 305. Osmibarevná analýza byla provedena na cytometru FACSCantoII. Výsledky: Signifikantně vyšší exprese na buňkách HCL v porovnání se zdravými B lymfocyty byla kromě v diferenciální diagnostice standardně využívaných antigenů (CD11c, 25 a 103) nalezena u znaků CD48, 200 a 305 ($p < 0,01$). Dále byla u poloviny pacientů zjištěna pozitivní exprese antigenu CD160. Expese antigenu CD123 byla negativní u jednoho pacienta. Závěr: U diagnózy HCL se často setkáváme s variabilním imunofenotypem, který komplikuje společně s přesným stanovením diagnózy i následné monitorování MRD. Rozšíření standardně využívané kombinace sledovaných znaků o znaky CD48, 200 a 305 by mohlo umožnit vysoce senzitivní detekci MRD a zároveň pomoci při diferenciální diagnostice B lymfoproliferací.

P38/2934. RANDOMIZOVANÁ MULTICENTRICKÁ STUDIE FÁZE II HODNOTÍCÍ LENALIDOMID VE SROVNÁNÍ S LÉKEM NEJLEPŠÍ VOLBY PODLE ZKOUŠEJÍCÍHO U RELABUJÍCÍHO/ REFRAKTERNÍHO LYMFOMU Z PLÁŠŤOVÝCH BUNĚK: VÝSLEDKY STUDIE MCL-002 (SPRINT)

Trněný M., Klener P., Lamy T., Walewski J., Jurczak W., Belada D., Mayer J., Radford J., Alexeeva J., Osmanov D., Biyukov T., Patturajan M., Casadebaig Bravo M.-L., Arcaini L. (I.interní klinika, 1. Lékařská fakulta UK a Všeobecná fakultní nemocnice, Praha - CZ; Oddělení hematologie, Hôpital Pontchaillou, Rennes - F; Oddělení lymfoidních malignit, Onkologické centrum, Institut Marie Curie Skłodowské, Varšava - PL; Oddělení hematologie, Jagellonská univerzita, Krakow - PL; IV. interní hematologická klinika, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice, Hradec Králové - CZ; Interní hematologická a onkologická klinika Fakultní nemocnice, Brno - CZ; The University of Manchester and The Christie NHS Foundation Trust, Manchester - GB; Federální centrum lékařského výzkumu, St. Petersburg - RUS; Onkologické výzkumné centrum, Moskva - RUS; Celgene Research and Development, Sarl - CH; Celgene Corporation, Summit, NJ - USA; Oddělení hematologie a onkologie, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo & Oddělení molekulární medicíny, Univerzita v Pavii, Pavia - I)

Úvod: Lymfom z pláštěvých buněk (MCL) je agresivní non-Hodgkinský lymfom se špatnou prognózou, a to zejména po selhání léčby první linie. Lenalidomid je imunomodulační látka s protinádorovým a antiproliferativním účinkem, u kterého byla prokázána účinnost v jednoramenné studii fáze II u pacientů s relabující/refrakterní (R/R) formou MCL. Prezentovaná randomizovaná studie srovnávala účinnost a bezpečnost lenalidomidu s lékem volby podle zkoušejícího (IC) u pacientů s R/R MCL. Metodika: Do evropské multicentrické randomizované fáze II MCL-002 (SPRINT) byli zařazeni pacienti, u nichž došlo k selhání léčby s maximálně 3 relapsy a kteří nebyli způsobilí k intenzifikované léčbě nebo k transplantaci kmenových buněk (NCT00875667). Perorální lenalidomid byl podáván v dávce 25 mg/den ve dnech 1 až 21 každého 28denního cyklu až do progresse onemocnění (PD) nebo nesnášenlivosti. Léčba IC sestávala z monoterapie cytarabinem, rituximabem, gemcitabinem, fludarabinem nebo chlorambucilem. Pacientům, u kterých došlo k progresi při léčbě IC, byl povolen přechod na lenalidomid. Primárním endpointem bylo přežití bez progresse (PFS). Hodnocení odpovědi bylo centrálně přehodnoceno za použití modifikova-



Tabulka. Účinnost lenalidomidu vs. IC u R/R MCL

Účinnost	Lenalidomid (n=170)	IC (n=84)	P
PFS (Lenalidomid vs. IC)			
Medián PFS, měsíce (95% CI)	8,7 (5,54-12,14)	5,2 (3,67-6,95)	
Sekvenční HR (95% CI)	0,61 (0,44-0,84)		
Sekvenční log-rank test, hodnota p	0,004		
ORR, n (%)	68 (40)	9 (11)	<0,001
CR/CRu, n (%)	8 (5)	0 (0)	0,043
Medián DOR, měsíce	16,1	10,4	0,421
Medián OS, měsíce	27,9	21,2	0,52

ných kritérií IWG. Výsledky: 254 pacientů s R/R MCL bylo randomizováno v poměru 2 : 1 k léčbě lenalidomidem (n = 170) nebo IC (n = 84). Medián věku činil 68,5 let, s převahou mužů (73 %) a mediánem 2 předchozích terapií. V době diagnózy bylo 91 % pacientů (pac.) ve stádiu III/IV, v době vstupu do studie mělo 74 % pac. vysoké nebo středně vysoké dle MIPI, 43 % velkou nádorovou nálož a 20 % „bulky“ onemocnění. Pacienti v rameni s lenalidomidem měli řadu horších prognostických parametrů (> 5 procentních bodů) než pac. v rameni s IC. V mediánu 2,9 měsíců bylo 39 pacientů (46 %) z ramene IC převedeno na lenalidomid v důsledku PD. S mediánem sledování 15,9 měsíců bylo pozorováno 39 % snížení rizika progresse nebo úmrtí (PFS) ve prospěch lenalidomidu (HR = 0,61 [95% CI, 0,44 až 0,84]; P = 0,004; Tabulka). Medián PFS činil 8,7 měsíců u lenalidomidu vs. 5,2 měsíců u IC. Celková míra odpovědi

(ORR) byla významně vyšší u lenalidomidu než u IC (40 % vs. 11 %; poměr CR/CRu činil 5 % oproti 0 %). Medián doby do první odpovědi činil 4,3 měsíce pro lenalidomid (u IC nebylo odpovědi dosaženo). Medián DOR (16,1 vs. 10,4 měsíců) a medián OS u kompletních údajů (27,9 vs. 21,2 měsíců) byl delší u lenalidomidu než u IC (rozdíly nebyly statisticky významné). Výsledky účinnosti byly konzistentní ve všech podskupinách. Údaje o bezpečnosti u 250 pacientů, kteří užili ≥ 1 dávku, prokázaly výraznější snížení dávky u pacientů léčených lenalidomidem (41 %) vs. IC (17 %), částečně v důsledku delšího mediánu trvání léčby lenalidomidem ve srovnání s IC a přísných pravidel pro modifikaci dávky lenalidomidu. Nejčastější nežádoucí účinky (AE) stupně 3/4 byly neutropenie (lenalidomid 44 % vs. IC 34 % [bez zvýšeného rizika infekce]), trombocytopenie (18 % vs. 28 %) a leukopenie (8 % vs. 11 %). „Tumor flare“ reakce se vyskytly pouze u pacientů léčených lenalidomidem (10 %, ve 2 % stupeň ≥ 3); U 1 pacienta v každém rameni došlo k syndromu nádorového rozpadu. Druhá primární malignita byla pozorována u 4 % resp. 5 % pacientů léčených lenalidomidem resp. IC. Závěr: Studie MCL-002 prokázala signifikantní a klinicky významné zlepšení PFS u lenalidomidu ve srovnání s kontrolním ramenem u pacientů s pokročilým R/R MCL. Dále došlo k numerickému zlepšení parametrů ORR a CR, TTR, DOR a OS ve prospěch lenalidomidu. Toxicita lenalidomidu byla očekávatelná a zvládnutelná.

P39/2933. DENZITA HRS BUNĚK A VZTAH MEZI HRS BUŇKAMI A LAM (LYMPHOMA-ASSOCIATED MACROPHAGES) VE VZTAHU K PROGNÓZE NEMOCNÝCH S HODGKINOVÝM LYMFOMEM

Procházka V., Papajík T., Dihel M., Mikulková Z., Dýšková T., Prouzová Z., Kriegová E., (Hematologická klinika, Fakultní nemocnice, Olomouc; Ústav imunologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc; Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol, Praha)

Klasický Hodgkinův lymfom (cHL) je charakteristický extrémní nerovnováhou mezi zastoupením maligních HRS buněk (Hodgkinovy, Reed-Sternbergovy buňky, 0,1-10%) a buněk mikroprostředí. Nedávné práce prokázaly negativní prognostický vliv vysoké hustoty LAM (lymphoma-associated macrophages) v době diagnózy. Dosud však nebyl studován vztah mezi denzitou HRS buněk a poměrem mezi HRS buňkami a LAM na vývoj onemocnění. Studovali jsme proto vzorky z doby diagnózy získané od 38 pacientů s cHL. Hodnoceny byly řezy se základním barvením hematoxylinem a imuno-

histochemickým barvením pomocí CD30 (HRS), CD68 (LAM). Po naskenování vzorku pomocí automatické analýzy TissueFAXS (TissueGnostics, Vienna, Austria) byla manuálně odlišena (gatována) nádorová tkáň (TTS – total tumor sample) a vyloučeny oblasti fibrózní, nekrotické či znehodnocené tkáně; získaná data byla dále zpracována TissueQuest softwarem. Během doby sledování (medián 64,8 měsíců od ukončení léčby) došlo u 9 (24%) pacientů k relapsu či progresi cHL (RR kohorta) a 7 (18%) pacientů zemřelo. U 22 (58%) zařazených pacientů nebyl během doby sledování zaznamenán návrat onemocnění (skupina „relapse-free“, RF). TTS zaujímala 27,2 \pm 13,5 mm², průměrný počet buněk ve studovaných vzorcích byl 461504 \pm 286491 buněk/mm², přičemž TTS ani počet buněk/mm² se u RR a RF kohort nelišily (P>0,05). Denzita CD30+ HRS byla vyšší u pacientů RF než RR (283 vs 93 buněk na mm², P=0,006). Poměr CD68+/CD30+ buněk (LAM/HRS) byl vyšší u RR skupiny než u RF pacientů (13,1 vs. 7,5). Vysoký poměr LAM/HRS (>7,5) byl asociován s horším 5-letým PFS (41,1% vs. 94,7%, P=0,001) a OS (62,2% vs. 100%, P=0,004). Multivariantní Cox analýza prokázala, že vysoký poměr LAM/HRS je nepříznivým prognostickým faktorem pro PFS (P=0,01, HR=13,3) nezávislým na věku, pohlaví, stádiu a subtypu lymfomu. Naše výsledky naznačují využitelnost měření denzity HRS buněk a poměru mezi HRS buňkami a LAM v prognózování pacientů s Hodgkinovým lymfomem. Ověření těchto výsledků dále probíhá na větším souboru pacientů. Grantová podpora: IGA_LF_2016_001, LFUP_2016_011, Takeda Pharmaceuticals (IISR-2015-101289)

P40/2930. DA-R-EPOCH V LÉČBĚ MLADŠÍCH NEMOCNÝCH S DLBCL

Šimkovič M., Belada D., Motyčková M., Sýkorová A., Pospíšková J., Žák P. (IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové)

Úvod: Standardní léčba režimem R-CHOP mladších nemocných (<60let) s difuzním velkobuněčným B-lymfomem (DLBCL) s vyšším aaIPI (>1) je spojena s relabujícím či primárně refrakterním onemocněním až u poloviny pacientů. Výsledky studií fáze II u této podskupiny nepředléčených nemocných s DLBCL naznačují, že by režim DA-R-EPOCH mohl vést k lepším výsledkům než při použití protokolu R-CHOP. Velmi příznivé léčebné výsledky dosahuje DA-R-EPOCH také u nemocných s primárním mediastinálním velkobuněčným B-lymfomem (PMBL). Cíle projektu: Posouzení účinnosti a bezpečnosti režimu DA-R-EPOCH v 1. linii léčby mladších nemocných s DLBCL vyššího rizika (aaIPI>1) a pacientů s PMBL. Nemocní a metody:

Retrospektivní analýza byla provedena u 22 pacientů léčených na IV. interní hematologické klinice, Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové od srpna 2012 do listopadu 2015 (6 mužů [27 %], věkový medián 56 let [rozmezí 24-66]). V době zahájení léčby byli 3 nemocní (14 %) ve věku >60 let, u těchto pacientů umožňoval velmi příznivý biologický stav podání intenzivnější indukční léčby. Zastoupení jednotlivých subtypů DLBCL: PMBL 7/22 (32 %), jiný podtyp DLBCL 15/22 (68 %). Rozdělení souboru na základě imunohistochemické detekce: GC-fenotyp 11/22 (50 %), non-GC 7/22 (32 %), neurčeno 4/22 (18 %). Rozdělení do rizikových skupin podle aaIPI: skóre 1 u 4/22 (18 %; pouze PMBL), 2 u 15/22 (68 %), 3 u 3/22 (14 %). 71 % mělo pokročilé stádium onemocnění (III-IV). B příznaky byly přítomny u 6/22 (27 %), bulky choroba (>10 cm) u 10/22 (45 %), zhoršený výkonnostní stav (ECOG >1) u 6/22 (27 %), zvýšený beta-2-mikroglobulin u 6/19 (32 %) a zvýšené LDH u 22/22 (100 %). Profylaxi CNS postižení dostalo 11/22 (50 %) nemocných (i. t. profylaxe, n=7, HD-MTX, n=4). Všichni obdrželi antimikrobiální profylaxi sulfametoxazolem/trimetoprimem a valaciklovirem či ekvivalenty. Výsledky: Kompletní remise (PET-CR) byla dosažena u 18/22 (82 %), parciální remise u 2/22 (9 %), stabilní choroba u 1/22 (5 %) a progresivní choroba u 1/22 (5 %). Léčba byla předčasně ukončena u 2 pacientů pro závažnou toxicitu (1x nitrobřišní sepse, 1x perforace tenkého střeva). Celkem bylo podáno 103 léčebných cyklů, medián nejvyšší dosažené dávkové hladiny byl 2 (rozmezí 1-5). Závažné infekce či febrilní neutropenie (stupeň >2 dle CTCAE) se objevily u 5/22 (23 %) a periferní neuropatie vyžadující redukci dávky vinkristinu u 4/22 (18 %) nemocných. Data týkající se PFS a OS dosud nejsou k dispozici pro krátké sledování (medián FU 9 měsíců). K progresi/relapsu došlo u 3/22 (14 %) nemocných (1x primárně progresivní PMBL, 1x tzv. double-hit lymfom s průkazem zlomu genu MYC a BCL2, 1x progresse v oblasti CNS). Závěr: Léčba mladších nemocných s DLBCL vyššího rizika a pacientů s PMBL protokolem DA-R-EPOCH vykazuje slibnou účinnost s přijatelnou toxicitou. Hodnocení dlouhodobé léčebné odpovědi bude možné až po delším sledování souboru (nejvyšší riziko relapsu je do 2 let od skončení terapie).

P41/2921. PROFILOVÁNÍ CHEMOKINOVÝCH RECEPTORŮ U PACIENTŮ S CHRONICKOU LYMFOCYTÁRNÍ LEUKEMIÍ

Manukyan G., Papajík T., Gregorová P., Fillerová R., Urbanová R., Jarošová M., Jiskrová E., Turcsányi P., Procházka V., Kriegová E. (Department of Immunology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc; Group of Molecular and Cellular Immunology,

Institute of Molecular Biology, Yerevan - ARM; Department of Hemato-Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and Faculty Hospital, Olomouc - CZ)

Tumour cell migration share many similarities with leukocyte trafficking, which is regulated by chemokines and their receptors. A growing body of evidence indicates that chemokine receptors contribute to development and progression of numerous cancers including chronic lymphocytic leukemia (CLL). CLL is a lymphoproliferative disorder characterized by accumulation of mature B lymphocytes in the peripheral blood, bone marrow, and lymphoid tissues. We aimed to analyze expression profiles of five chemokine receptors CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR7, and CXCR7 on normal and malignant B-cells from patients with CLL with flow cytometry. CLL cells were identified as CD5+/CD19+ cells. Cytometric analysis of chemokine receptor expression determined that the majority of neoplastic B cells were positive for CXCR4, CXCR5, and CCR7 which percentage was significantly higher than on normal B cells ($P < 0.05$). In opposite, significant reduction in percentage of CXCR7 on neoplastic cells was found ($P < 0.05$). In comparison with healthy individuals, in patients with CLL a significant increase in MFI of CXCR4 ($P < 0.001$) and CCR7 ($P < 0.001$) on CLL cells was detected. Taken together, our results have shown that CLL is associated with distinct profiles of chemokine receptor expression, suggesting their important role during CLL development. Regulation of these receptors can represent an attractive molecular target for the treatment of CLL. Further investigations are needed to establish consistency of chemokines and their receptors interacting as a complex network. Grant support: MZ ČR VES16-32339A; IGA_LF_2016_001; IGA_LF_2016_011.

P42/2913. KORELACE VYBRANÝCH PROGNOSTICKÝCH ZNAKŮ A EXPRESE PD-1 NA CD4+PD-1+ A CD8+PD-1+ T-LYMFOCYTECH U CLL

Novák M., Procházka V., Papajík T. (HOK FNOL, Olomouc)

Prezentujeme analýzu korelace vybraných prognostických markerů (exprese CD38 a ZAP-70, mutační stav IGVH a přítomnost prognosticky nepříznivých cytogenetických abnormalit, delecí oblasti 17p a/nebo 11q) s expresí receptoru PD-1 (Programmed Death-1) na CD4+ a CD8+ T-lymfocytech u nemocných s CLL. Analýzou korelací získaných výpočtem Spearmanova korelačního koeficientu byly zjištěny následující skutečnosti: CD4+PD-1+ a CD38: $r_{Sp} = 0,142$ slabá (nepoužitelná)

závislost, CD8+PD-1+ a CD38: rSp = 0,092 slabá (nepoužitelná) závislost, CD4+PD-1+ a ZAP-70: rSp = 0,168 slabá (nepoužitelná) závislost, CD8+PD-1+ a ZAP-70: rSp = 0,175 slabá (nepoužitelná) závislost, CD4+PD-1+ a delece oblasti 17p a/nebo 11q: rSp = 0,116 slabá (nepoužitelná) závislost, CD8+PD-1+ a delece oblasti 17p a/nebo 11q: rSp = 0,183 slabá (nepoužitelná) závislost, CD4+PD-1+ a přítomností mutované formy genu pro těžké řetězce imunoglobulinů (IGVHMUT): rSp = 0,452 střední závislost, CD8+PD-1+ a přítomností mutované formy genu pro těžké řetězce imunoglobulinů (IGVHMUT): rSp = 0,584 střední závislost. Medián absolutního počtu PD-1+ buněk na CD4+ i CD8+ T-lymfocytech u nemocných s mutovanou formou IGVH genu (IGVHMUT) byl signifikantně vyšší, než u nemocných bez přítomnosti této mutace (IGVHUNMUT): CD4+PD-1+ IGVHMUT 0,628*109/l vers. CD4+PD-1+ IGVHUNMUT 0,345*109/l, p = 0,025 CD8+PD-1+ IGVHMUT 0,561*109/l vers. CD8+PD-1+ IGVHUNMUT 0,238*109/l, p = 0,037 Analýzou Spearmanova korelačního koeficientu byla prokázána středně silná závislost mezi expresí markeru PD-1 na subpopulacích CD4+ a CD8+ T-lymfocytů u nemocných s CLL a přítomností mutované formy genu pro těžké řetězce imunoglobulinů (IGVH). Medián absolutního počtu PD-1+ buněk na CD4+ i CD8+ T-lymfocytech u nemocných s mutovanou formou IGVH genu byl signifikantně vyšší, než u nemocných bez přítomnosti této mutace. Průkazná závislost mezi expresí markeru PD-1 na subpopulacích CD4+ a CD8+ T-lymfocytů u nemocných s CLL a expresí markerů CD38, ZAP-70 a delece oblasti 17p a/nebo 11q u nemocných s CLL nebyla nalezena. Biologický význam vyšší míry exprese PD-1 u nemocných s mutovanou formou IGVH genu, tedy u pacientů s příznivější prognózou, je nejasný a vyžaduje další výzkum. Podpořeno granty IGA-LF-2015-001, MZČR IGA NT 13576 a grantem Nadace pro transplantace kostní dřeně, Plzeň.

P43/2904. DETEKCIA MUTÁCIE MYD88 L265P U PACIENTOV S WALDENSTRÖMOVOU MAKROGLOBULINÉMIOU (WM)

Lukačková R. (Oddelenie klinickej genetiky, Medirex a.s., Bratislava – SK)

Waldenströmova makroglobulinémia (WM) je lymfoproliferatívne ochorenie zaraďujúce sa podľa klasifikácie WHO do skupiny lymfómov. Tvorí 1 až 2% zo všetkých hemoblastóz. Je charakterizované infiltráciou kostnej drene klonálnymi B-lymfocytmi a prítomnosťou monoklonálneho imunoglobulínu IgM v sére. Medzi klinické prejavy tohto ochorenia patria: chronická únava, krvácanie z dutiny ústnej a nosnej, bolesti

hlavy, kožná purpura a neuropatia. V súčasnej dobe je WM stále nevyliciteľná, s mediánom prežitia 5 rokov. Z tohto dôvodu sa liečba zameriava hlavne na potlačenie príznakov s minimálnym poškodením vnútorných orgánov. MYD L265P je nová popísaná somatická mutácia vyskytujúca sa u 95% pacientov s WM, v géne dochádza k zámene leucínu za prolín v kodóne 265 (L265P). Mutácia MYD88 L265P prostredníctvom aktivovaných signálnych dráh NF- κ B a Akt-mTOR zvyšuje proliferáciu a prežívanie patologických buniek. Stanovenie tejto mutácie predstavuje nový diagnostický marker pri WM. V menšom percente sa vyskytuje u iných lymfoproliferatívnych ochorení (napr. CLL, DLBCL). Naopak táto mutácia nie je prítomná pri mnohopočetnom myelóme, preto slúži ako vhodný diagnostický marker pri stanovovaní presnej diagnózy. Mutácia v MYD88 je marker odlišujúci WM od iných lymfoproliferatívnych ochorení. Cieľom príspevku je prezentovať zavedenú metodiku sekvenovania a MLPA analýzy, ktoré majú význam v diagnostike WM. Prítomnosť mutácie MYD88 má vplyv na klinické prejavy a prognózu WM a jej určenie napomáha pri výbere optimálnej liečebnej stratégie.

P44/2878. KOMPLEXNÍ PŘÍSTUP V DIAGNOSTICE LYMFOMŮ V PRAKTICKÝCH PŘÍKLADECH

Kalinová M., Krsková L., Mrhalová M., Mandáková P., Čandová J., Prouzová Z., Soukup J., Campř V., Kodet R. (Lymfomová skupina Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN v Motole, Praha)

Diagnostika a správná klasifikace lymfomů vyžaduje komplexní laboratorní přístup. Základem je klasické histopatologické, morfologické a cytologické vyšetření, na které navazuje imunohistochemický průkaz (IHC) exprese proteinů, vyšetření metodami fluorescenční in situ hybridizace na interfázních jádrech (I-FISH), a analýza nukleových kyselin molekulárními metodami. Je výhodné, když je možnost vyšetření tkáně pomocí průtokové cytometrie. Na příkladu několika kazuistických případů dokumentujeme účelnost komplexního laboratorního přístupu v diagnostice lymfomů. V některých případech by bez specializovaných vyšetření nebyla správná diagnostika možná, někdy mohou být naopak některé dílčí výsledky zavádějící. Proto je vhodné, aby všechny speciální laboratoře zaměřené na hematopatologickou diagnostiku byly součástí jednoho pracoviště a bylo tak možné jednotlivá vyšetření jednoduše a účelně propojit. Tímto přístupem je možné dospět k přesné diagnóze ve většině případů, a tak vyhovět nárokům kladeným na správné zařazení

lymfomů pro následnou terapii nemocných. Ilustrace na kazuistických případech jsme vybrali, aby zdůraznily nejen význam a nutnost začlenění molekulárních metod do rutinního vyšetření lymfomů, ale i z pohledu potřeby zachovat si vedle využití nových laboratorních metod také zdravý diagnostický nadhled při interpretaci komplikovaných nálezů. Bez spolupráce týmu patologů, molekulárních biologů, imunologů, hematologů by diagnostika lymfomů u části nemocných byla obtížná nebo dokonce neproveditelná. Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN MOTOL) a OPK CZ.2.16/3.1.00/24022.

P45/2877. RITUXIMAB V LIEČBE CHRONICKEJ B-LYMFOCYTOVEJ LEUKÉMIE - SKÚSENOSTI KHAT V BRATISLAVE

Hrubiško M., Štefániková Z., Masárová K., Lukáš J., Mistrík M., Roziaková L., Skraková M., Sninská Z., Sopko L., Bátorová A. (Klinika hematológie a transfúziológie LF UK, SZU a UN Bratislava, Antolská 11, 851 07, Bratislava - SK)

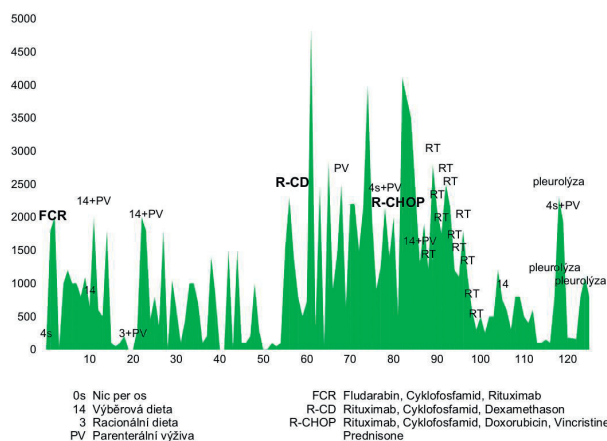
Úvod: Liečba chronickej B-lymfocytovej leukémie (CLL) sa zásadným spôsobom zmenila po pridaní monoklonálnych protilátok (MAb) do jej liečby. Zavedenie nových cytostatík (fludarabín) resp. ich kombinácií (fludarabín + cyklofosfamid - FC) výrazne zvýšilo počet pacientov s odpoveďou na liečbu, a to vrátane kompletných remisií. I keď sa pozorovalo predĺženie prežívania bez relapsu (RFS), k predĺženiu celkového prežívania (OS) nedošlo. Až pridaním monoklonálnej protilátky anti-CD20 (Rituximab - RXM) ku kombinácii FC (FCR) došlo k zmene v predĺžení OS. Výrazne stúpol počet remisií (FCR: ORR 90% oproti 44% v ramene FC) (Hallek, The Lancet 376, 2010) a podľa novších údajov, po 9,5-ročnom sledovaní, je zreteľný pozitívny vplyv aj na OS (FCR: medián prežívania nedosiahnutý vs. FC 86 mes.) (Fischer K et al. ASH 2012). Cieľ: Porovnanie efektivity režimu FCR so skupinou chorých liečených v minulosti bez použitia RXM. Materiál a metódy: Súbor tvorí 73 pacientov z rokov 2001 - 2015 liečených chemoterapiou na báze fludarabínu, či už sólo, v kombinácii s cyklofosfamidom resp. FC + RXM. Kombinácia FCR sa začala rutinne používať na KHaT od roku 2008. 10 pacientov, ktorí zrelabovali po režime F(C), dostalo ako ďalšiu liečbu kombináciu FCR. Títo chorí sú zahrnutí v oboch skupinách, preto je súčet chorých 83 (60 v skupine FCR a 23 v skupine F(C)). Priemerný vek pri diagnóze v celom súbore bol 57 rokov (medián 56 r., rozsah 28-79 rokov). V skupine FCR resp. F(C) boli tieto hodnoty (priemer - medián - rozsah) 57,2/52,3 - 56,5/50

- 28-79/28-76 mesiacov. Medián dĺžky sledovania od ukončenia liečby bol 46,5 mes. (rozsah 3-103 mes.). Režim FCR dostalo 45 pacientov v 1. línii, 12 chorých v 2. línii, 2 pacienti v 3. línii a jeden až v 5. línii liečby. Režim F(C) bol ako prvolíniový podaný 19 pacientom, traja ho dostali v druhej línii liečby a jeden až v 5. línii. Výsledky: Len u štyroch pacientov sme v skupine FCR nezaznamenali odpoveď na liečbu, 56 (93%) dosiahlo odpoveď, väčšinou kompletnú remisiu. V kontrolnej skupine F(C) malo rezistentnú chorobu 5 z 23 pacientov, počet odpovedí bol 18/23, čiže 78%. Medián prežívania bez choroby v skupine FCR bol 44 mesiacov, kým v skupine bez RXM len 23 mes. Rozdiel sice nie je štatisticky signifikantný, ale pozorujeme výrazný trend v prospech skupiny FCR. OS v skupine FCR nebol ešte dosiahnutý, v skupine F(C) je medián prežívania 83 mesiacov. Ani tu nie je rozdiel štatisticky významný, je však potrebné uviesť, že 11 chorých v skupine bez RXM bolo liečených v ďalšej línii režimom FCR príp. inými spôsobmi. Dvaja pacienti v skupine FCR žijú po alogénnej nepríbuzenskej transplantácii krvotvorných buniek. Vzhľadom na malé počty pacientov v jednotlivých podskupinách podľa cytogenického rizika sme vyhodnotenie podľa genetických markerov nerobili. Záver: Obdobie prežívania bez choroby (PFS) sa pridaním Rituximabu do liečby CLL výrazne predĺžilo, medián PFS je oproti historickej skupine temer dvojnásobný. Zaznamenali sme aj zlepšenie celkového prežívania, ktorého medián nebol ešte v skupine FCR dosiahnutý. Významne sa zlepšila kvalita života vzhľadom k tomu, že pacienti dlhé obdobie - rádovo roky - nie sú odkázaní na cytostatickú liečbu. V budúcnosti je možné predpokladať ďalšie zlepšenie výsledkov, nielen preto, že kombinácie na báze Rituximabu sa stali štandardnou súčasťou liečby CLL už v 1. línii, ale aj vzhľadom na dostupnosť ďalších nových monoklonálnych protilátok.

P46/2872. ZKUŠENOSTI S LÉČBOU PERZISTUJÍCÍHO CHYLOTHORAXU ASOCIOVANÉHO S LYMFOPROLIFERATIVNÍMI ONEMOCNĚNÍMI

Pospíšková J., Belada D., Žák P., Smolej L., Šimkovič M., Motyčková M., Štěpánková P., Sýkorová A. (IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice, Hradec Králové)

Chylothorax u maligních lymfoproliferativních onemocnění se vyskytuje vzácně, nejčastěji u ne Hodgkinových lymfomů, klinicky ale představuje často závažný problém. Cílem práce je prezentovat výsledky konzervativní léčby 10 pacientů s perzistujícím netraumatickým maligním chylothoraxem. Jednalo se o 5 nemocných



s folikulárním lymfomem, 4 s chronickou lymfocytární leukémií a 1 s T-periferním ne Hodgkinským lymfomem blíže neurčeným. V našem souboru byly 3 ženy, medián věku nemocných v době diagnózy byl 66 let (95 % IS 57.5 až 69.7 let). Konzervativní terapie vedoucí k zastavení tvorby chylothoraxu trvala v průměru 66 dnů (SD 32.6), zahrnovala léčbu základního onemocnění a současně dlouhodobou podpurnou péči (drenáž hrudní dutiny, dietní opatření a nutriční podporu). K vymizení chylothoraxu došlo ve většině případů (80 %) až při dosažení léčebné odpovědi u hematoonkologického onemocnění, které způsobovalo poškození hrudního mízovodu. Ve dvou případech byla s velmi dobrým efektem aplikována nízkodávková radioterapie. Ozáření byl buď přímo ductus thoracicus nebo paraaortální a mediastinální lymfatické uzliny. Konzervativní léčbu maligního chylothoraxu lze považovat za vhodnou metodu léčby, potlačení aktivity lymfoproliferativního onemocnění se z našich výsledků zdá být zásadní. Nicméně studie s větším počtem pacientů by byla potřeba ke stanovení spolehlivějších závěrů. Jednou z příčin narušení funkce hrudního mízovodu (ductus thoracicus) je infiltrace

nebo útlak nádorem. To vede k úniku a hromadění chylu v pohrudniční dutině. Jde o méně častou, ale závažnou komplikaci. Objemný výpotek může vést k respiračním obtížím, závislým na množství a rychlosti doplňované tekutiny. Chylus obsahuje velké množství tuku a v tucích rozpustných vitamínů, proteinů, elektrolytů a T lymfocytů. Porucha resorpce nebo ztráty chylu při evakuaci vedou často k závažné malnutrici, dysfunkci imunitního systému, dehydrataci a hypovitaminóze. U všech námi popisovaných pacientů se podařilo potlačit tvorbu chylothoraxu, a to s mediánem doby k jeho vymizení 73 dní (95 % IS 42.5-89.1 dní). Vznik chylothoraxu byl v 90 % spojen s aktivitou maligní lymfoproliferace s přítomností mediastinální lymfadenopatie a/nebo přítomností nádorových buněk v chylózních výpocích. Efektivní potlačení maligního onemocnění obvykle vedlo i k vymizení chylózní sekrece. Pouze u jednoho nemocného (10 %) byla druhá progresse chylothoraxu nejasná a dávána do souvislosti s proběhlou radioterapií paraaortálních a mediastinálních lymfatických uzlin. Terapie zahrnovala jak léčbu základního onemocnění příslušnými chemoterapeutickými režimy (FCR, R-dex, RCD, R-CHOP, GDP, R-GDP, obinutuzumab + bendamustin, R-ESHAP, R-mega-CHOP), tak léčbu chylothoraxu. U všech nemocných byla v úvodu nutná pleurální punkce/drenáž pro respirační obtíže. K ovlivnění chylózní sekrece byla aplikována dieta s omezením tuků v 70 % a parenterální výživa v 80 %. Pouze u dvou pacientů (20 %) byla použita radioterapie. V jednom případě byl ozářen přímo hrudní mízovod s velmi dobrým efektem a to v dávce 9 Gy v 5 frakcích. U druhého pacienta byly ozářeny paraaortální a mediastinální lymfatické uzliny v dávce 4 Gy ve 2 frakcích. Po déletrvající nízkotučné dietě došlo u 4/7 pacientů (57 %) k jejímu porušování nebo nedodržování, ve třech případech pacienti již na začátku léčby dietu odmítli.

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

P47/2925. LABORATOŘ TESTŮ SLUČITELNOSTI JAKO SOUČÁST REGIONÁLNÍ REFERENČNÍ LABORATOŘE

Bořutová N., Přidalová J., Holusková I., Galuszková D. (Transfuzní oddělení FN, Olomouc)

Úvod: Příprava transfuze pro pacienty podléhá řadě nařízení. K přípravě transfuze je zapotřebí krevní vzorek pacienta a žádanka o transfuzní přípravky, které přijímáme na pracovišti Centrálního příjmu vzorků. Vzorky jsou následně zpracovávány v Laboratoři testů slučitelnosti. Metodika: Předtransfuzní vyšetření se skládá z vyšetření krevní skupiny pacienta, screeningu antierytrocytárních protilátek a vlastního testu slučitelnosti, který slouží k posouzení kompatibility erytrocytů dárce a plasmy příjemce. Jsou-li během předtransfuzního vyšetření zjištěny nějaké komplikace (např. pozitivní protilátkový nálezn, nejednoznačné určení krevní skupiny, pozitivní test slučitelnosti) musí být dále vzorek došetřen v Laboratoři speciální imunohematologie, kde po vyšetření zdravotní laborantka se specializací spolu s lékařem uzavře výsledek a doporučí další postup k výběru vhodného transfuzního přípravku pro pacienta. Do laboratoře Transfuzního oddělení Fakultní nemocnice Olomouc (TO FNOL) je denně přijímáno v průměru kolem 45 požadavků na předtransfuzní vyšetření nejen z různých oddělení FNOL, ale i ze širokého okolí a počet nakřížených transfuzních přípravků se pohybuje mezi 80 – 120 denně. Výsledky: Každý měsíc je přijímáno do Laboratoře testů slučitelnosti TO FNOL cca 1100 – 1300 požadavků o předtransfuzní vyšetření. V roce 2015 bylo přijato 13060 vzorků na předtransfuzní vyšetření. Z toho bylo 4550 požadováno v režimu statim a 8510 v režimu plán. V 780 případech bylo nutné přešetření v Laboratoři speciální imunohematologie. Závěr: Výsledkem naší práce je cílená a především účelná hemoterapie upravená podle potřeb pacienta.

P48/2964. MONITOROVÁNÍ HLADINY BCR/ABL1 TRANSKRIPTŮ U PACIENTŮ S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ

Koláčková M., Křupková L., Divoká M., Slavík L., Papajík T. (Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP, Olomouc)

Chronická myeloidní leukémie (CML) je nádorové myeloproliferativní onemocnění hematopoetické kmenové buňky s incidencí 1,0 až 1,5 nových případů na 100 000 obyvatel / rok. Kauzální příčinou vzniku

CML je přítomnost fúzního genu BCR-ABL1, který je výsledkem reciproké translokace t(9;22)(q34;q11). Fúzní gen BCR-ABL1 slouží jednak jako marker pro potvrzení klinické diagnózy CML a jednak jako marker pro sledování úspěšnosti léčby a monitorování minimální reziduální nemoci. Zavedení imatinib mesylátu a inhibitorů tyrozinových kináz druhé generace do klinické praxe výrazně ovlivnilo úspěšnost léčby CML pacientů. Nedílnou součástí terapie CML se stalo monitorování hladiny BCR-ABL1 transkriptů v periferní krvi. K tomu slouží standardizovaná metoda kvantitativní reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce (Q-RT-PCR) s použitím fluorescenčně značených sond. Jedná se o rychlou PCR v reálném čase, kdy výsledná hladina BCR-ABL1 transkriptů je vztažena k expresi kontrolního genu ABL1. V našem sdělení se zaměříme na význam monitorování hladiny BCR-ABL1 transkriptů u CML pacientů léčených inhibitory tyrozinových kináz. Pro názornost uvádíme 3 modelové situace léčebných od-povědí, které mohou nastat.

P49/2977. LZE VĚŘIT VÝSLEDKŮM „ANALÝZY ŽIVÉ KAPKY KRVE“?

Křupka M. (Ústav imunologie LF a FN, Olomouc)

Darkfield Live Blood Analysis neboli analýza živé kapky krve v temném poli je komerčně nabízená metoda, která v posledních letech dosáhla v České republice značného rozšíření. Podle propagátorů této metody je možné její pomocí získat z jediné kapky krve komplexní obraz o zdravotním stavu pacienta. Podle webových stránek nabízejících tuto metodu „alternativní medicíny“ ji lze použít ke zjištění širokého spektra parametrů, jako je stav imunitního systému (alergie, autoimunita), potíže s krevním cukrem, viskozita krve, riziko infarktu či mrtvice, hladiny železa, kyseliny listové či vitamínu B12, ale i poněkud nejasné stavy jako je „stav detoxikace či překyselení organismu“ či „mykoza krve“. Objevují se i informace o možnosti využití k diagnostice nádorových chorob. Analýza živé kapky je nabízena většinou osobami bez oficiálního zdravotnického či biologického vzdělání za přímou úhradu a je založena na pozorování nefixovaného vzorku kapilární krve za využití mikroskopie v temném poli a digitální záznamové techniky. Cílem práce bylo pomocí jednoduchého experimentu přispět k objektivnímu popisu metody „analýzy živé kapky krve“ a reálnosti tvrzení o její využitelnosti v monitorování zdravotního stavu. Byla použita čerstvá kapilární krev dobrovolníka netr-

píciho výraznějšími zdravotními komplikacemi, která byla zpracována podle dostupných informací o používané metodice analýzy. Kromě toho byly vzorky také vystaveny různým vnějším vlivům, jako je naředění hyperosmotickým pufrům či hodinové stání při pokojové teplotě. Vzorky byly následně pozorovány pomocí mikroskopie ve fázovém kontrastu, která poskytuje podobné výsledky jako mikroskopie v temném poli. Získané snímky byly srovnány s fotografiemi, které jsou na webových stránkách provozovatelů „analýzy živé kapky krve“ uváděny jako vzor změn způsobených údajnou nerovnováhou organismu (často popisovanou jako tzv. překyselení) nebo reálnými patologickými stavy. Na základě získaných snímků a jejich srovnání se snímky provozovatelů popsané metody lze konstatovat, že většina jevů uváděných v pozorované krvi jako známka zdravotních problémů mohou být s vysokou pravděpodobností artefakty vznikající při zpracování vzorku (vzduchové bublinky, nečistoty) nebo přirozeně probíhající procesy (krevní srážlivost, vysychání preparátu s následným zakoncentrováním složek krevní plazmy a vznikem hypertonického prostředí s následnou tvorbou echinocytů či rouleaux forem). Vyhodnocení nepodléhá žádné standardizaci a je tak pravděpodobně výrazně zatíženo dojmy a individuálními názory jednotlivých pracovníků, což se také ukázalo v několika málo dostupných publikacích věnujících se tomuto tématu (1-3). Na základě těchto dat tak nelze předpokládat reálný praktický přínos komerčně nabízené metody „analýzy živé kapky krve“ pro sledování zdravotního stavu a je na místě varovat před vyvozováním jakýchkoliv závěrů z jejích výsledků. Podpořeno grantem IGA_LF_2016_011. Literatura: 1. Teut M., Lüdtke R., Warning A. (2006) Reliability of Enderlein's darkfield analysis of live blood. *Altern Ther Health Med.* 12(4): 36-41. 2. El-Safadi S. Tinneberg H-R., Brück F., von Georgi R., Münstedt K. (2005) Erlaubt die Dunkelfeldmikroskopie nach Enderlein die Diagnose von Krebs? Eine prospektive Studie. *Forsch Komplementärmed Klass Naturheilkd* 2005;12:148-151. 3. Ernst E. (2005-07-12). Intrigued by the spectacular claims made for Live Blood Analysis? Don't be. It doesn't work. *The Guardian*.

P50/2926. OPTICKÁ AGREGOMETRIE - POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ VYŠETŘENÍ V PLAZMĚ NEUPRAVOVANÉ A UPRAVENÉ NA STANDARDIZOVANÝ POČET TROMBOCYTŮ

Bultasová L., Korelusová I., Šlechtová J., Duspivová I. (FN Plzeň, ÚKBH, Plzeň)

Naše hematologická laboratoř používá dlouhodobě pro vyšetření agregace trombocytů optickou metodou

na přístrojích řady AFACT plazmu s upraveným počtem trombocytů na 250.10E9/l. Připravuje se smísením plazmy bohaté na destičky s plazmou chudou na destičky v poměru závislém na počtu trombocytů v každé z nich. Na základě doporučení výrobce pro analyzátor AFACT 4004 a Doporučení pro standardizaci optické agregometrie SSC/ISTH z 12/2012 jsme porovnávali výsledky vyšetření agregace trombocytů v plazmě upravené na standardizovaný počet trombocytů (250.10E9/l) a plazmy s neupraveným počtem trombocytů. Počet trombocytů v neupravené plazmě se pohyboval v rozmezí 317-600.10E9/l. Pro vyšetření byly použity induktory v uvedených koncentracích: ADP (10 uM/l), kolagen (100 ug/ml), kys. arachidonová (5 mg/ml), ristocetin (1,5 mg/l a 0,7 mg /l). Celkem bylo vyšetřeno 29 pacientů. Závěr: Při použití induktorů ADP, kolagenu, kyseliny arachidonové a ristocetinu o koncentraci 1,5 mg/l nebyly zjištěny rozdíly ve výsledcích maximální amplitudy agregace trombocytů v upravené a neupravené plazmě (rozdíl výsledků se pohyboval v rozmezí 0,5-6,0 %). Byl zjištěn rozdíl mezi výsledky vyšetření strmosti agregace křivky (11-18 %) - výsledky vyšetření neupravené plazmy jsou povševně vyšší než z plazmy upravené, což lze vysvětlit vyšším počtem reagujících trombocytů. Významnější rozdíl mezi výsledky vyšetření z upravené a neupravené plazmy byl zjištěn ve výsledcích maximální amplitudy agregace trombocytů po ristocetinu o koncentraci 0,7 mg/l a sice 26,4 %, kdy po standardizaci počtu trombocytů na nižší počet je agregabilita trombocytů naopak vyšší než v plazmě neupravené. Také ve výsledcích strmosti křivky agregace trombocytů v uvedené koncentraci ristocetinu bylo dosaženo v upravené plazmě o 17 % vyšších hodnot. Toto zjištění bude ověřováno proměřením dalších vzorků a zvětšením hodnoceného souboru.

P51/2929. CHARAKTERIZÁCIA VRODENÝCH ERYTROCYTÓZ

Králová B., Fialová Kučerová J., Kapraľová K., Pospíšilová D., Horváthová M., Divoký V. (Ústav Biologie LF UP, Olomouc; Dětská klinika FNOL, Olomouc)

True polycythemia (or erythrocytosis) is characterized by increased red cell mass, which can be accompanied by elevated hemoglobin and hematocrit. Primary polycythemias result from either inherited germline mutations in erythropoietin receptor (EPOR) or acquired somatic mutations in Janus kinase 2 (JAK2). They are characterized by augmented sensitivity of erythroid progenitors to erythropoietin (EPO) and reduced/low-normal EPO levels. Recently, mutations in a negative regulator of EPOR/JAK2 signaling, LNK, were reported

in erythrocytoses with low EPO levels. Mutations in molecules involved in hypoxia signaling, which regulates the production of red blood cells, are associated with secondary polycythemia characterized by elevated/high-normal EPO levels and EPO hypersensitivity of erythroid progenitors in most of the cases. These include mutations in von Hippel Lindau (VHL, recessive inheritance), alpha subunit of hypoxia inducible factor 2 alpha (HIF2-alpha) and prolyl hydroxylase domain protein 2 (PHD2) (both dominant inheritance). During the last ten years we have collected a cohort of twenty-six patients with congenital polycythemia. The in vitro hematopoietic colony assay revealed EPO hypersensitivity of erythroid progenitors in sixteen of them. Subsequently, these patients were subjected to mutational screening of known polycythemia-related genes. A previously published EPOR mutation (S967insT), leading to a loss of the negative regulatory domain of EPOR, was detected in two unrelated pediatric patients. A known mutation in HIF2-alpha (p.G537R), which is responsible for increased HIF signaling, was found in two unrelated children. In one pediatric patient with signs of a myeloproliferative disease in the bone marrow, two heterozygous mutations in JAK2 (p.E846D and p.R1063H) were detected. These two JAK2 substitutions (inherited from healthy parents) cooperate to augment JAK2 signaling and cause the disease. A single nucleotide polymorphism (SNP) in a gene coding for LNK (rs3184504, p.R262W), was revealed in five cases. This polymorphism is associated with increased production of multiple inflammatory and immunomodulatory cytokines. One of these patients also inherited a previously described p.P488S mutation in EPOR. However, although reported in a polycythemia patient, the direct causality of this EPOR mutation with the development of erythrocytosis was not confirmed. Nevertheless, it is possible that in our patient the EPOR P488S and LNK R262W may cooperate in generating the disease phenotype. In addition, this patient was shown to be a homozygote for SNP rs2230724 in JAK2, known to be associated with increased risk of acute leukemia and gastric cancer development. This JAK2 rs2230724 SNP was detected also in five additional patients with otherwise negative mutational screening; in two of them together with SNP rs3184504 in LNK. We conclude that in the majority of congenital polycythemia cases the causative defect remains to be elucidated. We propose that in addition to possible new targets in EPOR/JAK2 or HIF signaling pathway, some of the patients may harbor a predisposing mutation/polymorphism and the full disease phenotype develops as a result of interaction with some other congenital or acquired lesion.

P52/2987. ZÁVISLOST ÚČINNOSTI NÍZKOMOLEKULÁRNÍHO HEPARINU (STANOVENÉ TESTEM ANTI XA) NA HLADINĚ ANTITROMBINU – KAZUISTIKA GRAVIDNÍ PACIENTKY S DEFICITEM ANTITROMBINU

Procházková J., Slavík L., Úlehlová J., Palová M., Hluší A. (HOK LF a FN, Olomouc)

24-letá pacientka se poprvé dostavila na naše pracoviště v 8. týdnu 3. gravidity (předchozí 2 těhotenství skončila spontánním abortem). V anamnéze dále léčená hypertenze a ischemická cévní mozková příhoda před 2 lety, tehdy v rámci celkového vyšetření zjištěn deficit antitrombinu s kauzální mutací c.2759c-t v homozygotním stavu. Hladina antitrombinu se pohybovala mezi 20-30%. Pacientka byla léčená LMWH v profylaktické dávce (vyšší nebyla možná z důvodu gynekologického krvácení) v kombinaci s ASA. Na začátku II. trimestru došlo k recidivě CMP – s expresivní afázií a pravostrannou hemiparézou s nálezem ischemie v povodí ACM vlevo (dle MRI). Trombolytická terapie nebyla indikována pro nesouhlas pacientky. Při terapii léčebnou dávkou LMWH a substitucí antitrombinu došlo k rychlé úpravě hybnosti, přetrvávala mírná expresivní afázie. Pacientka převedena na warfarin, na kterém stabilizována až do 29. týdne gravidity, kdy došlo k rozvoji preeklampsie. Pro nutnost předčasněho ukončení gravidity převedena na léčebnou dávku LMWH se substitucí antitrombinu. Při antihypertenzivní a symptomatické terapii došlo ke stabilizaci stavu, gynekology rozhodnuto o odložení porodu pro nezralost plodu. Ve 30. týdnu došlo k intrauterinnímu úmrtí plodu. Po porodu byla opět zavedena antikoagulační terapie warfarinem, která pokračuje dosud. Pacientka je bez neurologického deficitu. Graf znázorňuje závislost hladiny anti Xa na hladině antitrombinu (měření byla prováděna před a po substituci antitrombinu ve stejném časovém odstupu od podání LMWH). Naše pozorování potvrzuje význam antitrombinu jako kofaktoru nízkomolekulárních heparinů a podporuje nutnost substituce antitrombinu v terapii trombotických komplikací při jeho nedostatku.

P53/2928. DIAGNOSTIKA VON WILLEBRANDOVY CHOROBY NA ÚKBH FN PLZEŇ

Korelusová I., Hajšmanová Z., Šlechtová J., Švajcrová J., Petrmichlová D. (FN Plzeň, ÚKBH, Plzeň)

Von Willebrandova choroba (vWch) je nejčastější vrozené krvácivé onemocnění. Příčinou je nedostatek nebo funkční defekt von Willebrandova faktoru (vWF).

Důsledkem je snížená koagulační aktivita FVIII a porušená adhezivní funkce destiček. Klinické projevy závisí na tíži strukturálního nebo kvantitativního defektu vWF. Typické je krvácení ze sliznic, zejména z nosu a dásní, kožní krvácení či protražované krvácení po poranění. vWch se dle klasifikace z roku 2006 dělí na 3 typy. Typ 1 a 3 je kvantitativní deficit vWF, u typu 1 se jedná o parciální, u typu 3 o úplný nedostatek vWF, přičemž struktura a funkce vWF jsou u typu 1 normální. Typ 2 je definován jako kvalitativní čili strukturální defekt vWF provázený poruchou funkce zejména vysokomolekulárních multimerů. U typu 2 rozlišujeme na základě analýzy struktury multimerů ještě několik subtypů. Zcela jednoznačnou diagnostiku vWch umožňuje molekulárně genetické vyšetření. Panel diagnostických testů vWch na našem pracovišti zahrnuje testy screeningové (krevní obraz, krvácivost metodou Simplate, aPTT), základní (FVIII:C, vWF:Ag, funkční testy vWF:RCo, vWF:CB) a specifické (provádíme RIPA - ristocetinem indukovaná agregace destiček). Na základě výpočtu diskriminačního poměru, který hodnotí funkci vůči hladině vWF, jsme schopni rozlišit kvantitativní a kvalitativní poruchu vWF (typ 1 a 3 od typu 2). Vysoce specifické diagnostické testy neprovádíme rutinně, vzorky zasíláme na specializovaná pracoviště. V lednu 2015 jsme do vyšetřovacího panelu přidali další funkční test - test vazebné kapacity kolagenu (vWF:CB, výrobce Corgenix). vWF:CB se provádí ELISA kitem REAADS Collagen Binding Assay Test Kit (96 well kit), kdy kolagen pokrývá povrch jamky mikrotitrační destičky. Referenční plazma a kontrolní plazmy jsou součástí kitu. Výsledné hodnoty vWF:CB v % se odečítají z nastavené kalibrační

křivky při vlnové délce 450 nm proti referenčnímu filtru 650 nm na fotometru Reader 530 (Athos Labtec Instrument GmbH Rakousko). Výrobce kitu doporučuje zároveň i stanovení antigenu vWF (vWF:Ag), které jsme respektovali. Stanovení bylo prováděno ELISA kitem - REAADS VON WILLEBRAND FACTOR ANTIGEN KIT ELISA (96 wells) - v jamkách mikrotitrační destičky je navázána specifická protilátka anti-human vWF. Referenční plazma ke kalibraci je součástí kitu. Výsledné hodnoty vWF:Ag v % byly odečteny z nastavené kalibrační křivky při vlnové délce 450 nm proti referenčnímu filtru 650 nm rovněž na fotometru Reader 530. Správná kalibrace vWF:CB, vWF:Ag byla ověřena kontrolním materiálem Control N a Control P (firma Siemens), naměřené hodnoty vWF:Ag a vWF:CB byly v povolených referenčních mezích. Od ledna 2015 do března 2016 jsme vyšetřili vzorky plazmy kontrolní skupiny (20 zdravých dobrovolníků - muži, ženy) a 112 pacientů s již známou diagnózou vWch, s poruchami koagulace a krvácivými stavy. K vyhodnocení jsme použili výpočet diskriminačního poměru R (tj. poměr vWF:CB/vWF:Ag). U zdravých lidí je $R=1$, u pacientů s vWch typu 1 je R v rozmezí 0,5-1,0, u pacientů s typem 2 vWch je $R < 0,5$. V případě výsledků kontrolní skupiny se R pohybovalo v rozmezí 1,0-1,3. U pacientů s diagnostikovanou vWch byl poměr R od 0,1-1,3; u pacientů s krvácivými stavy, resp. poruchou koagulace od 0,4-1,6. U pacientů s $R < 0,5$ byla provedena další vyšetření na specializovaném pracovišti k upřesnění diagnózy, např. přímé vyšetření struktury velkých multimerů. Metodika výše uvedených ELISA testů byla zvládnuta, od ledna 2016 jsou standardní součástí vyšetřovacího panelu vWch.

PODPŮRNÁ PÉČE

P54/2937. PRIMÁRNÍ ANTIMYKOTICKÁ PROFYLAXE MICA FUNGINEM, V DÁVCE 50 MG NA DEN, U DOSPĚLÝCH PACIENTŮ BĚHEM INDUKČNÍ CHEMOTERAPIE AKUTNÍ LYMFOBLASTICKÉ LEUKÉMIE (ALL): HODNOCENÍ Z POHLEDU BĚŽNÉ KLINICKÉ PRAXE

Kabut T., Folber F., Šálek C., Procházková J., Rolencová M., Kocmanová I., Kouba M., Weinbergerová B., Cetkovský P., Mayer J., Ráčil Z. (Interní hematologická a onkologická klinika Fakultní nemocnice, Brno; Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha; Oddělení klinické mikrobiologie FN, Brno)

Úvod: Invazivní mykotické infekce (IFI) během léčby akutních leukémií bývají spojeny s vysokou morbiditou a mortalitou. Zatímco u pacientů intenzivně léčených s akutní myeloidní leukémií je primární antimykotická profylaxe (PAP), především posakonazolem, zavedenou praxí, standardizované postupy PAP u pacientů s ALL chybí. Hlavní problém představuje zejména riziko interakcí azolových antimykotik, účinných proti vláknitým houbám, s cytostatiky používanými v rámci intenzivní léčby ALL. Volba vhodné PAP u pacientů s ALL je proto složitá, přičemž v mnoha případech pacienti pak zůstávají bez dostatečné ochrany proti vláknitým houbám. Cíl: Hodnocení efektivity a bezpečnosti PAP micafunginem (50 mg/den) během indukční léčby do-

spělých pacientů s ALL. Metodika: Retrospektivní analýza pacientů z 2 hematologických center v rámci České republiky, léčených s ALL (ev. s T- lymfoblastickým lymfomem nebo Burkittovým lymfomem/leukémií) dle intenzivních ALL (nebo ALL podobných) protokolů s PAP micafunginem. Micafungin v dávce 50 mg/den byl pacientům podáván od počátku indukční chemoterapie do restituce v absolutním počtu neutrofilů. K hodnocení IFI byla použita kritéria EORTC/MSG 2008, pro bezpečnost PAP kritéria CCTCAE v. 4. Výsledky: Mezi roky 2012 až 2015 celkem 49 pacientů dostávalo během indukční chemoterapie ALL PAP micafunginem v dávce 50 mg na den. Trvání této profylaxe bylo v průměru 22 dní (2-80 dní). U 39 pacientů byl v léčbě použit protokol ALL-CELL 2012 Junior, u zbylých 3 a 7 pacientů pak protokoly GMALL B-ALL/NHL 2002 a ALL-CELL 2012 Elderly nebo EWALL Elderly. Selhání antimykotické profylaxe bylo zaznamenáno u 2 ze 49 pacientů (4,1%), kteří během léčby rozvinuli IFI. U obou se jednalo o „prokázanou“ IFI, zatímco „pravděpodobná“ IFI se v sledovaném souboru nevyskytla. Oba pacienti s prokázanou IFI byli následně úspěšně léčeni kombinacemi antimykotik. V prvním případě se jednalo o invazivní plicní aspergilózu, která byla histologicky prokázána a potvrzena PCR identifikací (kultivace negativní). Tato infekce se ovšem vyskytla již velice časně po zahájení PAP (4. den). U druhého pacienta se IFI manifestovala jako diseminovaná infekce s postižením jater a sleziny plísní *Geotrichum capitatum*. Citlivost k echinocandinům zde byla stanovena jako MIC 32 µg/ml. Dalších 10 pacientů ze 49 (20,4%) rozvinulo plicní infiltráty na HRCT, z čehož 3 ze 49 (6,1%) infiltráty pro IFI specifické, dle kritérií EORTC/MSG 2008 (bez mikrobiologického záchytu, naplňující tak kritéria pro „možnou“ IFI), a 7 ze 49 (14,3%) infiltráty nespecifické. Empirická antimykotická terapie byla zahájena u 10 pacientů ze 49 (20,4%), přičemž u 8 případů z 10 byl zvolen micafungin 100 mg/den, u zbylých dvou pak vorikonazol nebo amfotericin B lipidový komplex. V celém souboru došlo během indukční chemoterapie k elevaci jaterních testů (JT) minimálně na grade 1-2. Nicméně 63% z těchto pacientů mělo již vstupně zhoršené jaterní parametry. Žádné z těchto zhoršení JT však nebylo uzavřeno jako postižení související s podáváním micafunginu a nevyžadovalo tak přerušení PAP. Závěr: Zhodnocení nasbíraných dat prokázalo efektivitu micafunginu v dávce 50mg/den jako PAP u této velmi rizikové populace pacientů stran invazivních mykotických infekcí, ale rovněž i možných lékových interakcí. Pouze u dvou pacientů (4,1%) byla zaznamenána průlomová IFI, navíc v jednom případě ve velmi časně po zahájení PAP. Zvýšení jaterních testů představovalo hlavní limitaci této profylaxe, ale souviselo pravděpodobněji

se samotnou terapií ALL a nevyžadovalo tak přerušení profylaxe micafunginem.

P55/2903. INFEKČNÍ KOMPLIKACE PŘI LÉČBĚ RITUXIMABEM A JEJICH PREVENCE

Polák P., Penka M., Smejkal P., Chlupová G., Kamelander J. (Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice, Brno)

Autoři se věnují rizikům infekčních komplikací při léčbě monoklonální protilátkou proti povrchovému znaku CD20 lymfocytů. Ve vztahu k infekcím jsou diskutovány zásadní patofyziologické mechanismy jako je měsíce až roky trvající deplece B-lymfocytů, riziko deficitu protilátek různých tříd a pozdní neutropenie po aplikaci rituximabu. Souhrnně jsou prezentovány dosud popsané infekční komplikace u pacientů léčených rituximabem. Výstupem je shrnutí nejpodstatnějších kroků prevence infekčních komplikací komunitních i spojených s nemocniční péčí se zvláštním důrazem na vakcinaci proti chřipce a pneumokokům a tetanu. Pokud je to možné, pak je nezbytné vakcinaci dokončit alespoň 2 týdny před aplikací rituximabu. V případě závažných infekčních komplikací je indikována aplikace nitrožilních imunoglobulinů (IVIG).

P56/2873. USEFULNESS OF SERUM 1,3-B-D-GLUCAN FOR DIAGNOSIS OF INVASIVE FUNGAL DISEASE IN PATIENTS WITH HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES: A RETROSPECTIVE ANALYSIS

Weinbergerová B., Kocmanová I., Rolencová M., Mayer J., Ráčil Z. (Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN, Brno; Oddělení klinické mikrobiologie, FN, Brno)

Background: Serologic detection of circulating 1,3-b-D-glucan (BG) fungal biomarker shows promise for improving the diagnosis of invasive fungal diseases (IFDs). Numerous studies have evaluated the diagnostic performance of BG and proved its suboptimal sensitivity when used alone for early diagnosis of IFDs. Moreover, the major limitation of this test mainly in hematological patients (pts.) is the high frequency of false positive results. Aims: We have evaluated the usefulness of the serum BG assay in real practice for the diagnosis of IFDs in pts. with hematological malignancies. Methods: We retrospectively analyzed serum BG samples collected from patients with hematological malignancies in high risk of IFDs treated at our department between 2010 and 2014. The Fungitell assay was used for detection of BG. We performed retrospectively

ve cross check of probable and proven IFDs recorded in the Fungal INfection Database - FIND. BC results were not used for the diagnosis of IFDs. Results: Fungitell assay was performed on 1912 serum samples from 630 patients with hematological malignancy (3.0 samples/pt.). Depending on the cut-off used (≥ 60 ; ≥ 80 ; ≥ 100 ; ≥ 150 pg/ml) there were 231 positive BC samples in 78 pts.; 185 samples in 64 pts.; 155 samples in 52 pts. and 108 samples in 33 pts, respectively. Proven and probable cases of IFD occurred only in 49 (21.2%) out of 231 positive samples (in 19 out of 78 patients) with BC ≥ 60 pg/ml - 11 probable invasive aspergillosis (IA), 4 proven IA, 3 invasive candidiasis and 1 invasive fusariosis. Eight pts. (1.5%) from the group with negative BC samples (< 60 pg/ml) developed any IFD (6 probable IA, 1 proven IA and 1 invasive trichosporonosis). Depending on the

criterion of positivity of BC used (≥ 60 / ≥ 80 / ≥ 100 / ≥ 150 pg/ml) sensitivity was 67.1/63.6/63.1/53.9%, specificity was 90.1/92.9/93.6/95.4%, negative predictive value (NPV) was 98.6/98.6/98.6/98.6% and positive predictive value (PPV) was 21.2/21.3/26.5/25.9%, respectively. Conclusion/summary: Our study proved high specificity and NPV of serum BC allowing to exclude patients with IFD. On the other hand we confirmed limited sensitivity and mainly very low PPV of the test as its major limitations. We didn't observe any significant differences in sensitivity and PPV between groups with different cut-offs. Thus positive BC assay results in high risk hematological pts. should be carefully evaluated together with other clinical and microbiological findings. This work was supported by grant MUNI/A/1028/2015.

TRANSFUZNÍ PROBLEMATIKA

P57/3009. JE ÚROVEŇ BEZPEČNOSTI HEMOTERAPIE V ČR DOSTATEČNÁ?

Bohoněk M., Tesařová E. (Oddělení hematologie a krevní transfuze, Ústřední vojenská nemocnice - Vojenská fakultní nemocnice, Praha; Transfuzní a tkáňové oddělení Fakultní nemocnice, Brno)

Úvod: Podání krevní transfuze je z mnoha příčin nutně stále považovat za rizikový výkon. Velikost rizika lze minimalizovat, ale nelze jej nikdy zcela vyloučit. Z forenzního hlediska je mimořádně závažné riziko přenosu infekcí. Dále jsou to alergické a imunologické reakce a závažné smrtící reakce při podání nekompatibilního erytrocytárního přípravku. Jedním z nejdiskutovanějších problémů současného transfuzního lékařství je riziko přenosu infekce. Kontaminované krevní transfuze jsou celosvětově stále příčinou řady nových infekcí a nálezů příjemců. Postupů k omezení infekčních rizik transfuzí je několik. Jedná se v první řadě o důsledný výběr dárců s důrazem na bezpříspěvkové dárčovství, provádění screeningového, vyšetřování dárců, deleukotizace přípravků, používání patogen-redukčních technik a sledování a vyhodnocování nežádoucích vlivů transfuzí hemovigilancí. Testování dárců krve a jejich složek na krví přenosné infekce: Základem laboratorního screeningu dárců krve na krví přenosné infekce jsou sérologická vyšetření, která jsou ale zatížena rizikem diagnostického okna (HIV 2 - 3 týdny, HBV 4 - 6 týdnů, HCV 2 - 6 měsíců). Možností, jak toto riziko snížit, je rozšíření screeningu o molekulárně biologické metody, kterými se zjišťuje přímo přítom-

nost nukleové kyseliny daného viru. Citlivost těchto metod je vyšší a umožňují tak zkrácení diagnostického okna (u HIV o 7 - 9 dnů, HCV o 59 - 65 dnů a HBV o 25 - 30 dnů). Značná část zemí světa proto v posledních 15 letech k sérologickým testům zavedla i rutinní vyšetření NAT a v transfuzní službě jsou tato vyšetření již pokládána za „State of the Art“. Testování dárců krve a rizika přenosu infekce krevní transfuzí v ČR: V ČR je testování dárců krve na krví přenosné infekce založeno na povinném minimu, tj. na sérologickém vyšetření HBsAg, anti-HCV, anti-HIV 1/2 + Ag p24 a na syfilis. Rozšíření testování o další metody je již několik let na úrovni odborné společnosti a MZ pouze diskutováno, ačkoli promořenost české populace např. VHC činí cca 10 případů na 100 tisíc obyvatel a představuje tak epidemiologický i transfuziologický problém. Infekce HIV je na setrvalém vzestupu exponenciálního charakteru. Nárůst infekce HIV i HCV v obecné populaci ČR zvyšuje její prevalenci i mezi dárci krve. V ČR je ročně provedeno téměř 500 tisíc odběrů krve a jejich složek, za účelem výroby transfuzních přípravků pro klinické použití. Kalkulované riziko přenosu infekce krevní transfuzí je v ČR u virových hepatitid 1 : 300.000, u HIV 1 : 500.000 podaných transfuzí. Zatímco přenos HBV a HCV transfuzí v ČR je v jednotlivých případech téměř každoročně zaznamenán a v roce 2015 v ČR došlo dokonce k sériovému přenosu HCV, přenos HIV transfuzí v ČR dosud popsán nebyl. Nejohroženějšími skupinami pacientů jsou polytransfundovaní, zpravidla onkologičtí a onkohematologičtí pacienti, kterým případný přenos závažné infekce, významně komplikuje jejich zdravotní

stav. Závěr: Snahou autorů je poukázat na nevyhovující úroveň bezpečnosti hemoterapie v ČR, kdy rizika přenosu infekcí krví jsou vyšší než ve většině zemí nejen EU. Obecně akceptovaný standard testování krve dárců je tak v ČR opomíjen. Bezpečnost hemoterapie je možné výrazně zvýšit rozšířením algoritmu vyšetřování krve dárců krve o povinnou detekci nukleových kyselin minimálně tří původců krví přenosných infekcí (HBV, HCV a HIV), aniž by to při rozumném organizačním modelu představovalo významné zvýšení nákladů.

P58/2945. SPECTRA OPTIA - PILOTNÍ SEPARACE NA TRANSFUZNÍM ODDĚLENÍ FAKULTNÍ NEMOCNICE OLOMOUC

Entrová A., Stejskalová M., Stratilová I., Galuszková D. (Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice, Olomouc)

Úvod: Aferetická jednotka transfuzního oddělení Fakultní nemocnice Olomouc byla v listopadu 2015 rozšířena o systém pro aferézu Spectra Optia. Spectra Optia je mobilní automatický separátor krevních složek, který pomocí centrifugace a optické detekce systémem automatického řízení rozhraní AIM (Automated Interface Management) provádí terapeutické aferézní procedury a procedury sběru buněk. Metody: V průběhu 12/2015-2/2016 byly provedeny pilotní odběry vybraných procedur – odběry dárcovských trombocytů (TROMBO), procedura výměny erytrocytů (RBCX), kontinuální sběr mononukleárních buněk (CMNC) a sběr granulocytů (PMN). Mimo separace trombocytů vyžadují všechny ostatní procedury dvoužilný přístup. Výsledky: Odběrů dárcovských trombocytů (procedura Sběr trombocytů – TROMBO) bylo provedeno 41 (6 x 1TU, 24 x 2TU, 11 x 3TU), odběry byly provedeny do odběrové soupravy REF 10400, v případě odběrů 3 TU byl ještě použit akcesorní vak na skladování trombocytů REF 70030. Jakostní parametry produktů byly vyhovující, přístroj však neumožňuje odběry trombocytů do náhradního roztoku. Procedura výměny erytrocytů (Red blood cell exchange – RBCX) byla provedena u 3 pacientů (u 1 pacienta se sekundární polycytémií a u 2 pacientů s familiární erytrocytózou). K depleci erytrocytů byla použita odběrová souprava REF 10220. Pacientům bylo odebráno 413 g – 616 g erymasy s kompletní objemovou náhradou fyziologickým roztokem, délka procedur byla 35 - 40 minut. U tohoto typu odběru se nejvíce projevila limitace dvoužilního přístupu. Procedura sběr granulocytů (PMN) byla provedena 1x u dárce po stimulaci kortikoidy, do odběrové soupravy REF 10300, jako HES byl použit roztok Voluven 10%. Jakostní parametry produktu – granulocyty z aferézy (GA): objem 448 ml a obsah granulocytů 0,66 x10¹⁰/TU. Procedura Kontinuální

sběr mononukleárních buněk (CMNC) byla použita u dvou dárců k odběru koncentrátu mononukleárních buněk pro externího odběratele (biotechnologickou společnost) pro využití ke studijním a výzkumným účelům. Pro odběry byla použita odběrová souprava REF 10300. Byly odebrány dva leukaferetické produkty (Koncentráty mononukleárních buněk) o objemu 112 ml a 113 ml, celkem bylo zpracováno 9000 ml plné krve u obou odběrů, délka procedur byla 157 minut a 165 minut, průtok sběru 0,8ml/min, vstupní průtok 65 ml/min. Poměr vstup/antikoagulant byl vstupně nastaven na 12:1, pro výskyt shluků ve sběrné lince přechodně sníženo na 8:1 následně návrat k hodnotám 11:1. Oba produkty splnily požadavek na obsah mononukleárních buněk >4x10⁹/TU. Závěr: Spectra Optia vhodně doplnila portfolio aferetických přístrojů našeho pracoviště. Uvítali jsme možnost provádění dárcovských odběrů trombocytů, která zvyšuje efektivnost využití přístroje, i přes možnost separace trombocytů pouze do plazmy. Nutnost dvoužilního přístupu byla limitující u deplečních výkonů erytrocytů u pacientů. Ostatní odběry byly provedeny u dárců, kde žilní přístup nebyl problémem. Separace cestou centrálního žilního katétru nebyla provedena.

P59/2932. KOMPLIKACE PŘI ZAJIŠTĚNÍ HEMOTERAPIE PRO PACIENTY PO TRANSPLANTACI KOSTNÍ DŘENĚ/PERIFERNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK (TKD/TKB)

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

Úvod: Rutinně je na našem transfuzním oddělení prováděno vyšetření pacientů po transplantaci kostní dřeně/periferních kmenových buněk (TKD/TKB) od roku 2000 a to jako součást předtransfuzního vyšetření, kompletního imunohepatologického vyšetření nebo jako samostatné vyšetření krevní skupiny (KS) na žádost žadatele. Materiál: krevní vzorek pacienta odebraný do K3EDTA Metodika: První informaci o plánované TKD/TKB dostává vedoucí imunohepatologických laboratoří prostřednictvím zprávy od lékařů Hematoonkologické kliniky. Na podkladě těchto informací vypracuje kartu pacienta po TKD/TKB včetně doporučené hemoterapie, která vychází z typu inkompatibility (velká, malá, event. smíšená). Vyšetření transplantovaného pacienta zahrnuje vyšetření krevní skupiny v AB0 systému a vyšetření RhD antigenu. Vyšetření provádíme dle možností na analyzátoch 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 transplantaci, bývá na našem transfuzním oddělení vyšetřena i krevní skupina dárce. Výsledky: V letech 2000 až 2015 bylo u nás přešetřeno celkem 341 pacientů po alogenní transplantaci kostní dřeně/periferních kmenových buněk. Ve 41 % (138/341) se jednalo o příbuzenskou a v 59 % (203/341) o nepříbuzenskou transplantaci. Stejnoscupinově bylo transplantováno 35% (118/341) pacientů, nescupinově 65 % (223/341) pacientů. U 27 % (93/341) pacientů byl zjištěn pozitivní protilátkový nálezn, který komplikoval zajištění hemoterapie. Ve 4 % (12/341) bylo u pacientů po TKD/TKB přešetřeno podezření na potransfuzní reakci a dle výsledků přešetření byla hemoterapie dodatečně upravena. Závěr: Zajištění hemoterapie pro transplantované pacienty se řídí doporučením transfuzního lékaře a vychází z typu inkompability mezi dárce a příjemcem. Cílem je zajištění adekvátní a co nejúčinnější hemoterapie a minimalizace erytrocytární aloimunizace pro transplantované pacienty.

P60/2912. ERYTROCYTÁRNÍ ALOIMUNIZACE PACIENTKY PO PODÁNÍ TROMBOCYTÁRNÍHO TRANSFUZNÍHO PŘÍPRAVKU

Zemanová M., Holusková I., Pospíšilová D., Galuzzková D. (Transfuzní oddělení Fakultní nemocnice, Olomouc; Dětská klinika, Fakultní nemocnice, Olomouc)

Úvod: K erytrocytární aloimunizaci dochází většinou po podání erytrocytárních transfuzních přípravků (TP), inkompabilních v daném krevně skupinovém systému. Po podání trombocytárních transfuzních přípravků bývá aloimunizace popisována zcela výjimečně. Nebezpečí vzniku aloimunizace je největší u antigenů Rh (CDE/ce) a Kell systému, proto by u rizikových pacientů (pacienti polytransfundovaní, pacienti s již prokázanou specifickou antierytrocytární protilátkou) mělo být dodržováno podání erytrocytárních transfuzních přípravků kompatibilních v uvedených antigenních systémech. Pro podání trombocytárních TP je doporučeno pouze zohlednit kompatibilitu v AB0 systému, přičemž trombocytární TP krevní skupiny AB a 0 (s nízkým titrem aglutininů anti-A a anti-B) jsou považovány za univerzální. Materiál a metodika: V rámci kompletního imunohematologického vyšetření je standardně prováděn screening nepravidelných tepelných antierytrocytárních protilátek v nepřímém antiglobulinovém testu a enzymatickém (papain) testu metodou sloupcové aglutinace (SA) na systému Bio-Rad. Při zjištěné

pozitivitě ve screeningovém testu je doplněno určení specifity antierytrocytárních protilátek v příslušném testu metodou SA Bio-Rad, v případě potřeby doplněné o SA DG-gel či Makropanel firmy Sanguin. V uvedeném sdělení je popsán případ erytrocytární aloimunizace 9-měsíční holčičky, léčené pro pancytopenii nejasné etiologie opakovanými převody erytrocytárních i trombocytárních transfuzních přípravků. Výsledky: Při vstupním imunohematologickém vyšetření v 7/2015 byly metodou SA Bio-Rad identifikovány pouze nepravidelné tepelné antierytrocytární autoprotilátky v.s. nespecifické, reagující v enzymovém (papain) testu. Při kontrolním vyšetření v 10/2015, po aplikaci celkem 5 T.U. ERD a 7 T.U. TADR/TAD, byla nově zjištěna nepravidelná tepelná antierytrocytární aloprotilátka anti-K, reagující v nepřímém antiglobulinovém testu na SA Bio-Rad pouze s homozygotní formou antigenu (KK), při doplňujícím vyšetření za použití Makropanelu (Sanguin) byla jednoznačně potvrzena přítomnost antierytrocytární aloprotilátky anti-K. Při zpětném dohledání aplikovaných transfuzních přípravků bylo zjištěno, že jeden přípravek TADR pocházel od dárce s fenotypem Kk. Závěr: Trombocytární transfuzní přípravky většinou nebývají příčinou erytrocytární aloimunizace. Příměs zbytkových erytrocytů v trombocytárních TP je minimální, nejsou stanoveny konkrétní limity pro hodnocení jakostních parametrů. Nicméně i takto minimální příměs erytrocytů či jejich mikročástic může vést ve vzácných případech k imunizaci příjemce a je tedy otázkou, do jaké míry je nutné zohlednit přítomnost konkrétních erytrocytárních antigenů při podání trombocytárních TP rizikovým pacientům. Na základě zkušenosti s uvedenou pacientkou již na našem TO dodržujeme zohlednění fenotypu K/k při podání trombocytárních TP dívkám a ženám ve fertlím věku. Za posledních 10 let (2006-2015) jde o jediný zaznamenaný případ erytrocytární aloimunizace pacienta po podání trombocytárního TP, z celkového množství 25700 podaných trombocytárních TP na TO FNOL v uvedených letech.

P61/2894. KINETICKY ŘÍZENÁ ELIMINACE PEGYLOVANÉHO DOXORUBICÍNU PLASMAFILTRACÍ

Bláha M., Lánská M., Martinková J., Kubeček O., Filip S. (4. interní hematologická klinika LF a FN, Hradec Králové; Radiologická a onkologická klinika, LF a FN, Hradec Králové)

ÚVOD: Pegylovaná léčiva dávají další naději pro pacienty resistantní na standardní cytostatickou terapii. Pegylovaný doxorubicin (PLD) může být účinný

i u na platinu resistantních Ca ovaria. Pegylace vede k změně farmakokinetiky a snížení kardiotoxicity. Díky tzv. efektu zvýšené permeability a retence proniká PLD brzy a relativně selektivněji do nádorové tkáně (saturace tumoru je docílena do 48 hodin), ale pak cytostatikum dlouhodobě cirkuluje a poškozuje zdravé tkáně. Zhodnotili jsme vlastní modifikaci kineticky řízené eliminace PLD pomocí kaskádové filtrace plazmy (plazmafiltrace - PF) k eliminaci nadbytečné dávky PLD a sledovali farmakokinetické parametry a účinnost metodiky. **METODIKA A SOUBOR NEMOCNÝCH:** K získání plazmy byl použit separátor krevních tělísek Cobe Spectra nebo Optia (Terumo, Lakewood, Colorado, USA). Ve druhém kroku plazma procházela filtrem Evaflux 5A (Kuraray Co, Osaka Japonsko), filtrační povrch dva m², kapiláry s vnitřním průměrem 175 um. Průtok byl řízen přístrojem CF 100 (Infomed, Ženeva, Švýcarsko). Antikoagulace: ACD-A, vstupní bolus heparinu. Promyté množství plazmy: 1 tělesný objem. Soubor nemocných tvořilo 12 žen s platinaresistentním Ca ovaria, dávka PLD 50 mg/m² každé 4 týdny. Léčbu 4 kurami dokončilo 9 nemocných. PF byla prováděna po saturaci tumoru (44-46 hodin po podání), analyzovány byly vzorky před podáním PLD, za 3, 10, 20, 30, 44(46),

47(49), 56, 68, 92, 96 a 116 hodin. Podle farmakokinetických vzorců byla spočtena renální klírens před, během a po PF a biologický poločas PLD. **VÝSLEDKY:** V postinfúzní fázi došlo k in vivo eliminaci 45%, v PF fázi 35% a v exudátech bylo 7,3 % iniciální dávky PLD. Kapacita filtrů: 97 – 100 % PLD. Příliš rychlá eliminace je markerem časné reakce organismu na eliminaci PLD a vedla k redistribuci PLD kolem 60. hodiny. Poměr eliminace ve fázi po infúzi/PF je důležitý pro iniciaci redistribuce a prolongaci biologického poločasu PLD, který byl 2 – 3x delší oproti konvenčnímu doxorubicínu. Nežádoucí účinky: 7% („mild“ podle CTCAE, v. 4.03/2009). **ZÁVĚR:** PF je bezpečná a účinná metodika k eliminaci PLD. Účinnost PF závisí na správném nastavení mohutnosti PF a rychlosti endogenní eliminace PLD. Příliš rychlá eliminace vede k fenomenu redistribuce. PF je zřejmě účinná k eliminaci nežádoucí porce nejen léčiva zhotoveného nanotechnikou, ale nanočástic jako takových vůbec. Může být součástí nových trendů ve vztahu k individualizované medicíně. Další výzkum musí posoudit vliv patologických kovariát - zejména relokace do 3. prostoru (zvláště do výpotků) a zpět.

PODĚKOVÁNÍ: výzkum byl podporován grantem AVZ 16-30366A.

REJSTŘÍK

A

Adam Z.	7, 37, 40, 101, 103, 105
Adamová B.	114, 115
Adamusová L.	118
Alexeeva J.	124
Almáši M.	103
Ambrůzová Z.	29
Amiot M.	24
Andrýs C.	122
Antošová L.	73
Arcaini L.	124

B

Babáčková G.	73
Bachanová V.	16
Bačovský J.	35, 105, 107
Balcárková J.	70, 105
Balhárek T.	82
Bartek aJ.	28, 31
Bátorová A.	57, 103, 128
Bébarová L.	26
Belada D.	59, 61, 122, 124, 125, 128
Bellanger C.	24
Bělohávková P.	49
Beneš V.	90
Benešová K.	61
Bernatíková H.	44
Bhuiyan-Ludvíková Z.	83
Biyukov T.	124
Bláha M.	87, 88, 109, 137
Blážek B.	44, 111
Bohmová M.	83
Bohoněk M.	135
Bojtárová E.	57
Borský M.	24, 123
Bořutová N.	130
Brejcha M.	68, 114
Brown R. J.	24
Brychtová Y.	7
Budinská E.	110
Bujnochová P.	99
Bulíková A.	73
Bultasová L.	131
Burchert A.	40
Buriánková E.	120

C

Callanan M.	17
Campř V.	59, 60, 61, 127
Casadebaig Bravo M. -L.	124
Cetkovský P.	108, 110, 133

Č

Čandová	127
Čermák J.	7
Černá K.	24
Černá O.	52, 117
Černan M.	114
Čerňan M.	43
Čulen M.	110
Čuřík N.	90

D

Davids S. M.	24
Dihel M.	125
Divoká M.	71, 101, 130
Divoký V.	23, 28, 71, 131
Dohnal J.	70
Doležalová M.	27
Doubek M.	7, 24, 68, 89, 123
Dousset C.	24
Dulíček P.	71
Žuraš J.	31, 59
Duspivová I.	131
Dvořáčková K.	27
Dvořáková D.	123
Dvořáková K.	69
Dynterová A.	69
Dýšková T.	125

E

Entrová A.	32, 136
------------	---------

F

Faber E.	29, 43
Fátorová I.	69
Fečková Mihályová J.	121
Fialová Kučerová J.	23, 131
Filip S.	88, 137
Filipová J.	104
Fillerová R.	90, 102, 126
Flodr P.	91, 107
Flodrová P.	91, 107
Folber F.	133
Folta A.	110
Fraňková H.	71
Froňková E.	42, 44
Fürst T.	29, 43, 119
Fürstová J.	29, 43

G

Gáboríková M.	106
Gahérová L.	52
Gajdoš P.	102

Galuszková D.	32, 49, 69, 99, 100, 130, 136, 137	Janotová I.	44
Garnolová P.	47	Jarkovský J.	23, 39, 48, 68, 70, 90, 105, 126
Gašová Z.	83	Jarušková M.	90, 116
Grebeníček L.	118	Jebavý L.	111, 112, 113
Gregorová P.	126	Jelenová I.	27
Gromesová B.	103	Jelínek T.	31
Crowková K.	104	Ježíšková I.	110
Guman T.	57	Jindra P.	25, 40, 57, 58, 85, 110, 114
H		Jirkuvová A.	119
Hajduch M.	30	Jirsová K.	47
Hájek R.	39, 103, 104, 118	Jiskrová E.	90, 126
Hájková H.	108	Jochymek R.	114
Hajšmanová Z.	132	Jonášová A.	52, 55
Hak J.	44, 111	Jungová A.	58, 114
Hanusová H.	104	Juráňová J.	48, 70, 80
Hanzlíková J.	70	Jurczak W.	124
Havrdová M.	27	Jurečková L.	33
Henzlová L.	120	Jurenková A.	122
Hercog R.	90	Juríková K.	109
Hlávková E.	32	K	
Hluší A.	11, 50, 132	Kabut T.	133
Hodek M.	88	Kadlčková E.	114
Hodný Z.	28	Kadlecová J.	70
Hojková P.	69	Kajaba V.	33
Holub D.	106	Kalinová M.	60, 127
Holubová M.	66	Kalmanová P.	136
Holusková I.	69, 130, 136, 137	Kalodová Hadačová J.	27
Holzerová M.	70	Kalvodová L.	45
Horáček J. M.	111, 112, 113	Kamelander J.	
Horáková J.	57, 111	Kapraňová K.	131
Horváthová M.	30, 131	Karas M.	57, 58, 114
Houdková A.	44	Karásková E.	33
Hrabčáková V.	123	Keslová P.	44
Hrabětová M.	57, 58, 85, 114	Kessler P.	39
Hradilová M.	33	Kissova J.	73
Hrubiško M.	128	Klamová H.	90, 116
Hrušák O.	44, 111	Klánová M.	13
Hubáček J.	43	Klener P.	61, 124
Hudeček J.	57	Knight A.	105, 106
Hůlková E.	33	Kobliňová J.	116
Huserová M.	99	Kocmanová I.	133, 134
CH		Kodet R.	60, 127
Chiron D.	17, 24	Kokavec J.	31
Chlupová G.	134	Koláčková M.	130
Chmelová S.	32	Kolář M.	43
Chovancová J.	23, 123	Kolenová A.	111
Chudíková K.	33	Komárková I.	27
I		Konečný P.	30
Indrák K.	16, 43, 48, 50, 71, 96, 109	Konupčíková P.	100
J		Koralkova P.	30
Janečková V.	110	Korelusová I.	131, 132
Janek D.	114	Kořístek Z.	118
Janíková A.	59, 61	Kosařová Z.	110
		Kouba M.	108, 133
		Koukalová A.	32, 99, 100
		Kouřilová P.	32

- | | | | |
|------------------------|-------------------------|-----------------|--|
| Kozák T. | 52, 92 | Maláková J. | 88 |
| Králová B. | 131 | Maňásek V. | 31 |
| Králová R. | 105, 106 | Mandáková P. | 127 |
| Krchniaková M. | 105, 106 | Manukyan G. | 126 |
| Krčová V. | 11 | Marcinek J. | 82 |
| Krejčí M. | 37, 40, 56, 101, 103 | Martinková J. | 137 |
| Krhovská P. | 35, 107 | Martínková J. | 88 |
| Kriegová E. | 102, 125, 126 | Masáková L. | 57 |
| Kriegová E. | 29, 90 | Masárová K. | 103, 128 |
| Krömer P. | 102 | Mayer J. | 24, 49, 56, 115, 124, 133, 134 |
| Kropáčková J. | 70 | Medková P. | 33 |
| Krsková L. | 127 | Mejstříková E. | 44, 111 |
| Křupka M. | 130 | Mertová J. | 108 |
| Křupková L. | 101, 130 | Michalíková M. | 118 |
| Krůzová L. | 70 | Mičková P. | 105 |
| Kryukov F. | 104 | Mihál V. | 44 |
| Kšeňáková K. | 56 | Mihálová H. | 33 |
| Kuba A. | 29, 114 | Mikulková Z. | 125 |
| Kubáčková K. | 59, 61 | Minařík J. | 33, 101, 102, 105, 107 |
| Kubaczková V. | 103 | Minařík L. | 55 |
| Kubeček O. | 88, 137 | Mistrík M. | 57, 103, 128 |
| Kuběnová Z. | 27 | Mlynářčiková M. | 70, 105 |
| Kubová Z. | 119, 120 | Móciková H. | 59, 61 |
| Kubričanová Žaliová M. | 42 | Motlová E. | 90 |
| Kudělka M. | 102 | Motyčková M. | 122, 125, 128 |
| Kufová Z. | 104 | Mráz M. | 24 |
| Kuhn T. | 44 | Mrázek F. | 29 |
| Kulvait V. | 55 | Mrhalová M. | 60, 127 |
| Kupsa T. | 111, 112, 113 | | |
| Kynkorová H. | 46 | | |
| L | | | |
| Labudíková M. | 26, 100 | | |
| Ladická M. | 106 | | |
| Lamy T. | 124 | | |
| Laníkova L. | 28 | | |
| Lánská M. | 87, 88, 137 | | |
| Lapčíková A. | 48, 70, 71, 80 | | |
| Le Gouill S. | 24, 17 | | |
| Lengyelová K. | 109 | | |
| Lenobel R. | 25 | | |
| Lhotová P. | 47 | | |
| Lipert J. | 109 | | |
| Loja T. | 23 | | |
| Lukačková R. | 127 | | |
| Lukáš J. | 128 | | |
| Lukášová M. | 21 | | |
| Lužná P. | 28 | | |
| Lysák D. | 57, 58, 66, 68, 85, 114 | | |
| M | | | |
| Macečková Z. | 30 | | |
| Machálková K. | 39 | | |
| Machová Poláková K. | 90, 116 | | |
| Machová R. | 100 | | |
| Maiga S. | 24 | | |
| Maisnar V. | 39 | | |
| | | N | |
| | | Navrátilová J. | 109 |
| | | Navrátilová J. | 25, 85 |
| | | Navrkalová V. | 23 |
| | | Neudertová H. | 28 |
| | | Nosál M. | 106, 126 |
| | | Novák Z. | 44 |
| | | | |
| | | O | |
| | | Obr A. | 119 |
| | | Obrtlíková P. | 68 |
| | | Orviská M. | 71, 101 |
| | | Osičková J. | 123 |
| | | Osmanov D. | 124 |
| | | Otyepková M. | 99 |
| | | | |
| | | P | |
| | | Pacasová R. | 105 |
| | | Pachner M. | 58 |
| | | Pagáč D. | 25 |
| | | Pál K. | 89 |
| | | Palová M. | 50, 132 |
| | | Papajík T. | 18, 21, 29, 33, 43, 50, 61, 71, 90, 101, 102, 109, 119, 120, 125, 126, 130 |
| | | Paszekova H. | 31 |
| | | Patturajan M. | 124 |
| | | Pavlasová G. | 24 |
| | | Pavlicová V. | 27 |

Pellat-Deceunynck C.	24	Sedláček P.	44, 111
Penka M.	103, 105, 134	Sedláčková R.	33
Petrboková R.	108	Sedlaříková L.	103
Petrmichlová D.	132	Sečkařová M.	70
Pika T.	35, 39, 91, 101, 102, 105, 107	Semerád L.	56, 115
Pikalová Z.	48	Simančíková I.	57
Pirnos J.	59	Simerský R.	25
Piskáček M.	105, 106	Schwarz J.	68
Plank L.	82	Skoultchi A. I.	31
Plevová K.	89	Skraková M.	128
Pohlreich D.	13	Slavík L.	48, 70, 130, 132
Polák J.	108	Smejkal P.	134
Polák P.	134	Smejkalová J.	118
Polgárová K.	55	Smičková J.	69
Polívková V.	90	Smíšek P.	44
Pospíšilová D.	30, 71, 93, 106, 111, 131, 137	Smital J.	99
Pospíšilová Š.	23, 68, 89	Smolej L.	68, 69, 71, 122, 128
Pospíšilová S.	24	Sninská Z.	128
Pospíšková J.	125, 128	Sopko L.	57, 128
Pour L.	37, 39, 40101, 103, 105	Souček O.	122
Prekopová I.	70	Soukup J.	127
Procházka V.	18, 21, 23, 59, 61, 90, 119, 120, 125, 126	Soukup P.	108
Procházková D.	44, 111	Staňo Kozubík K.	89
Procházková J.	56, 132, 133	Starostka D.	114
Prouzová Z.	125, 127	Starý J.	44, 111
Přidalová J.	130	Stecová A.	106
Ptáček J.	120	Steinerová K.	57, 58, 114
Pytlík R.	61	Stejskalová M.	136
R		Stopka T.	25, 31, 55
Ráčil Z.	49, 56, 110, 115, 133, 134	Stratilová I.	136
Radford J.	124	Straub J.	13, 39
Radocha J.	38	Suková M.	44
Radová L.	89, 103	Sýkorová A.	61, 125, 128
Raida L.	29, 109, 114	Sýkorová M.	48
Rašková Kafková L.	23	Szépe P.	82
Réblová K.	89	Szotkowski T.	26, 43, 50, 70, 109, 110, 114
Robešová B.	56	Szturz P.	101
Rohoň P.	94	Š	
Rolencová M.	133, 134	Šálek C.	133
Rousková M.	99	Šálek D.	61
Roziaková L.	128	Ščudla V.	35, 102, 105, 107
Rudnay M.	115	Šebela M.	25
Rytkova N.	114	Šebelová H.	27, 32
Ryznerová P.	120	Šeda V.	24
Ř		Ševčíková S.	103, 104
Řezáčová V.	122	Šimečková R.	80
Říhová L.	105	Šimková D.	23
S		Šimkovič M.	122, 125, 128
Sadílek P.	71	Škrobánková A.	45
Sandecká V.	40, 101	Šlechtová J.	131, 132
Savvulidi F.	25, 31	Šmída M.	89
Schneiderová P.	29, 90, 102	Špaček J.	88
Schönland S.	16	Špaček M.	68
		Špačková J.	27, 32
		Špička I.	13
		Šrámková L.	44, 111

Šrůtová K. 116
 Štecová N. 57
 Štefániková Z. 103, 106, 128
 Štěpánková A. 70
 Štěpánková P. 128
 Štěřba J. 44, 111
 Štětka J. 28
 Šustková T. 120
 Švajcrová J. 132

T

Ticháková P. 52
 Timr P. 44, 111
 Tlamková T. 110
 Touzeau C. 24
 Trka J. 42, 44, 111
 Trnavská I. 73
 Trněný M. 20, 59, 61, 124
 Tučková G. 71
 Turcsányi P. 18, 120, 126
 Turkova T. 31

U

Úlehlová J. 132
 Urbánková H. 70
 Urbanová R. 18, 68, 90, 120, 126
 Uvázlová E. 100

V

Vaculová J. 114
 Válková V. 108
 Vaněk J. 111, 112, 113
 Vargová J. 25
 Vargová K. 25, 55
 Vašeková P. 82
 Vatolíková M. 70
 Verchovodková V. 109

Vernerová Z. 52
 Vetešníková E. 101
 Vinklárková K. 114
 Vodárek P. 122
 Vodičková M. 26, 136
 Vojta P. 30
 Vokurka S. 61
 Vokurková D. 122
 Voska L. 56
 Votava T. 44, 111
 Vozobulová V. 57
 Vranovský A. 57
 Vrbková K. 52
 Vrublová P. 104, 118
 Všianská P. 105

W

Walewski J. 124
 Walterová L. 39
 Weinbergerová B. 49, 56, 115, 133
 Wild A. 57

Z

Zadrazilová V. 48
 Zahradová L. 104
 Zemanová M. 137
 Zikmund T. 25, 31
 Zmoraj V. 115
 Zuchnická J. 121
 Zuna J. 44

Ž

Žáčková D. 115
 Žák P. 87, 110, 111, 112, 113, 122, 125, 128
 Žákovičová A. 109
 Žaliová M. 111
 Žochová R. 100

POZNÁMKY